

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Nataša M. Dorđević Filijović

**KARAKTERIZACIJA I PROCENA
KRITIČNIH PARAMETARA STABILNOSTI
TABLETA OLANZAPINA I ARIPIPRAZOLA
PRIMENOM EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Nataša M. Dorđević Filijović

**CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF
CRITICAL STABILITY PARAMETERS OF
OLANZAPINE AND ARIPIPRAZOLE TABLETS
USING EXPERIMENTAL DESIGN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTORI:

dr sc. Katarina Nikolić, docent
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

dr sc. Danica Agbaba, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr sc. Milan Antonijević, Principal Lecturer in
Pharmaceutical Analysis, Medway School of
Pharmacy, University of Greenwich, Chatham,
United Kingdom

dr sc. Vjera Pejanović, naučni savetnik
Hemofarm A.D. Vršac

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Sektoru istraživanja i razvoja Hemofarma A.D. Deo eksperimenata u vezi sa strukturnom karakterizacijom nečistoća urađen je u Centru za Hemiju IHTM u Beogradu, a deo koji se odnosi na primenu DSC, TGA i XRPD metoda u studijama kompatibilnosti aktivne i pomoćnih supstanci na Katedri za farmaceutsku analizu Univerziteta u Grinviču iz Velike Britanije.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, docentu dr Katarini Nikolić, na pruženoj nesebičnoj pomoći, rečima ohrabrenja i izuzetnoj stručnoj podršci pri izradi ove doktorske disertacije.

Svom mentoru, redovnom profesoru dr Danici Agbabi, izražavam duboko poštovanje i zahvalnost na uspešnoj saradnji, na slobodi prilikom izbora teme, na korisnim savetima i sugestijama.

Zahvaljujem se i profesoru dr Milanu Antonijeviću na predusretljivosti i ekspeditivnosti i dr Vjeri Pejanović na ličnom angažovanju i pozitivnoj energiji koji su mi dali dodatni podsticaj.

Veliko hvala svim koleginicama i kolegama iz Istraživanja i razvoja Hemofarma zbog pružene prilike da se usavršavam i podrške tokom trajanja studija i završetka ove disertacije.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima zato što su uvek bili tu kad treba.

Na kraju, hvala mojim dečacima, suprugu Peđi i sinu Andreju, na bezgraničnoj ljubavi bez koje ovo ne bi bilo moguće.

Karakterizacija i procena kritičnih parametara stabilnosti tableta olanzapina i aripiprazola primenom eksperimentalnog dizajna

REZIME

Uspešno formulisanje stabilnog i delotvornog farmaceutskog preparata zahteva pažljiv odabir pomoćnih supstanci, s obzirom da one mogu da stupe u interakciju sa aktivnim supstancama. Interakcije između lekovitih i pomoćnih supstanci mogu dovesti do fizičke i hemijske nestabilnosti farmaceutskog proizvoda. Za potrebe razvoja olanzapin film tableta sprovedeno je ispitivanje kompatibilnosti olanzapina sa pomoćnim supstancama predloženim za razvoj formulacije. U izvedenim studijama su detaljnije ispitani oni ekscipijensi za koje je pokazano da utiču na stabilnost aktivne supstance. Međusobne interakcije su ispitane praćenjem sadržaja nečistoća primenom visoko efikasne tečne hromatografije (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) metode, zatim primenom termalnih tehnika kao što su diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) i termogravimetrijska analiza (engl. *Thermogravimetric Analysis*, TGA). Dodatno, izvedena je procena fizičke kompatibilnosti primenom difrakcije x-zraka iz supstanci u čvrstom stanju (engl. *X-Ray Powder Diffraction*, XRPD).

Prema ICH (engl. *International Conference on Harmonization*) smernicama, sve nečistoće prisutne u farmaceutskim preparatima u količini većoj od 0,1% moraju da se kvantifikuju i identifikuju. U slučaju nečistoća sa potencijalno jakim ili toksičnim dejstvom kvantifikacija i identifikacija se izvode ispod ovog nivoa. Degradacioni proizvodi olanzapina, detektovani pod stres uslovima u studijama kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci, kao i u studiji preliminarne stabilnosti olanzapin film tableta, su strukturno definisani primenom HPLC metode spregnute sa masenom spektrometrijom (engl. *Mass Spectrometry*, MS), preparativne HPLC metode, kao i IR (engl. *Infrared Spectroscopy*) i NMR spektroskopije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*).

Test kojim se određuje sadržaj nečistoća je veoma važan u procesu ispitivanja stabilnosti farmaceutskih proizvoda, jer pruža mogućnost da se na odgovarajući način prati njihov

kvalitet tokom definisanog roka upotrebe. Značaj ovog ispitivanja je posebno izražen kod preparata kod kojih su nečistoće okarakterisane kao kritičan parametar, pa mogu da utiču na hemijski, farmakološki i toksikološki profil proizvoda. Za potrebe analize nečistoća aripiprazola u aktivnim sirovinama i tabletama razvijena je nova, osetljiva i pouzdana HPLC metoda. Hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci opisano je primenom eksperimentalnog dizajna. Centralni kompozitni dizajn je korišćen za proces optimizacije eksperimentalnih uslova HPLC metode za koje je preliminarnim ispitivanjima utvrđeno da mogu uticati na razdvajanje. Optimalna HPLC metoda je zatim odabrana primenom metode površine odgovora, funkcije hromatografskog odgovora i hromatografske eksponencijalne funkcije. Razvijena HPLC metoda je zatim upotrebljena za analizu kvantitativnog odnosa strukture i retencije ispitivanih analita (engl. *Quantitative Structure Retention Relationship*, QSRR).

Fizičko-hemijski parametri analiziranih jedinjenja su izračunati primenom hemometrijskih programa, a regresiona analiza metodom delimičnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square*, PLS) je korišćena za ispitivanje kvantitativnog odnosa između strukture i retencije. Validacija formiranih PLS modela je izvršena metodom ukrštene validacije - „izostavi jednu vrednost” (engl. *Leave One Out Cross-Validation*, LOO-CV). Formirani QSRR model je uspešno primenjen za predviđanje hromatografskog ponašanja strukturno sličnih jedinjenja.

Validacijom formirane HPLC metode za ispitivanje sadržaja nečistoća aripiprazola, koja je izvedena u skladu sa ICH smernicama, potvrđeno je da metoda odgovara svojoj nameni, odnosno da se može koristiti za praćenje stabilnosti aktivnih supstanci i farmaceutskih proizvoda.

Procena kritičnih parametara stabilnosti tableta olanzapina i aripiprazola je izvršena na osnovu rezultata svih sprovedenih studija. U okviru preliminarnih ispitivanja, primenom stres metode, ispitivan je uticaj različitih faktora, a kao kritičan parametar analiziran je porast nečistoća. Dodatno, na osnovu podataka o temperaturnoj zavisnosti degradacije, primenom Arenijusove jednačine, izvršena je procena preliminarnog roka upotrebe proizvoda. Primenom studija stabilnosti, sprovedenih u skladu sa ICH smernicama, praćeni su fizičko-hemijski parametri, parametri koji karakterišu farmaceutsko-tehnološke osobine tableta, kao i mikrobiološki parametri. Na osnovu ovih rezultata definisan je način čuvanja i rok upotrebe novorazvijenih proizvoda.

Ključne reči: olanzapin, aripiprazol, interakcije lek-ekscipijensi, nečistoće, stres ispitivanja, polimorfizam, stabilnost, HPLC, validacija, hemometrija, eksperimentalni dizajn, PLS, QSRR

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 615.214:543.061:004.9(043.3)

Characterization and evaluation of critical stability attributes of olanzapine and aripiprazole tablets using experimental design

ABSTRACT

Successful formulation of stable and effective pharmaceutical products requires careful selection of excipients, due to their ability to interact with active pharmaceutical ingredients (APIs). API-excipient interactions could lead to physical or chemical instability of drug products. The compatibility testing of olanzapine and excipients proposed for formulation development was conducted to support development of olanzapine film-coated tablets. Excipients that were shown to influence the stability of API were more profoundly examined. Interactions were tested by monitoring the content of impurities. High pressure liquid chromatography (HPLC), as well as thermal methods, such as differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA), were used for the evaluation of chemical compatibility. In addition, assessment of physical compatibility was performed using X-ray powder diffraction (XRPD).

According to relevant International conference on harmonization (ICH) guidelines all impurities present in new pharmaceutical products in the level greater than 0.1% must be quantified and identified. For impurities known to be unusually potent or to produce toxic pharmacological effects quantification and identification are performed below this level. Degradation products of olanzapine were detected under the stress experimental conditions in API-excipient compatibility study and preliminary stability study of olanzapine film-coated tablets. Their structural characterization was performed using HPLC coupled with mass spectrometry (MS), preparative HPLC, infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Analysis of the content of impurities is very important test parameter during the stability testing of pharmaceutical products. It enables us to appropriately monitor quality of drug products during the defined shelf-life. The importance of this testing is especially emphasised for drug product where increase in the level of impurities represents critical stability attribute that could influence chemical, pharmacological, and toxicological drug

product profile. New, sensitive and reliable HPLC method was developed for the purpose of the analysis of aripiprazole impurities in drug substances and drug products. Chromatographic behaviour of analysed compounds was described using experimental design. Experimental HPLC conditions that might have the highest influence on separation were defined during preliminary studies. Later on, central composite face-centred design was used for the optimization of experimental conditions that were chosen according to preliminary studies. Optimal HPLC conditions were selected using the response surface methodology (RSM), as well as chromatographic response function (CRF) and chromatographic exponential function (CEF). Developed HPLC method was used for the analysis of quantitative structure retention relationship (QSRR) of tested substances.

Physico-chemical parameters of analysed compounds were calculated using chemometric programs, while partial least square (PLS) regression analysis was used for examination of quantitative structure retention relationship. Validation of formed PLS models was done with the use of the leave-one-out cross-validation (LOO-CV) method. Created QSRR model was successfully applied for prediction of chromatographic retention of structurally similar substances.

Validation of developed HPLC method for analysis of aripiprazole impurities was performed in accordance with ICH guidelines. It was confirmed that analytical procedure was suitable for its intended purpose, i.e. that method could be used for the stability testing of active substances and pharmaceutical products.

Evaluation of critical stability attributes of olanzapine and aripiprazole tablets was based on the results of all conducted studies. During the preliminary studies, stress method was applied for the assessment of the influence of different environmental factors. Increase in the level of impurities was selected as critical stability attribute. In addition, based on temperature dependency of degradation, preliminary shelf-life was estimated, using the Arrhenius equation. During the stability studies, performed in accordance with ICH guidelines, physico-chemical parameters, pharmaceutical and technological characteristic of tablets, as well as microbiological parameters were monitored. Based on all available results storage recommendations and shelf-life of developed drug products were defined.

Keywords: olanzapine, aripiprazole, API-excipient interactions, impurities, stress testing, polymorphism, stability, HPLC, validation, chemometrics, experimental design, PLS, QSRR

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDK number: 615.214:543.061:004.9(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ispitivanje kompatibilnosti aktivne i pomoćnih supstanci	1
1.1.1. Tipični aspekti reakcija u čvrstom stanju	1
1.1.2. Fizička nestabilnost	2
1.1.3. Hemijska nestabilnost	3
1.1.3.1. Direktna reakcija aktivne i pomoćnih supstanci	3
1.1.3.2. Ekscipijensi kao katalizatori reakcija degradacije aktivne supstance	4
1.1.3.3. Uticaj pH vrednosti ekscipijenasa	4
1.1.4. Reakcije API sa nečistoćama ekscipijenasa	5
1.1.4.1. Peroksidi	5
1.1.4.2. Aldehidi i kiseline	5
1.1.4.3. Metali	6
1.1.5. Plan studija kompatibilnosti	6
1.1.6. Literaturni podaci	8
1.2. Studije stabilnosti farmaceutskih proizvoda	12
1.2.1. Ispitivanja stabilnosti u fazi razvoja proizvoda	12
1.2.2. Metode za analizu nečistoća tokom studija stabilnosti	15
1.2.3. Validacija HPLC metode za analizu nečistoća	17
1.2.4. Literaturni podaci	18
1.3. Eksperimentalni dizajn	19
1.3.1. Faktorski i kompozitni dizajn ispitivanja	20
1.3.2. Funkcije hromatografskog odgovora	26
1.3.3. Matematičko modelovanje primenom regresione analize metodom delimičnih najmanjih kvadrata (PLS)	28
1.3.4. Studija kvantitativnog odnosa strukture i retencije	35
1.3.4.1. Molekulski deskriptori kao svojstva strukture molekula	37
1.3.5. Literaturni podaci	40
1.4. Ispitivane supstance i njihove nečistoće	42
1.4.1. Olanzapin	42
1.4.1.1. Farmakološke osobine olanzapina	42

1.4.1.2. Fizičko-hemijske osobine olanzapina	43
1.4.1.3. Sinteza i potencijalne nečistoće olanzapina	44
1.4.1.4. Metode za analizu olanzapina	47
1.4.2. Aripiprazol	49
1.4.2.1. Farmakološke osobine aripiprazola	49
1.4.2.2. Fizičko-hemijske osobine aripiprazola	50
1.4.2.3. Sinteza i potencijalne nečistoće aripiprazola	51
1.4.2.4. Metode za analizu aripiprazola	53
2. CILJ RADA	55
3. EKSPERIMENTALNI DEO	56
3.1. Oprema, hemikalije i računarski programi	56
3.1.1. Oprema	56
3.1.2. Hemikalije	57
3.1.3. Računarski programi	58
3.2. Olanzapin	59
3.2.1. Hromatografski eksperimentalni uslovi za određivanje nečistoća	59
3.2.1.1. Priprema pufera i rastvarača	59
3.2.1.2. Priprema standardnog rastvora i uzoraka	59
3.2.1.3. HPLC uslovi	60
3.2.2. Eksperimentalni uslovi oksidativne degradacije olanzapina	60
3.2.3. HPLC i MS eksperimentalni uslovi za identifikaciju nečistoća olanzapina	60
3.2.4. Eksperimentalni uslovi preparativne HPLC	61
3.2.5. Eksperimentalni uslovi nuklearno magnetne i infracrvene spektroskopije za identifikaciju nečistoća	61
3.2.6. Eksperimentalni uslovi za karakterizaciju uzoraka u čvrstom stanju	62
3.2.7. Eksperimentalni uslovi ispitivanja kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci	63
3.2.7.1. Priprema uzoraka	63
3.2.8. Eksperimentalni uslovi ispitivanja stabilnosti	65
3.2.8.1. Sadržaj olanzapina	65
3.2.8.2. Sadržaj nečistoća olanzapina	66

3.3. Aripiprazol	67
3.3.1. Hromatografski eksperimentalni uslovi za određivanje nečistoća	67
3.3.1.1. Priprema pufera i rastvarača	67
3.3.1.2. Priprema standardnog rastvora i uzoraka	67
3.3.1.3. HPLC uslovi	68
3.3.2. Priprema rastvora za optimizaciju RP-HPLC metode	68
3.3.3. Eksperimentalni dizajn, PLS modelovanje i funkcije hromatografskog odgovora	69
3.3.4. QSRR studija	69
3.3.5. Priprema rastvora za validaciju RP-HPLC metode	71
3.3.5.1. Linearnost metode	71
3.3.5.2. Limit kvantifikacije (LOQ) i limit detekcije (LOD)	72
3.3.5.3. Tačnost i preciznost metode	72
3.3.5.4. Robustnost metode	73
3.3.6. Eksperimentalni uslovi ispitivanja kompatibilnosti aripiprazola i pomoćnih supstanci	73
3.3.6.1. Priprema uzoraka	73
3.3.7. Eksperimentalni uslovi ispitivanja stabilnosti aripiprazola	75
3.3.7.1. Sadržaj aripiprazola	75
3.3.7.2. Sadržaj nečistoća aripiprazola	76
 4. REZULTATI I DISKUSIJA	 77
4.1. Olanzapin	77
4.1.1. Identifikacija nepoznatih nečistoća	77
4.1.2. Studija kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci formulacije tableta	83
4.1.2.1. Ispitivanje hemijske kompatibilnosti primenom HPLC, DSC i TGA metoda	83
4.1.2.2. Ispitivanje fizičke kompatibilnosti primenom XRPD	90
4.1.3. Studije stabilnosti olanzapin film tableta	92
4.1.3.1. Studije preliminarne stabilnosti	92
4.1.3.2. Studije stabilnosti proizvodnih serija	98
4.2. Aripiprazol	102

4.2.1. Studija kompatibilnosti aripiprazola i pomoćnih supstanci formulacije tableta	102
4.2.2. Karakterizacija aripiprazola i njegovih nečistoća	102
4.2.3. Optimizacija hromatografskih uslova za analizu nečistoća aripiprazola	103
4.2.3.1. Eksperimentalni dizajn u modelovanju HPLC sistema	105
4.2.4. QSRR studija	116
4.2.5. Validacija HPLC metode za analizu nečistoća aripiprazola	119
4.2.6. Studije stabilnosti aripiprazol tableta	127
4.2.6.1. Studije preliminarne stabilnosti	127
4.2.6.2. Studije stabilnosti pilot serija	129
5. ZAKLJUČAK	133
6. LITERATURA	136
7. PRILOZI	149
7.1. Prilog A	149
7.2. Prilog B	157
8. BIOGRAFIJA	166

LISTA SKRAĆENICA

ANOVA – *Analysis of Variance*

API – *Active Pharmaceutical Ingredient* (aktivna supstanca)

ATR – *Attenuated Total Reflectance*

CAS – *Connolly Accessible Surface Area*

CCC – *Central Composite Circumscribed design*

CCD – *Central Composite Design*

CCF – *Central Composite Face-centered design*

CEF – *Chromatographic Exponential Function*

COSY – *Correlation Spectroscopy*

CRF – *Chromatographic Response Functions*

DModX/DModY – *Distance to the Model in X/Y-space*

DP – *Degradation Product*

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

FFD – *Full Factorial Design*

HBA – *Hydrogen Bond Acceptors*

HBD – *Hydrogen Bond Donors*

HMBC – *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*

HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital*

HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*

HR ESI MS – *High-Resolution Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

ICH – *International Conference on Harmonization*

IR – *Infrared Spectroscopy*

IT - *Identification Threshold*

LOD – *Limit Of Detection*

LOO-CV – *Leave One Out Cross-Validation*

LOQ – *Limit of Quantification*

LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

LV – *Latent Variable*

MLR – *Multiple Linear Regressions*

MS – *Mass Spectrometry*

MS – *Connolly Molecular Area*
NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*
OVAT – *One Variable at a Time*
PCA – *Principal Component Analysis*
PDA – *Photo Diode Array Detector*
PLS – *Partial Least Square*
PRESS – *Predictive Residual Sum of Squares*
PSA – *Polar Surface Area*
QSRR – *Quantitative Structure Retention Relationship*
QT – *Qualification Threshold*
RMSEE – *Root Mean Square Error of Estimation*
RMSEP – *Root Mean Square Error of Prediction*
RRT – *Relative Retention Time*
RSM – *Response Surface Methodology*
RT - *Reporting Threshold*
SE – *Standard Error*
SIMCA – *Soft Independent Modelling of Class Analogy*
SS – *Sum of Squares*
TGA – *Thermogravimetric Analysis*
VIP – *Variable Influence on Projection*
XRPD – *X-Ray Powder Diffraction*

1. UVOD

1.1. Ispitivanje kompatibilnosti aktivne i pomoćnih supstanci

Odabir pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav čvrstih farmaceutskih oblika je važan zbog toga što može uticati na fizičko-hemijsku stabilnost leka tokom definisanog roka upotrebe, kao i na njegovu bioraspoloživost. Iz tog razloga je procena mogućih interakcija između lekovite supstance (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) i različitih pomoćnih supstanci važan deo ispitivanja tokom faze preformulacije [1, 2].

Interakcije između aktivne i pomoćnih supstanci u čvrstim farmaceutskim oblicima mogu dovesti do fizičke i hemijske nestabilnosti. Fizička nestabilnost obično podrazumeva promene izgleda, brzine oslobađanja aktivne supstance iz farmaceutskog oblika, polimorfnog oblika, ukusa, mirisa ili čvrstine; takođe, moguća je i kristalizacija amorfni sistema, segregacija, adsorpcija, isparavanje, itd. Hemijska nestabilnost se odnosi na promene u hemijskoj strukturi molekula i obuhvata reakcije degradacije API koje dovode do smanjenja njene koncentracije i formiranja drugih molekula (degradacionih proizvoda). Pad sadržaja API može dovesti do smanjenja efikasnosti leka, dok porast koncentracije degradacionih proizvoda može predstavljati problem sa toksikološkim aspekta, odnosno aspekta bezbednosti proizvoda.

1.1.1. Tipični aspekti reakcija u čvrstom stanju

Putevi i mehanizmi degradacije lekovite supstance u čvrstom stanju razlikuju se od degradacije u tečnom stanju zbog heterogenosti samog čvrstog stanja, ali i mogućnosti fizičkih promena aktivne i drugih komponenata formulacije tokom vremena. Neke od specifičnih karakteristika reakcija u čvrstom stanju mogu biti sledeće:

- A) Reakcije kontrolisane difuzijom su reakcije između reaktanta u čvrstom stanju i reaktanta u kome je on dispergovan, koji predstavlja sredinu. Proizvod reakcije ovog tipa ostaje na površini reaktanta u čvrstom stanju.
- B) Reakcije čija je brzina ograničena formiranjem i rastom reakcionog jezgra su reakcije kristalnog oblika aktivne supstance u čvrstom stanju koje se odvijaju na mestima oštećenja kristala.
- C) Reakcije pri kojima dolazi do stvaranja tečnog proizvoda su kompleksne reakcije koje se odvijaju u dve sredine: čvrstoj i tečnoj.

D) Reakcije ograničene količinom adsorbovane vode su reakcije koje se odvijaju u adsorbovanom sloju vode.

Čvrsti dozirani oblici su uglavnom manje stabilni od samih aktivnih supstanci koje sadrže. U većini hemijskih reakcija koje uključuju pomoćne supstance ili neke njihove komponente, brzina degradacije je proporcionalna sa stepenom razblaženja. Pomoćne supstance mogu da ubrzaju degradaciju aktivnih supstanci putem fizičkih ili hemijskih interakcija. Hemijska interakcija podrazumeva direktnu reakciju ekscipijensa i molekule API, delovanje ekscipijensa kao katalizatora hemijske reakcije ili modifikatora pH vrednosti. U slučaju fizičkih interakcija ekscipijens ne utiče direktno na hemijsku reakciju već menja fizičko stanje aktivne supstance tako da dovodi do povećanja brzine hemijske reakcije [1].

1.1.2. Fizička nestabilnost

Tokom čuvanja proizvoda može doći do promena izgleda, ukusa ili mirisa, naročito kod aktivnih supstanci sa amino grupama ili grupama koje sadrže sumpor. Promene u brzini rastvaranja lekovite supstance često predstavljaju rezultat njihovih fizičko-hemijskih interakcija sa pomoćnim supstancama ili interakcija između pomoćnih supstanci. Ove promene nastaju kao posledica promena u poroznosti tableta ili gustini, promena u obliku aktivnih supstanci (na pr. polimorfizam, hidrati ili soli) ili smanjenoj raspadljivosti usled interakcija između ekscipijensima.

Promene polimorfnog oblika aktivnih supstanci mogu da nastanu kao posledica interakcije sa nekom pomoćnom supstancom formulacije ili vodom. Ove promene se ispituju primenom difrakcije X-zraka (engl. *X-Ray Diffraction*, XRD), infra crvene sprektroskopije (engl. *Infra-Red*, IR), nuklearno magnetne rezonance (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), itd. Uticaj vode na promenu polimorfnog oblika API uočava se tokom čuvanja leka ili njegove proizvodnje i nastaje kao rezultat delovanja slobodne, a ne ukupne vode. Veliki broj aktivnih i pomoćnih supstanci sadrži vodu koja može biti vezana i nevezana. Vezana voda je voda hidratacije ili kristalizacije koja je čvrsto inkorporirana u fizički oblik materijala. Ona je gotovo *nepokretna* i ne ulazi u reakcije. Sa druge strane, nevezana voda postoji kao ravnotežna voda između atmosferske, apsorbovane i adsorbovane vode i ima veću pokretljivost. Aktivnost vode predstavlja direktan indikator količine slobodne, nevezane vode. Ovo znači da film

tableta sa aktivnom supstancom osetljivom na vlagu pokazuje veću nestabilnost pri nižim vrednostima ukupne vode (određene Karl-Fišer metodom), ali višim vrednostima aktivnosti vode u odnosu na formulaciju sa višim vrednostima ukupne vode, a nižim vrednostima njene aktivnosti [1].

Reakcije degradacije kristalnih lekovitih supstanci obično se dešavaju na mestima oštećenja kristala ili na njihovoj površini. Veća molekulska pokretljivost u ovim regionima dovodi do veće brzine reakcije u poređenju sa drugim regionima kristala. Dodatno, ovi regioni imaju veći sadržaj vode usled apsorbirane vode, što takođe doprinosi ubrzanju reakcije degradacije. Mehanička energija kojoj su izložene komponente jednog čvrstog farmaceutskog oblika tokom procesa proizvodnje može dovesti do narušavanja njihove kristalne strukture i formiranja amorfne disperzije male količine aktivne supstance u amorfnom ekscipijensu. Iako je količina API u amorfnom obliku mala, ispod limita detekcije analitičkog postupka, ovo može dovesti do merljivih uticaja na stabilnost doziranog oblika.

1.1.3. Hemijska nestabilnost

Hemijska nestabilnost u čvrstim farmaceutskim oblicima često nastaje kao rezultat interakcije aktivne supstance i jednog ili više ekscipijenasa, odnosno njihovih nečistoća. Najznačajnije reakcije su: hidroliza, dehidratacija, izomerizacija, eliminacija, ciklizacija, oksidacija, fotodegradacija i specifične reakcije sa komponentama formulacije (ekscipijensima ili njihovim nečistoćama). Faktori koji mogu uticati na ove reakcije uključuju: temperaturu, pH, vlagu u čvrstom stanju, relativnu vlagu u prostoru, prisustvo zaostalih katalizatora, svetlosti, kiseonika, fizičkog oblika i veličine čestica aktivnih i pomoćnih supstanci [3].

1.1.3.1. Direktna reakcija aktivne i pomoćnih supstanci

Direktna reakcija podrazumeva reakciju između funkcionalnih grupa aktivne i pomoćne supstance pri čemu dolazi do nastanka hemijske veze između molekula. Primer jedne takve reakcije je Maillard-ova reakcija koja se dešava između API sa primarnim ili sekundarnim amino grupama i laktoze. Ona podrazumeva nukleofilni napad amino grupe API na karbonilnu grupu laktoze pri čemu nastaje nestabilan hemiaminal iz koga se eliminacijom vode dobija imin ili iminijum jon. Nastali imin je u ravnoteži sa

glikozilaminskim oblikom. Amadorijevim premeštanjem, a zatim i degradacijom nastalog proizvoda nastaju: karbonilna jedinjenja, furani, amidski derivati, pirol i ostala heterociklična jedinjenja. S obzirom da neki od ovih proizvoda imaju žućkasto smeđu boju Maillard-ova reakcija je poznata pod nazivom „*browning reaction*“. Formiranje estara u kome učestvuju hidroksilne grupe API i karboksilne grupe ekscipijenasa, ili njeni estri, takođe pripada ovog vrsti reakcija.

1.1.3.2. Ekscipijensi kao katalizatori reakcija degradacije aktivne supstance

U ovom slučaju pomoćna supstanca ima ulogu katalizatora, povećava brzinu degradacije lekovite supstance, ali sa njom ne stvara hemijske veze. Pomoćna supstanca snižava energiju aktivacije reakcije i na kraju reakcije izlazi neizmenjena. Degradaciju β -laktam antibiotika u vodenim rastvorima ubrzava prisustvo ugljenih hidrata ili polihidroksilnih alkohola. U prvoj fazi dolazi do nukleofilnog napada alkoksi anjona šećera na β -laktamsku vezu, pri čemu nastaju peniciloiinska kiselina i piperazindion derivat. U literaturi je poznato da saharoza deluje kao katalizator reakcije hidrolize benzilpenicilina, pri kojoj nastaje benzilpeniciloiinska kiselina [4].

1.1.3.3. Uticaj pH vrednosti ekscipijenasa

Brzina degradacije mnogih aktivnih supstanci u rastvoru zavisi od njegove pH vrednosti. U čvrstim doziranim oblicima degradacija API zavisi od pH vrednosti okruženja. pH vrednost formulacije određuju pH vrednosti aktivne i pomoćnih supstanci koje ulaze u njen sastav. Ekscipijensi koji sadrže jonizujuće grupe deluju kao modifikatori pH vrednosti i mogu uticati na pH formulacije. Neki od njih su: kroskarmeloza natrijum, natrijum skrobglikolat (sredstva za raspadanje), kalcijum karbonat, dikalcijum fosfat (punioci), magnezijum stearat, stearinska kiselina (lubrikansi). Organske kiseline kao što su limunska ili vinska se dodaju u dozirane oblike slabih baza kako bi se poboljšala brzina rastvaranja lekovite supstance.

1.1.4. Reakcije aktivnih supstanci sa nečistoćama ekscipijenasa

1.1.4.1. Peroksidi

Peroksidi su veoma reaktivni i teže formiranju N-oksida i drugih oksidativnih nečistoća. U čvrstim doziranim oblicima peroksidi postoje ili kao alkil peroksidi (ROOR') ili kao hidroperoksidi (ROOH). Obe grupe su veoma labilne i dovode do nastanka hidroksil (HO') i/ili alkoksi (RO') radikala, koji su jaka oksidaciona sredstva [5].

Peroksidi su veoma reaktivne grupe i tragovi ovih nečistoća mogu se naći u pomoćnim supstancama kao što su : polietilenglikol (PEG), povidon i krosповidon. Za postizanje zadovoljavajuće stabilnosti aktivnih supstanci podložnih procesu oksidacije važno je da se količina peroksida kontroliše u ekscipijenima, s tim što treba imati u vidu da nivo peroksida može da poraste tokom njihovog čuvanja. Iz tog razloga nekada je potrebno da se ispitivanja stabilnosti izvode korišćenjem više serija pomoćnih supstanci koje će sadržati različitu količinu peroksida. Na primer, kod tableta raloksifen hidrohlorida je na osnovu pokazane zavisnosti između količine vodonik peroksida i nastanka degradacionog proizvoda, definisan limit za nivo peroksida u ekscipijensima ove formulacije, povidonu i krosповidonu [6].

1.1.4.2. Aldehidi i kiseline

Mravlja kiselina i/ili formaldehid mogu biti prisutni u ekscipijensima kao nečistoće. Aktivne supstance sa amino ili hidroksilnom grupom mogu reagovati sa mravljom kiselinom pri čemu nastaju amidi ili estri.

Na primer, nečistoća laktoze, 5-hidroksimetil-2-furfuraldehid, reaguje sa karbonilnom grupom haloperidola pri čemu dolazi do kondenzacije [7]. Formaldehid takođe može nastati i kao proizvod degradacije nekih aktivnih supstanci (hidrohlorotiazid, [8]). PEG se obično dodaje kao plastifikator u suspenziju za oblaganje tableta. Oksidativnom degradacijom dolazi do stvaranja formaldehida i mravlje kiseline, a oba proizvoda mogu reagovati sa lekovima koji sadrže amino grupu (vareniklin, [9]). U nekim slučajevima redukujući šećeri, kao nečistoće pomoćnih supstanci, mogu dovesti do nestabilnosti leka. Na primer, saharoza, neredukujući disaharid, je najčešće korišćen zaslađivač u tečnim doziranim oblicima za peroralnu upotrebu. Zabeleženo je da saharoza, kao izvor

monosaharida, predstavlja uzrok degradacije entekavira pri pH 4 jer je u tim uslovima povećana degradacija na redukujuće monosaharide fruktozu i glukozu [10].

S obzirom da je formaldehid veoma reaktivan, njegovo prisustvo u ekscipijensima trebalo bi redovno kontrolisati [11]. Takođe, jedan od pristupa jeste i izbegavanje korišćenja ekscipijenasa čijom degradacijom nastaju reaktivne grupe. Na primer, umesto saharoze moguće je kao zaslađivač koristiti maltitol ili koristiti suspenzije za oblaganje tableta koje ne sadrže PEG [9, 10].

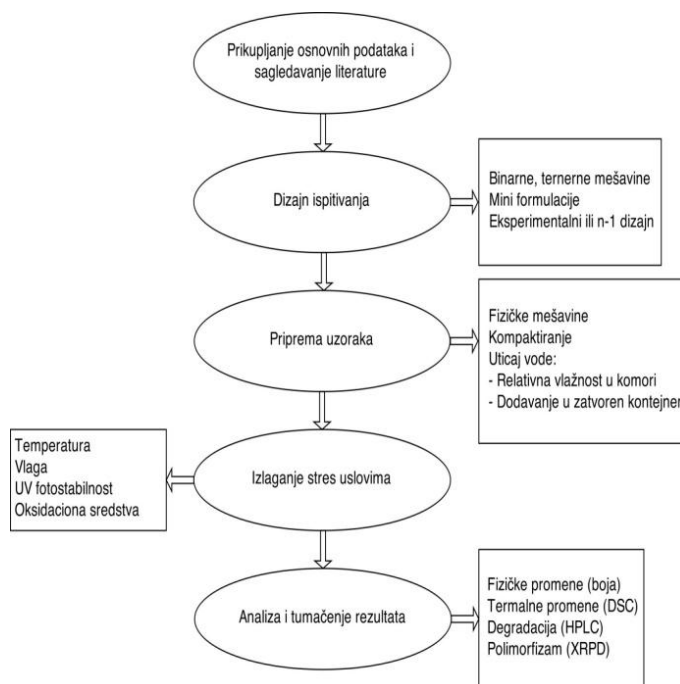
1.1.4.3. Metali

Ostaci metalnih katalizatora ili reagenasa u aktivnim i pomoćnim supstancama strogo se kontrolišu na osnovu preporuka relevantnih regulatornih smernica. Iz tog razloga u literaturi nema dostupnih podataka o uticaju metalnih nečistoća na degradaciju leka. Međutim, u slučajevima kada metalni katalizatori ubrzavaju degradaciju API, potrebno je ispitati kako njihova količina utiče na stabilnost leka i eventualno postaviti strožije kriterijume za kontrolu u pomoćnim supstancama.

1.1.5. Plan studija kompatibilnosti

Studije kompatibilnosti podrazumevaju seriju aktivnosti osmišljenih tako da otkriju ključne interakcije između aktivnih i pomoćnih supstanci i njihove uzroke, kako je prikazano na Slici 1 [3]. Izvode se korišćenjem smeša aktivne supstance sa jednom ili više pomoćnih supstanci. Koriste se različiti odnosi aktivnih i pomoćnih supstanci shodno postavljenim ciljevima. Jedna od najčešće korišćenih metoda je ispitivanje binarnih smeša API i pomoćnih supstanci u odnosu 1:1 ili nekom drugom. Ovim smešama se može dodati voda, a nekada se i kompaktiraju. Izlažu se stres uslovima i nakon određenog vremena analiziraju primenom visoko efikasne tečne hromatografije (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) [12]. Alternativno, smeše se mogu ispitivati primenom metoda termalne analize, kao što je diferencijalno skenirajuća kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC). DSC se trenutno smatra jednom od vodećih tehnika na ovom polju [13-20]. Osnovna prednost ove tehnike sastoji se u tome što se potencijalne inkompatibilije uočavaju relativno brzo na osnovu izgleda, pomeranja ili nestajanja pikova i/ili variranja odgovarajućih entalpija promene (ΔH). Osim toga, za analizu se koristi mala količina uzorka. Međutim, jedno od ograničenja

ove tehnike je interpretacija rezultata, koja se mora izvoditi pažljivo, imajući u vidu to da se uzorci izlažu temperaturama od 300°C ili više. Iz toga razloga se obično predlaže da se rezultati dobijeni primenom DSC tehnike kombinuju sa rezultatima dobijenim primenom izotermalnog stres ispitivanja [12].



Slika 1. Faze studije kompatibilnosti (○) i ključne odluke i promenljive u svakoj fazi (□)

Izotermalno stres ispitivanje podrazumeva da se smeše aktivne i pomoćne supstance sa ili bez dodatka vode kondicioniraju u uslovima povišene temperature tokom određenog vremenskog perioda (najčešće 3-4 nedelje). Cilj je da se ubrza degradacija API i interakcija sa ekscipijensima. Nakon toga, uzorci se posmatraju kako bi se uočila eventualna promena boje ili drugih fizičkih karakteristika, a kvantitativno se određuje sadržaj API i nečistoća. Hemijska kompatibilnost API u binarnim smešama može se razlikovati od kompatibilnosti u multikomponentnim smešama. U binarnim smešama se ne detektuju potencijalne interakcije između ekscipijenasa koje takođe mogu uticati na stabilnost aktivne supstance. Ove interakcije se javljaju i u čvrstim farmaceutskim oblicima, a naročito kod API čija stabilnost zavisi od više različitih ili kombinovanih faktora i formulacije doziranog oblika [21].

Količina API može biti značajno manja od količine pomoćne supstance čime se povećava proporcija reagujućih grupa, ukoliko toj reakciji doprinosi pomoćna supstanca i difuzioni transport do dispergovanih čestica API.

Ispitivanja kompatibilnosti API i pomoćnih supstanci mogu se unaprediti uticajem na: 1) planiranje studije i procenu rezultata; 2) postavljanje eksperimentalnih uslova; 3) analitičke postupke [22].

Uslovi povišene temperature se najčešće koriste kako bi se ubrzali degradacioni procesi koji se dešavaju pri sobnoj temperaturi pod pretpostavkom da kinetika reakcije prati linearno Arenijusovo ponašanje. Kako bi se što više smanjilo vreme potrebno za odvijanje reakcije, temperatura se podiže do dozvoljene gornje granice. Preporuka je da se za ovu vrstu ispitivanja ne koriste temperature koje prelaze 70-80°C, jer one mogu dovesti do prekoračenja energija aktivacije alternativnih degradacionih mehanizama i dobijanja nereprezentativnih rezultata [2].

Mehanički stres se može uvesti u sistem mrvljenjem, mlevenjem, kompaktiranjem, itd. Na taj način može doći do formiranja amorfnih džepova ili uvođenja kristalnih defekata čime se ubrzava reakcija degradacije. Dodatno, kompaktiranjem se ostvaruje bliži kontakt aktivne i pomoćne supstance ili njenih nečistoća, a menja se i površina kontakta. Smešama aktivne i pomoćnih supstanci često se dodaje i voda zbog toga što je hidroliza jedna od najčešćih reakcija degradacije. Takođe, ekscipijensi sadrže određenu količinu slobodne vode ili su sposobni da apsorbuju vodu iz okruženja. Voda se uvodi u sistem formiranjem suspenzije, dodatkom određenog % vode u zatvoren sistem ili izlaganjem sistema uslovima kontrolisane vlage.

Oksidacija je druga najčešća reakcija degradacije aktivnih supstanci. Iz tog razloga se oksidativni stres uslovi takođe mogu uključiti u protokole kompatibilnosti.

1.1.6. Literaturni podaci

Pregledom literaturnih podataka nađeni su različiti tipovi ispitivanja interakcija API i pomoćnih supstanci čvrstih farmaceutskih oblika.

Ispitivanje kompatibilnosti raloksifena sa povidonom i krosповidonom, ekscipijensima koji ulaze u sastav čvrstih farmaceutskih oblika, sprovedeno je ciljem da se utvrdi značaj

peroksidnih nečistoća ovih pomoćnih supstanci na stvaranje oksidacionog degradacionog proizvoda raloksifena. Rezultati ovog ispitivanja ukazali su na značaj poznavanja čistoće i sastava ekscipijenasa [6].

Termogravimetrijska analiza i tehnika diferencijalno skenirajuće kalorimetrije korišćene su za procenu kompatibilnosti ketoprofena i nekoliko ekscipijenasa koji ulaze u sastav čvrstih farmaceutskih obilka. Rezultati ispitivanja ukazali su na postojanje inkompatibilije između ketoprofena i polivinilpirolidona, odnosno magnezijum stearata. Rezultati su potvrđeni primenom difrakcije X-zraka iz praha [14].

DSC, TG i FT-IR metode su korišćene tokom ispitivanja kompatibilnosti primakina i ekscipijenasa čvrstih farmaceutskih oblika u binarnim smešama u odnosu 1:1. Interakcije su zabeležene u uzorcima sa laktozom, magnezijum stearatom i manitolom [15].

Studija kompatibilnosti prometazin hidrohlorida sa pomoćnim supstancama koje ulaze u sastav tableta sprovedena je na fizičkim smešama u odnosu 1:1 primenom izotermalnog stres ispitivanja i DSC metode. Rezultati kombinovanih metoda pokazali su da prometazin hidrohlorid reaguje sa laktozom monohidrat [16].

Takođe, ranitidin hidrohlorid, kao sekundarni amin, reaguje sa laktozom, a interakcija je zabeležena u binarnoj smeši ovih supstanci u odnosu 1:1 primenom DSC tehnike [17].

Kompatibilnost glipizida i određenih pomoćnih supstanci ispitivana je tokom razvoja tableta sa produženim oslobađanjem. Inicijalno su uzorci analizirani primenom DSC metode, a korišćeno je i izotermalno stres ispitivanje. Na osnovu ovih rezultata odabrani su ekscipijensi prototip formulacije [18].

Kompatibilnost hlorpropamida i ekscipijenasa tabletnih formulacija ispitivana je u binarnim smešama primenom DSC tehnike. Rezultati ispitivanja ukazali su na postojanje interakcije između API i magnezijum stearata, odnosno natrijum lauril sulfata [19].

Kompatibilnost haloperidola i polivinilpirolidona, magnezijum stearata i α -laktoze analizirana je u binarnim i ternernim smešama primenom različitih tehnika: metoda termalne analize, elektronske mikroskopije, IR spektroskopije i difrakcije x-zraka. U okviru ove studije ispitivan je i uticaj mlevenja. DSC tehnika se pokazala najosetljivijom i specifičnom za procenu kompatibilnosti. Rezultati su pokazali da postoji snažna inerakcija sa polivinilpirolidonom koju favorizuje proces mlevenja [20].

Kompatibilnost aciklovira i laktoze ispitivana je kombinovanom primenom metoda termalne analize i HPLC-MS/MS tehnike. Na taj način uspešno je identifikovan proizvod Maillard-ove reakcije do koje dolazi reakcijom između primarne amino grupe API i redukujućeg šećera tj. laktoze [23].

Moguće interakcije između ketoprofena i dve pomoćne supstance, laktoze i polivinilpirolidona, praćene su primenom tehnika vibracione spektroskopije [24].

Kompatibilnost amlodipina sa pomoćnim supstancama čvrstih farmaceutskih oblika ispitivana je u binarnim smešama 1:1, kao i u multikomponentnim smešama primenom HPLC i HPLC-MS metode. Rezultati ispitivanja utvrdili su inkompatibilnost amlodipina i laktoze usled stvaranja amlodipin besilat glikozil jedinjenja. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata preporučeno je da se čvrsti farmaceutski oblici sa amlodipinom izrađuju bez laktoze [25].

Rezultati ispitivanja kompatibilnosti omeprazol natrijum izomera i manitola primenom nekoliko tehnika pokazali su da u interakciji učestvuje samo R-omeprazol. Na osnovu ovog ispitivanja je zaključeno da različiti odnosi tautomernih oblika R- i S-omeprazola utiču na mogućnost interakcije i različit stepen bioraspoloživosti ovog leka [26].

Za ispitivanje interakcija kaptoprila i tabletnih ekscipijenasa korišćene su različite tehnike: DSC, TG, XRPD i FTIR. Rezultati studije su pokazali moguću interakciju API i magnezijum stearata [27]. Moguće interakcije kaptoprila i nekoliko lubrikanasa ispitivane su u binarnim smešama 1:1 primenom DSC, TGA i FTIR tehnika, kako bi se procenio uticaj procesa mrvljenja na moguće interakcije. Rezultati su pokazali da kaptopril ne reaguje sa talkom i stearinskom kiselinom, ali su interakcije zabeležene u smeši sa natrijum i magnezijum stearatom, a zaključeno je da proces mrvljenja ubrzava interakcije [28].

Rezultati studije kompatibilnosti binarnih smeša trihlormetiazida sa sedam pomoćnih supstanci koje ulaze u sastav tableta pokazali su značajan pad sadržaja aktivne supstance u smeši sa hidroksipropilcelulozom [29].

U studiji u kojoj su tablete ibuprofena kondicionirane na 70°C/75% RH tokom 3 nedelje pokazano je da degradaciju API ubrzavaju polietilen glikol i polisorbitat 80, pomoćne supstance koje se koriste tokom proizvodnje tableta. Ovi rezultati potvrđeni su i studijom kompatibilnosti binarnih smeša [30].

Studije interakcije omeprazola i kiselih supstanci za filmovanje u binarnim smešama ispitivane su primenom nekoliko metoda. HPLC metoda pokazala se najosetljivijom za određivanje degradacionih proizvoda. Najveći stepen degradacije pokazuje hidroksipropilmetilceluloza ftalat (HP-55) [31].

Primenom termoanalitičkih metoda je uočena inkompatibilnost između enalapril maleata i silicijum dioksida. Takođe, pokazano je da reakcija između aktivne supstance i natrijum

hidrogenkarbonata povećava njenu stabilnost pod uticajem temperature. Ova studija ukazuje na važnost primene termoanalitičkih metoda tokom razvoja proizvoda [32].

Rezultati analize smeša levotiroksin natrijum pentahidrata sa pomoćnim supstancama uz dodatak vode pokazali su da se stabilnost aktivne supstance povećava sa porastom pH vrednosti. Tako su tablete proizvedene korišćenjem dvobaznog kalcijum fosfata uz dodatak baznog pH modifikatora, natrijum karbonata, natrijum bikarbonata ili magnezijum oksida, stabilne pri ubrzanim uslovima, za razliku od tableta proizvedenih korišćenjem anhidrovane laktoze, skroba ili mikrokristalne celuloze [33].

Kompatibilnost atenolola sa pomoćnim supstancama ispitivana je u binarnim smešama (1:1) primenom HPLC metode. Rezultati su pokazali interakcije sa askorbinskom kiselinom, limunskom kiselinom i butilhidroksianizolom. Nastali degradacioni proizvodi okarakterisani su primenom LC-MS/TOF tehnike [34].

1.2. Studije stabilnosti farmaceutskih proizvoda

Ispitivanje stabilnosti ima važnu ulogu u procesu razvoja novih proizvoda jer pruža informacije o ponašanju lekova kada se izlože uticaju različitih faktora, kao što su temperatura, relativna vlažnost vazduha i svetlost. Takođe, rezultati ovih ispitivanja omogućavaju definisanje načina čuvanja farmaceutskih preparata, kao i njihovog roka upotrebe. Tokom studije prati se veliki broj fiziko-hemijskih, farmaceutskih i mikrobioloških parametara i identifikuju i procenjuju kritični parametri (engl. *critical stability attributes*) koji određuju sveukupnu stabilnost proizvoda. Rok upotrebe farmaceutskog preparata određuje se na osnovu vremenskog perioda koji je potreban da pri definisanom načinu čuvanja kritičan parametar stabilnosti dođe do vrednosti koje mogu predstavljati problem sa aspekta kvaliteta, efikasnosti i bezbednosti [35].

U novije vreme, zbog prisustva sve većeg broja generičkih lekova, veliki značaj pridaje se ispitivanju nečistoća u aktivnim supstancama i farmaceutskim proizvodima, s obzirom da njihovo prisustvo u malim količinama može dovesti do smanjenja efikasnosti leka, pojave neželjenog dejstva i toksičnosti. Organske nečistoće mogu predstavljati zaostale polazne materijale, supstance koje nastaju u procesu sinteze aktivne sirovine (sporedni i intermedijerni proizvodi) ili usled moguće degradacije aktivne sirovine u toku proizvodnje i/ili čuvanja. Dodatno, u farmaceutskim proizvodima nečistoće mogu nastati i prilikom interakcije aktivne sa pomoćnim supstancama formulacije ili kontaktom ambalažom [36-40].

1.2.1. Ispitivanja stabilnosti u fazi razvoja proizvoda

Tokom laboratorijskog razvoja proizvoda sprovode se stres studije stabilnosti čiji je cilj odabir formulacije i kontaktne ambalaže, kao i definisanje kritičnih parametara stabilnosti. Stres ispitivanja su neophodna kako bi se izvršila procena aktivne supstance i proizvoda pod različitim uslovima povišene temperature i relativne vlažnosti. Rezultati ovih ispitivanja mogu biti korisni i za razumevanje njihovog profila stabilnosti tokom proizvodnje, čuvanja, transporta i upotrebe. Ove studije omogućavaju dobijanje informacija o potencijalnim degradacionim proizvodima i pomažu u definisanju puteva degradacije aktivne supstance u ispitivanom farmaceutskom obliku. Dodatno, one mogu

da se koriste za potvrdu primenljivosti analitičke metode potrebama ispitivanja stabilnosti tj. *stability-indicating* karaktera [35].

Dobro osmišljenim stres ispitivanjem može se na adekvatan način predvideti ponašanje proizvoda pri manje drastičnim uslovima u dužem vremenskom periodu. Definisane roka upotrebe za potrebe registracije proizvoda podrazumeva i određen stepen ekstrapolacije rezultata.

Temperatura je jedan od najčešćih uzroka degradacije aktivnih supstanci i farmaceutskih proizvoda. Ona deluje na dva načina: tako što dovodi do nastanka degradacionih proizvoda i tako što ubrzava njihovo formiranje koje se odvija pod uticajem nekog drugog faktora, na primer vlage ili svetlosti [41].

Energija aktivacije, E_a je energija koja je molekulima potrebna za odigravanje hemijskih degradacionih procesa. Njena vrednost zavisi od temperature i sa povećanjem temperature se smanjuje zbog toga što na višim temperaturama više molekula poseduje višu energiju. Arenijusova (engl. *Arrhenius*) jednačina je eksponencijalna jednačina koja povezuje brzinu hemijske reakcije, k sa temperaturom, T u Kelvinovim stepenima. Ova zavisnost se matematički izražava sledećom jednačinom:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1.)$$

Preuređenjem ove jednačine dobija se sledeći izraz:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (2.)$$

gde je A konstanta proporcionalnosti ili tzv. „ A faktor”, a R univerzalna gasna konstanta ($1.987 \text{ cal JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ or $8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$).

Jednačina pokazuje da grafički prikaz prirodnog logaritma brzine hemijske reakcije i recipročne vrednosti apsolutne temperature predstavlja pravu liniju čiji je nagib jednak odnosu energije aktivacije i gasne konstante, a odsečak na y osi prirodnom logaritmu A faktora. Ovo znači, da se izvođenjem serije stres studija na nekoliko povišenih temperatura može kreirati Arenijusov grafik, na osnovu koga se može predvideti brzina hemijske reakcije na temperaturi čuvanja (25°C) i na osnovu toga definisati preliminarni rok upotrebe farmaceutskih proizvoda. Ovaj podatak omogućava pravilan izbor formulacije za dalji razvoj, kao i kontaktne ambalaže, shodno postavljenim ciljevima ispitivanja.

Pored temperature, vlaga takođe može značajno uticati na degradaciju aktivnih supstanci, nezavisno od toga da li reakcija uključuje vodu. Sposobnost vode da utiče na fizičko-hemijske promene nekog uzorka zavisi od aktivnosti vode u tom uzorku, koja predstavlja ravnotežnu relativnu vlažnost (engl. *Equilibrium Relative Humidity*, ERH) iznad uzorka. Iz tog razloga je razvijena i korigovana Arenijusova jednačina koja prilikom predviđanja stabilnosti pored temperature razmatra i uticaj relativne vlage, odnosno ERH, kako sledi [35, 42-43]:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} + B(\text{ERH}) \quad (3.)$$

Uzorci se izlažu različitim uslovima temperature i relativne vlažnosti tokom vremenskog perioda potrebnog za postizanje nivoa degradacije koji odgovara specificiranom limitu (engl. *isoconversion paradigm*). Da bi se ova jednačina rešila potrebno je izvođenje najmanje tri eksperimenta sa različitim uslovima temperature i relativne vlažnosti, ali se u praksi obično primenjuje protokol sa 4-6 tačaka. Primena ovog eksperimentalnog dizajna omogućava tačnu i brzu procenu roka upotrebe farmaceutskih proizvoda u razvoju, što je od posebne važnosti za nestabilne aktivne supstance.

Sa druge strane, jednostavniji pristup takođe može dati dobre rezultate ukoliko se pažljivo primenjuje i ukoliko se uticaj relativne vlažnosti minimizira, na primer korišćenjem kontaktne ambalaže sa dobrim zaštitnim svojstvima. Ovo naročito važi za stabilne aktivne supstance, gde se primenom oba modela dobijaju slična predviđanja [44].

Studije stabilnosti pilot i/ili proizvodnih serija proizvoda se izvode pri ubrzanim (engl. *accelerated*), intermedijernim (engl. *intermediate*) i dugotrajnim uslovima (engl. *long-term*). Ispitivanje pod intermedijernim uslovima izvodi se u slučaju značajnih promena kod uzoraka čuvanih pri ubrzanim uslovima. Cilj ovih studija je potvrda odabranih formulacija proizvoda, ambalaže i specifikacija. Takođe, rezultati ovih ispitivanja se koriste prilikom registracije preparata. Tokom ovih ispitivanja prate se fizičko-hemijski, farmaceutski i mikrobiološki parametri, a posebno se analizira i procenjuje kretanje kritičnih parametara stabilnosti, s obzirom da proporcionalno uvećanje serije proizvoda sa laboratorijskog na pilot ili proizvodni nivo može uticati na dobijene rezultate. Na osnovu rezultata definišu se način čuvanja i rok upotrebe farmaceutskih preparata.

1.2.2. Metode za analizu nečistoća tokom studija stabilnosti

Ispitivanje nečistoća u sirovinama i farmaceutskim preparatima predstavlja poseban analitički izazov zbog njihovih najčešće veoma srodnih fizičko-hemijskih osobina i prisustva u maloj količini u odnosu na aktivnu supstancu, zbog čega je potrebno imati dovoljno selektivnu i osjetljivu metodu farmaceutske analize. Za određivanje sadržaja nečistoća tokom studija stabilnosti primenjuju se „stability-indicating” metode što je jedan od regulatornih zahteva. Ovim metodama se precizno kvantifikuju degradacioni proizvodi [40,45]. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) sa PDA detektorom (eng. *photodiode-array*), pomoću koga se može detektovati koeluiranje više degradacionih proizvoda ispitivanjem čistoće pika (eng. *peak purity*) i razlikovati degradacioni proizvodi istog retencionog vremena snimanjem njihovih spektara, predstavlja metodu izbora za ispitivanje nečistoća i degradacionih proizvoda [46].

Tečna hromatografija reverznih faza (RP-HPLC) primenjuje se za razdvajanje nepolarnih ili slabo polarnih jedinjenja, u koje spada većina aktivnih supstanci farmaceutskih proizvoda i njihove nečistoće. Razdvajanje se postiže na osnovu različitog stepena hidrofobnih interakcija koje ove supstance ostvaruju sa nepolarnom, najčešće ugljovodoničnom stacionarnom fazom. Zbog svoje prirode nepolarna jedinjenja ostvaruju jače veze sa stacionarnom fazom, pa se sa kolone eluiraju kasnije od polarnih [46-48]. Za RP-HPLC je karakteristična polarna mobilna faza sa kojom jedinjenja koja se razdvajaju takođe stupaju u specifične interakcije. Najčešće se koristi voda, kao izrazito polarni rastvarač uz organski modifikator, najčešće acetonitril i metanol. Tradicionalno, većina analiza u farmaciji izvodi se korišćenjem izokratskog eluiranja mobilne faze. Međutim, u novije vreme se, zbog složenog sastava uzoraka i različite polarnosti jedinjenja u njima, za analizu nečistoća u aktivnim sirovinama i farmaceutskim proizvodima primenjuju metode zasnovane na gradijentnom eluiranju [46]. Mobilnoj fazi se često dodaju i drugi modifikatori i to: kiseline (fosforna), baze (trietilamin), puferi (fosfatni) ili jon-par reagensi (natrijum-pentansulfonat). Modifikatori suzbijaju jonizaciju ispitivanih supstanci, a nastali molekularni oblik ostvaruje bolju interakciju sa stacionarnom fazom, pa se dobijaju pikovi sa boljom simetrijom. Dodavanje pufera osim što utiče na stepen jonizacije održava konstantnom i pH vrednost mobilne faze. Izbor pufera i molaritet zavisi od njegovog kapaciteta, UV apsorpcije, rastvorljivosti i stabilnosti. Jon-par

reagensi se dodaju mobilnoj fazi kako bi se obezbedila dodatna retencija ili selektivnost za analite suprotnog naelektrisanja. Za bazne analite obično se koriste alkilsulfonati dugog lanca, a za kisele tetraalkilamonijum soli [49, 50].

Retencioni hromatografski parametri karakteristični za svaki pik na hromatogramu su:

- retenciono vreme analita, t_r
- retenciono vreme mobilne faze, t_0
- redukovano retenciono vreme, t_r'

$$t_r' = t_r - t_0 \quad (4.)$$

- širina pika na baznoj liniji ili određenoj visini u odnosu na baznu liniju, w
- retencioni faktor ili faktor kapaciteta, k

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (5.)$$

Retenciono vreme se koristi za identifikaciju pika i zavisi od protoka mobilne faze, dimenzije kolone i drugih faktora. Redukovano retenciono vreme je retenciono vreme analita normalizovano za retenciono vreme mobilne faze. Faktor kapaciteta (ili retencioni faktor, k) je parameter dužine zadržavanja analita na koloni. Kod većine analiza vrednosti ovog parametra kreću se u intervalu $1 \leq k \leq 20$. Kada se pikovi analita eluiraju pri visokim k vrednostima (> 20) ukazuju na predugo vreme trajanja analize.

Parametri hromatografskog sistema koji karakterišu efikasnost razdvajanja dva jedinjenja su selektivnost, α i rezolucija, R_s . Selektivnost predstavlja odnos faktora kapaciteta dva susedna pika (jednačina 6.) i kada je veći od 1 smatra se da je postignuto zadovoljavajuće razdvajanje.

$$\alpha = \frac{k_{i+1}}{k_i} \quad (6.)$$

Sa druge strane, rezolucija predstavlja količnik razlike retencionih vremena dva susedna pika i srednje vrednosti njihovih širina na baznoj liniji (jednačina 7.). R_s vrednosti veće od 1,5 pokazuju da je postignuto razdvajanje na baznoj liniji. Međutim, za većinu analiza ciljana vrednost je $R_s > 2$ čime se omogućava robusnije razdvajanje i kvantifikovanje ispitivanih supstanci [50].

$$R_s = \frac{t_{i+1} - t_i}{\left(\frac{w_{i+1} + w_i}{2}\right)} \quad (7.)$$

Broj teoretskih platoa (N) je kvantitativna mera efikasnosti hromatografske kolone i predstavlja odnos retencionog vremena, t_r i standardne devijacije širine pika na baznoj liniji, σ . Pošto širina pika na baznoj liniji, w odgovara 4σ , broj teoretskih platoa se može izračunati na sledeći način:

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_r}{w}\right)^2 \quad (8.)$$

Asimetrija pika (A_s) je parametar koji se takođe koristi za definisanje osobina kolone. U idealnom slučaju $1 \leq A_s \leq 1.2$, obično u intervalu $0.9 \leq A_s \leq 1.4$ [50], ali se zadovoljavajućim vrednostima smatra i kada je $0.5 \leq A_s \leq 2$ [46]. Kada je $A_s = 1$, govorimo o simetričnom, odnosno piku sa Gausovom raspodelom. Međutim, u realnosti pikovi nisu idealno simetrični, već pokazuju određen stepen asimetrije (engl. *tailing/fronting*). Asimetrija pika se izračunava kao odnos širine pika na 5% njegove visine i dvostruke vrednosti rastojanja između vodeće ivice (engl. *leading edge*) i centralne tačke (engl. *midpoint*) pika na 5% njegove visine, kako sledi:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (9.)$$

1.2.3. Validacija HPLC metode za analizu nečistoća

Pod validacijom analitičkih postupaka podrazumeva se proces kojim se pokazuje da je metoda pouzdana i da odgovara nameravanoj primeni. Sve metode koje se koriste za analizu aktivnih supstanci i farmaceutskih proizvoda tokom njihovog razvoja moraju biti validirane. Pouzdani rezultati za puštanje uzoraka za klinička ispitivanja, ispitivanje stabilnosti i definisanje roka upotrebe jedino se mogu dobiti validiranim metodama [51]. Kriterijumi za validaciju analitičkih postupaka definisani su odgovarajućim smernicama [52, 53]. Parametri koji se procenjuju zavisi od vrste metode i njene namene, zatim vrste uzorka koji se analizira, količine ispitivane supstance u uzorku i vrste ispitivanja koje se sprovodi (identifikacija, određivanje sadržaja, itd.). U postupku validacije metode za kvantitativnu analizu nečistoća ispituju se linearnost, opseg, limit detekcije, limit kvantifikacije, tačnost, preciznost, selektivnost/specifičnost i robusnost. Na taj način se potvrđuje da se postavljenom metodom dobijaju tačni, precizni i pouzdani rezultati.

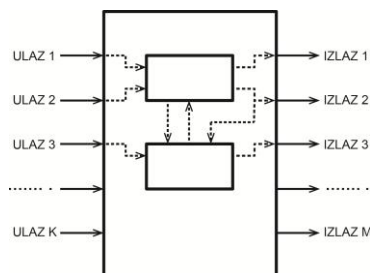
Validacija metoda izvodi se na osnovu unapred pripremljenih validacionih protokola i kriterijuma za procenu rezultata. Nakon završene validacije dobija se metoda za rutinsko izvođenje analize nečistoća u aktivnim supstancama i farmaceutskim proizvodima, a za potrebe ispitivanja stabilnosti.

1.2.4. Literaturni podaci

U literaturi je opisan veliki broj RP-HPLC postupaka za analizu nečistoća u sirovinama i farmaceutskim proizvodima, sa izokratskim [54, 55] ili gradijentim eluiranjem mobilne faze [56-63]. Stres ispitivanjem pod različitim uslovima potvrđena je primenljivost metoda za potrebe ispitivanja stabilnosti [54, 56-62].

1.3. Eksperimentalni dizajn

Klasičan pristup izvođenja eksperimenata podrazumeva ispitivanje uticaja jedne promenljive na ponašanje sistema (engl. *one-variable-at-a-time*, OVAT), dok se ostale promenljive ne menjaju. Na ovaj način, međutim, nije moguće utvrditi eventualno postojanje interakcija između promenljivih. Eksperimentalni dizajn, sa druge strane, omogućava istovremenu procenu većeg broja faktora koji mogu uticati na sistem, kao i prepoznavanje njihovog značaja i međusobnih interakcija [64, 65]. Takođe, na osnovu prikupljenih podataka omogućeno je razumevanje svojstava nekog sistema. Svaki sistem se posmatra kao celina koja se sastoji od tri osnovna elementa: ulaznih informacija (engl. *input*), transformacija koje se dešavaju unutar celine (engl. *transforms*) i izlaznih informacija (engl. *output*), kako je prikazano na Slici 2 [66].



Slika 2. Sistem sa prikazom odnosa između osnovnih elemenata

Ulazni parametri (faktori) su kvalitativne ili kvantitativne promenljive koje mogu uticati na sistem. Intenzitet ulaznog parametra označava se kao nivo. Izlazni parametri (odgovori) su kvalitativne ili kvantitativne promenljive koje se prate kako bi se dobile informacije o ponašanju sistema pod uticajem ulaznih parametara. Procesi koji obrađuju ulazne parametre predstavljaju vezu između ulaznih i izlaznih parametara tj. faktora i odgovora sistema [66].

Eksperimentalni dizajn se primenjuje u mnogim granama industrije, uključujući i farmaceutsku industriju. Područje primene uključuje razvoj formulacije, optimizaciju proizvodnog procesa, optimizaciju analitičkih postupaka, preliminarna ispitivanja (engl. *screening*) radi identifikacije važnih faktora, kao i ispitivanje robustnosti metoda i proizvoda [67,68]. Preliminarna ispitivanja izvode se na samom početku eksperimentalnog modelovanja, a njihov cilj je da se istraži veći broj faktora i utvrdi da li oni utiču na odgovore sistema, kao i da se definišu odgovarajući opsezi tih faktora. U ovoj fazi postavlja se pitanje da li je faktor važan. Nakon preliminarnih ispitivanja, eksperimentalno modelovanje se izvodi radi optimizacije metode. Cilj ovih

eksperimenata je da se predvide odgovori svih mogućih kombinacija faktora u okviru eksperimentalnog domena i identifikuju optimalni eksperimentalni uslovi, koji često predstavljaju kompromis između delimično suprotstavljenih uticaja pojedinih faktora. Pitanje koje se u ovoj fazi postavlja je koliko je faktor važan, a odgovor bi trebalo da pokaže da li je veza između faktora i odgovora pozitivna ili negativna. Takođe, odgovor bi trebalo da otkrije prirodu njihovog odnosa (linearna, kvadratna, itd.). Cilj ispitivanja robustnosti metode ili procesa je da se potvrdi da su neosetljivi na male fluktuacije faktora ili da se u slučaju nerobustnosti razumevanjem uticaja faktora njihovom promenom dođe do robustne metode ili procesa.

Osnovna prednost primene eksperimentalnog dizajna je to da omogućava organizovan pristup rešavanju nekog problema, nezavisno od stepena njegove složenosti. Na taj način se dobija korisnija i preciznija informacija o analiziranom sistemu usled istovremene procene uticaja većeg broja faktora.

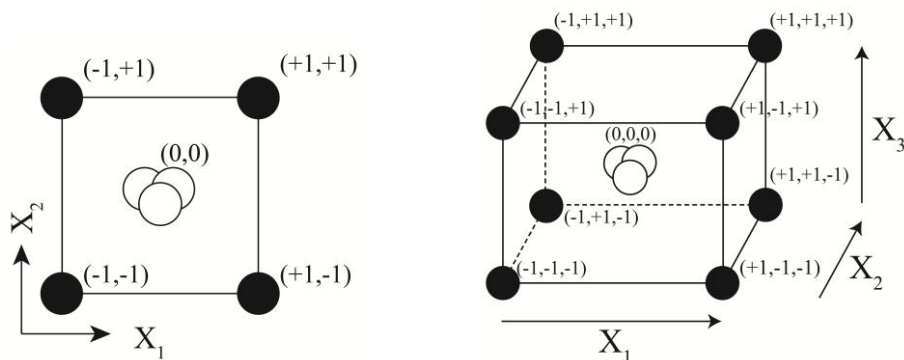
1.3.1. Faktorski i kompozitni dizajn ispitivanja

Definisanje faktorskog dizajna podrazumeva sledeće korake:

1. Odabir faktora – predstavlja važnu fazu u eksperimentalnom dizajnu. Potencijalno značajni faktori se biraju na osnovu sagledavanja svih faktora koji mogu uticati na odgovor sistema ili na osnovu preliminarnih eksperimenata. Odabrani faktori se uključuju u eksperimentalni dizajn, dok se ostali faktori ne menjaju. Faktori mogu biti kontrolisani, oni koji se lako istražuju ili nekontrolisani, koji se teško regulišu, ali mogu imati uticaja na sistem. Takođe, faktori mogu biti kvantitativni, ukoliko se menjaju po kontinuiranoj skali, ili kvalitativni, koji predstavljaju kategorične promenljive sa diskretnim vrednostima.
2. Odabir nivoa faktora – je zapravo odabir opsega vrednosti odabranih značajnih faktora, odnosno graničnih vrednosti u eksperimentu. Tokom preliminarnih ispitivanja koriste se širi opsezi u poređenju sa optimizacijom. Za odabir nivoa faktora je važno iskustvo eksperimentatora.
3. Odabir odgovora – definisan je ciljem eksperimenta i može biti kvantitativan tj. numerička vrednost ili kvalitativan. Kvalitativne odgovore takođe treba klasifikovati u nekoliko nivoa.

Preliminarni eksperimenti se izvode primenom punog faktorskog dizajna (engl. *Full Factorial Design*, FFD) ili u slučaju velikog broja faktora primenom frakcionog faktorskog dizajna (engl. *Fractional Factorial Design*). Pun i frakcioni eksperimentalni dizajn ispituje svaki faktor na dva nivoa, a pored toga ima i centralnu eksperimentalnu tačku. Na ovaj način procenjuje se značaj uticaja odabranih faktora ili faktorskih interakcija na sistem. Primenom punog faktorskog dizajna istražuju se sve granične vrednosti analiziranih faktora. Broj faktora koji se ispituju obično se označava sa n , a broj nivoa odabranih faktora sa k , pa je ukupan broj eksperimenata za FFD k^n .

Najjednostavniji oblik faktorskog dizajna je onaj u kome se dva faktora ispituju na dva nivoa, pa ukupan broj eksperimenata koje treba izvesti iznosi 4, odnosno 2^2 . Osim toga, u centru eksperimentalnog domena u tzv. centralnoj tački izvodi se još tri do pet eksperimenata kojima se procenjuje eksperimentalna greška i smanjuje rizik nelinearnog odnosa u centru ispitivanog intervala. Geometrijski se ovaj tip eksperimentalnog dizajna može prikazati kao kvadrat gde svaka tačka u prostoru faktora predstavlja jedan eksperiment (Slika 3a). Pun faktorski dizajn u kome se ispituje uticaj tri faktora na dva nivoa sastoji se od ukupno 2^3 , odnosno 8 eksperimenata. Preporuka je da se njima dodaju i eksperimenti u centralnoj tački. Eksperimentalni prostor ovog dizajna se geometrijski prikazuje kao kocka u kojoj svaka tačka predstavlja jedan eksperiment (Slika 3b).



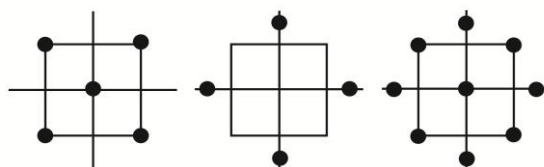
a) b) **Slika 3.** Eksperimenti faktorskog dizajna a) 2^2 i b) 2^3 sa centralnom tačkom

Prilikom razvoja faktorskog dizajna svakom faktoru se dodeljuje donja i gornja granična vrednost. Obično se donja granična vrednost nekog faktora označava sa -1 ili samo -, a gornja sa +1 ili samo +. Nivo faktora u centralnoj eksperimentalnoj tački označava se sa 0 (Slika 3).

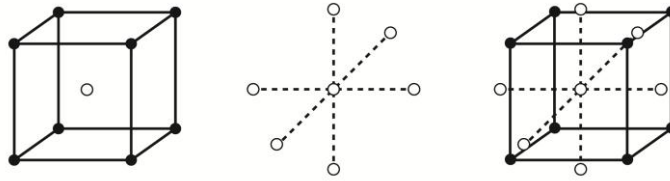
Primena punog faktorskog dizajna izvodljiva je kada se ispituje uticaj dva do četiri faktora na dva nivoa. U slučajevima kada je broj faktora pet ili više, primena punog faktorskog dizajna zahteva izvođenje velikog broja eksperimenata, što nije praktično i ekonomski opravdano. Iz tog razloga se u ovim slučajevima primenjuje frakcioni faktorski dizajn. Frakcioni faktorski dizajn predstavlja dizajn u kome se istražuje deo graničnih vrednosti analiziranih faktora i on se takođe primenjuje tokom preliminarnih ispitivanja, ali i tokom ispitivanja robustnosti.

Za procese optimizacije obično se koristi kompozitni dizajn koji pored graničnih vrednosti analiziranih faktora, ponovljenih eksperimenata u centralnoj tački, obuhvata i eksperimente zvezda dizajna (engl. *axial experiments*). U kompozitnom dizajnu svaki faktor se ispituje na tri do pet nivoa. U poređenju sa preliminarnim eksperimentima odabir faktora i odgovora je jednostavniji, s obzirom da su u ovoj fazi već identifikovani faktori koji značajno mogu uticati na odgovore sistema. Takođe, u ovom slučaju se odnos između faktora i odgovora ispituje primenom kvadratnog regresionog modela.

Centralni kompozitni dizajn predstavlja nadogradnju punog i frakcionog eksperimentalnog dizajna na dva nivoa. Razlikujemo CCC (engl. *Central Composite Circumscribed*) i CCF (engl. *Central Composite Face-centered*) dizajn. CCC dizajn sastoji se od graničnih, faktorskih eksperimenata na dva nivoa, simetrično raspoređenih eksperimenata koji čine zvezdu i ponovljenih eksperimenata u centralnoj tački. Na taj način se svaki od faktora ispituje na pet nivoa. Karakteristika CCC dizajna je da se eksperimenti koji čine zvezdu nalaze izvan opsega graničnih vrednosti. Takođe, kod dizajna sa dva faktora se granični i eksperimenti koji čine zvezdu nalaze na kružnici čiji je poluprečnik 1,41, dok se kod dizajna sa tri faktora nalaze na površini lopte poluprečnika 1,682 (Slika 4 i Slika 5).

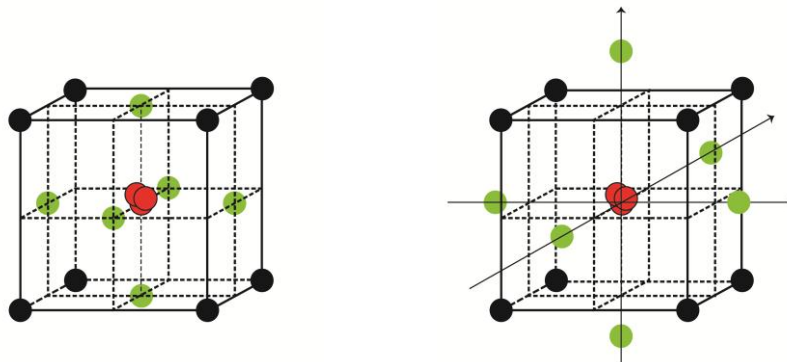


Slika 4. Eksperimenti CCC dizajna sa dva faktora



Slika 5. Eksperimenti CCC dizajna sa tri faktora

CCF dizajn, sa druge strane, ispituje svaki faktor na tri nivoa i u slučaju tri faktora sadrži eksperimente koji predstavljaju centralne tačke na stranicama kocke (Slika 6). U ovom slučaju eksperimentalni prostor je kocka, a ne lopta. CCF se smatra standardnim dizajnom koji podržava kvadratni regresioni model [67].



Slika 6. Eksperimenti CCF i CCC dizajna sa tri faktora

Podaci dobijeni eksperimentalnim dizajnom analiziraju se korišćenjem kompjuterskih metoda tj. izračunavanjem regresionog modela primenom metode najmanjih kvadrata. Kada se analiza metodom najmanjih kvadrata primenjuje na modelovanje uticaja većeg broja faktora, govorimo o primeni višestruke linearne regresije (engl. *Multiple Linear Regression*, MLR). Za opisivanje odnosa između faktora i povezivanje informacija o promenama faktora sa informacijama o promenama odgovora obično se koriste polinomijalne funkcije.

Razlikujemo tri osnovna polinomijalna modela koja se najčešće koriste: linearni (jednačina 10.), model interakcije (jednačina 11.) i kvadratni model (jednačina 12.). Odabir odgovarajućeg modela zavisi od cilja eksperimenta, pa se tako na pr. kod optimizacija koriste kvadratni modeli, a u preliminarnim istraživanjima modeli interakcije, itd.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \varepsilon \quad (10.)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \varepsilon \quad (11.)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \varepsilon \quad (12.)$$

gde su:

x_1, x_2, \dots, x_i - faktori,

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_i$ - koeficijenti regresionog modela,

ε - rezidua tj. odstupanje modelovanja

y - odgovor sistema.

Koeficijenti regresionog modela pokazuju uticaj pojedinih faktora. Njihove vrednosti odgovaraju polovini odgovarajuće procene efekta.

Kada se prati uticaj više faktora na jedan odgovor sistema oni se međusobno povezuju formiranjem jednog modela, sa jednim setom regresionih koeficijenata. Sa druge strane, ukoliko se kao rezultat uticaja više faktora prate promene nekoliko odgovora sistema (na pr. M), tada se za opisivanje međusobnog odnosa među njima formira M modela i M setova regresionih koeficijenata.

Analiza varijanse, ANOVA, predstavlja alat koji se koristi za procenu regresionog modela i eksperimentalnog dizajna, odnosno načina na koji je opisan odnos između faktora i odgovora sistema. Za kvantifikaciju varijabilnosti koristi se zbir kvadrata (engl. *Sum of Squares*, SS). ANOVA omogućava podelu ukupne varijanse izabranog odgovora sistema na dve komponente, jednu koja potiče od regresionog modela i drugu koja potiče od rezidua (jednačina 13.).

$$SS_{\text{total corrected}} = SS_{\text{regression}} + SS_{\text{residual}} \quad (13.)$$

gde je:

$SS_{\text{total corrected}}$ - ukupna varijansa odgovora korigovana za prosečnu vrednost

$SS_{\text{regression}}$ - varijansa koja se može modelovati

SS_{residual} - varijansa koja se ne može modelovati

Za model kažemo da je dobar ukoliko mu je varijacija koja se može modelovati ($SS_{\text{regression}}$) velika, a ona koja se ne može modelovati (SS_{residual}) mala. Takođe, varijacija koja se ne modeluje može da se podeli na varijaciju koja potiče od nesavršenosti modela ($SS_{\text{model error}}$) i varijaciju do koje dolazi prilikom ponavljanja eksperimenata tzv. eksperimentalnu nesigurnost ($SS_{\text{replicate error}}$).

$$SS_{\text{residual}} = SS_{\text{model error}} + SS_{\text{replicate error}} \quad (14.)$$

U idealnom slučaju $SS_{\text{model error}}$ i $SS_{\text{replicate error}}$ su male i slične veličine.

Numeričke vrednosti ovih varijansi porede se primenom F-testa. Prvi F-test poredi $SS_{\text{regression}}$ pri broju stepeni slobode (d.f. = P-1) sa SS_{residual} pri broju stepeni slobode (d.f.= N-P), gde je P broj koeficijenata u jednačini regresionog modela, a N ukupan broj eksperimenata uključujući ponavljanja. Između dve varijanse postoji statistički značajna razlika kada je $p < 0,05$. Drugi F-test poredi $SS_{\text{model error}}$ pri broju stepeni slobode (d.f.=F-P) i $SS_{\text{replicate error}}$ pri broju stepeni slobode (d.f. = N-F), gde je F broj kombinacija eksperimenata u eksperimentalnom dizajnu. Drugi F-test se zove *lack-of-fit* test i služi za procenu validnosti modela. Kada je vrednost greške modela niska i model dobro opisuje eksperimentalne podatke, za takav model kažemo da nema *lack-of-fit*. U ovim situacijama $p > 0,05$.

ANOVA test daje procenu i drugih indikatora performansi modela, kvadrata koeficijenta korelacije R^2 , kvadrata koeficijenta korelacije prilagođenog ukupnom broju eksperimenata, R^2_{adj} (engl. *goodness of fit*) i sposobnosti modela za predviđanje, Q^2 (engl. *goodness of prediction*). Kvadrat koeficijenta korelacije, R^2 , ukazuje na mogućnost modela da dobro opiše eksperimentalno dobijene podatke, dok Q^2 pokazuje sposobnost modela da predviđa nove eksperimentalne podatke. Dobar model ima visoke vrednosti R^2 i Q^2 , koje se približavaju jedinici, kao i razliku $R^2 - Q^2 < 0,2-0,3$.

Eksperimenti koji pripadaju grupi centralnog kompozitnog dizajna, kao i Box-Behnken ili pun faktorski dizajn na tri nivoa, pripadaju grupi dizajna površine odgovora (engl. *Response Surface Methodology, RSM*). U pitanju su tipovi eksperimentalnog dizajna koji omogućavaju uspostavljanje kvadratne funkcionalne zavisnosti između faktora i odgovora tj. čija procena podrazumeva primenu kvadratnog modela.

RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika koje se koriste tokom razvoja, poboljšanja ili optimizacije procesa. Njihova primena obuhvata sledeće korake: izbor faktora koji će se analizirati, a čiji je značaj utvrđen preliminarnim ispitivanjima, izbor odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna i izvođenje eksperimenata, matematičko-statističku procenu podataka, procenu adekvatnosti modela i dobijanje optimalnih vrednosti za svaki parametar na osnovu grafičkog prikaza [69-71].

Površine odgovora predstavljaju grafički prikaz odgovora sistema u funkciji ispitivanih faktora. Najčešće se uticaj dva faktora prikazuje kao površina u trodimenzionalnom prostoru. Ovo omogućava sagledavanje njihovog uticaja na odgovor sistema i pronalaženje optimalnih uslova.

1.3.2. Funkcije hromatografskog odgovora

Funkcije hromatografskog odgovora (engl. *Chromatographic Response Functions*, CRF) su matematički alati koji omogućavaju objektivno, numeričko sagledavanje kvaliteta hromatografske metode. Primenjuju se sa ciljem da se olakša razvoj i optimizacija hromatografskih metoda, naročito prilikom analize smeša većeg broja supstanci, gde postoji mogućnost preklapanja pikova, kao na primer u slučaju analize organskih nečistoća srodnih aktivnoj supstanci. Primenom ovih funkcija se pored razdvajanja komponenata, procenjuju i druge karakteristike metode kao što su ukupno vreme trajanja analize, simetrija pika, itd. omogućavajući tako objektivnu analizu. Do danas je razvijen veći broj funkcija hromatografskog odgovora [72-80], odnosno formulisane su različite jednačine koje definišu kvalitet hromatograma. Svaka od njih ima određene prednosti i ograničenja koja treba razmotriti pre odabira za potrebe optimizacije, posebno zbog toga što razlike u matematičkom pristupu mogu dovesti do značajnih razlika u proceni hromatograma.

Većina funkcija hromatografskog odgovora sastoji se iz člana koji procenjuje razdvajanje i člana koji procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize. Pojedine CRF koje su dizajnirane za analizu višekomponentnih smeša sadrže i član koji meri broj supstanci koje se eluiraju. Dodatno, većina hromatografskih funkcija sadrži i težinske faktore koji prate navedene članove. Na taj način se kreiranju funkcije koje su prilagodljive različitim problemima, jer se analitičaru omogućava da definiše svoja očekivanja u vezi sa problemom koji rešava.

Hromatografska funkcija (CRF), koju je uveo Beridž (engl. *Berridge*) [72], procenjuje kvalitet razdvajanja prema sledećoj jednačini:

$$CRF = \sum_{i=1}^L R_i + L^{w_1} - w_2 |T_A - T_L| - w_3 |T_1 - T_0| \quad (15.)$$

gde je R_i – rezolucija između i -tok pik para, L – broj parova pikova, T_A – specificirano vreme analize, T_L – retenciono vreme poslednjeg pika, T_1 – retenciono vreme prvog pika, T_0 – definisano minimalno retenciono vreme, w_1 : 2, w_2 : 1, w_3 : 0.5.

Beridžova funkcija je prva funkcija hromatografskog odgovora koja je razvijena u literaturi. Sastoji se iz četiri člana: prvi procenjuje kvalitet razdvajanja sabirajući faktore

rezolucije ($\sum_{i=1}^L R_i$), drugi procenjuje broj pikova koji su se pojavili na hromatogramu (L), treći procenjuje ukupnu dužinu trajanja analize ($T_A - T_L$) i četvrti procenjuje retenciono vreme prvog pika koji se pojavio na hromatogramu ($T_1 - T_0$). Na osnovu jednačine može se zaključiti da u seriji analiza rađenih primenom eksperimentalnog dizajna, najveću CRF vrednost imaće hromatogram sa najbolje razdvojenim pikovima analiziranih jedinjenja.

Jedan od nedostataka ove hromatografske funkcije je to što loše razdvojeni pikovi ne utiču mnogo na njenu vrednost, već se kvalitet hromatograma određuje dobro razdvojenim pikovima. Takođe, razdvajanje na baznoj liniji je pouzdano ukoliko pikovi imaju oblik Gausove krive, dok se u slučaju asimetričnih pikova teško određuje factor rezolucije [81]. Međutim, ukoliko se CRF-funkcijom obuhvati samo razdvajanje pikova koji nisu dobro razdvojeni, CRF postaje važan parameter pri optimizaciji metoda u tačnoj hromatografiji [82].

Hromatografska eksponencijalna funkcija (engl. *Chromatographic Exponential Function*, CEF) koju je prvi primenio Moris (engl. *Morris*) [74] izračunava se prema sledećoj jednačini:

$$CEF = \left[\left(\sum_{i=1}^{n-1} (1 - e^{a(R_{opt} - R_i)})^2 \right) + 1 \right] \left[1 + \frac{t_f}{t_{max}} \right] \quad (16.)$$

gde je R_{opt} – optimalna rezolucija za i -ti pik par (maksimalno dobijena R_i vrednost je korišćena kao optimalna rezolucija i -tog pik para), R_i - rezolucija između i -tog pik para, T_A – specificirano vreme analize, T_L – retenciono vreme poslednjeg pika, t_{max} – maksimalno prihvatljivo vreme, t_f – retenciono vreme poslednjeg pika, a : 3.

Eksponencijalna funkcija sadrži dva člana: prvi koji procenjuje razdvajanje

$$\left(\left(\sum_{i=1}^{n-1} (1 - e^{a(R_{opt} - R_i)})^2 \right) + 1 \right)$$

i drugi koji procenjuje dužinu trajanja analize $\left(1 + \frac{t_f}{t_{max}} \right)$. Jednačina pokazuje da će u seriji analiza rađenih primenom eksperimentalnog dizajna najmanju vrednost imati hromatogram sa najbolje razdvojenim pikovima ispitivanih jedinjenja. Prednost ove hromatografske funkcije je to što nema nedefinisanih tačaka i manji akcenat se stavlja na vreme trajanja analize u odnosu na rezoluciju.