

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

MIRALEM M. SMAJIĆ

**ODREĐIVANJE STRUKTURE  
FARMAKOFORE ANTAGONISTA  
ANGIOTENZINSKIH AT<sub>1</sub> RECEPTORA  
I HEMOMETRIJSKI PRISTUP  
OPTIMIZACIJI HPLC METODE ZA  
ODREĐIVANJE LOSARTANA,  
VALSARTANA I IRBESARTANA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

MIRALEM M. SMAJIĆ

**IDENTIFICATION OF  
PHARMACOPHORE OF AT<sub>1</sub> RECEPTOR  
ANTAGONISTS AND CHEMOMETRIC  
APPROACH IN HPLC METHOD  
OPTIMIZATION FOR DETERMINATION  
OF LOSARTAN, VALSARTAN AND  
IRBESARTAN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

MENTOR:

---

dr sc. Zorica Vujić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

---

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

---

dr sc. Lejla Begić, redovni profesor  
Univerzitet u Tuzli, BiH, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za farmaceutsku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Želim da izrazim svoju zahvalnost svima koji su mi pomogli u izradi ove doktorske disertacije.*

*Prije svega, želim da se zahvalim svom mentoru, prof. dr Zorici Vujić na izboru teme, povjerenju koje mi je ukazano i na slobodi koju sam imao u naučno-istraživačkom radu. Svojoj profesorici sam zahvalan i na svim životnim lekcijama koje me pokušavala naučiti prethodnih godina. Posebno sam zahvalan na nemjerljivom motivisanju u radu, te velikom doprinosu u naučnom, profesionalnom i ličnom usavršavanju.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Katarini Nikolić na podršci, mnogobrojnim savjetima, idejama, te velikoj pomoći u izradi eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr Lejli Begić na svesrdnoj pomoći i korisnim savjetima tokom završne izrade doktorske disertacije, te podršci u konstantnom radu od vremena dok sam još bio student.*

*Hvala mojoj Lejli, mojoj porodici, roditeljima, rodbini, prijateljima koji su na razne načine doprinijeli ovoj disertaciji.*

**ODREĐIVANJE STRUKTURE FARMAKOFORE ANTAGONISTA  
ANGIOTENZINSKIH AT<sub>1</sub> RECEPTORA I HEMOMETRIJSKI PRISTUP  
OPTIMIZACIJI HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE LOSARTANA,  
VALSARTANA I IRBESARTANA**

**REZIME**

AT<sub>1</sub> receptori posreduju u skoro svim poznatim fiziološkim djelovanjima angiotenzina II (Ang II): u kardiovaskularnim, bubrežnim, nervnim, endokrinim ćelijama, jetrenim i drugim ciljnim ćelijama. Ta djelovanja uključuju regulaciju arterijskog krvnog pritiska, održavanje balansa vode i elektrolita, žeđ, lučenje hormona i bubrežnu funkciju. AT<sub>2</sub> receptori se nalaze u srži nadbubrežne žlijezde, maternici i u tkivu fetusa. Pretpostavlja se da ovi receptori igraju ulogu u razvoju fetusa i nisu bitnije uključeni u kontrolu krvnog pritiska. Vezujući se za AT<sub>1</sub> receptor Ang II izaziva konformacijske promjene u molekuli receptora što dovodi do interakcije receptora sa G proteinom i prenosa signala preko nekoliko transmembranskih sistema (enzimski sistemi, naponski ovisni kalcijevi kanali, itd.).

Antagonisti angiotenzina II imaju 10.000 puta veći afinitet vezivanja za AT<sub>1</sub> receptore nego za AT<sub>2</sub> receptore (visokoselektivni blokatori AT<sub>1</sub> receptora). Blokatorima AT<sub>1</sub> receptora pripadaju: losartan, valsartan, irbesartan, kandesartan, eprosartan, telmisartan i olmesartan ("sartani"). Svi antagonisti AT<sub>1</sub> receptora su jedinjenja slične hemijske strukture koju karakteriše prisustvo bifenila sa kiselom funkcionalnom grupom (karboksilna ili tetrazol). Glavna primjena je u liječenju hipertenzije, dijabetičke nefropatije i kongestivnog zatajenja srca, gdje se koriste samostalno ili u kombinaciji sa diureticima i drugim antihipertenzivima.

U cilju dizajniranja novih AT<sub>1</sub> blokatora primijenjena je kompjuterska metoda. *3D-QSAR* studija je izvedena korištenjem baze podataka od 49 AT<sub>1</sub> blokatora od kojih je 32 služilo kao trening set, a 17 kao test set. Za razvoj *3D-QSAR* modela i odabir najznačajnijih

molekulskih deskriptora primijenjena je metoda PLS regresije (*Partial Least Squares regression*). Dobiveni rezultati su pokazali da kreirani *3D-QSAR* model dobro predviđa aktivnost jedinjenja trening seta, te je model dalje korišten za predviđanje pKi vrijednosti test seta. Uz pomoć Pentacle programa određeno je 10 najznačajnijih varijabli koje utiču na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora. Validirani *3D-QSAR* model je, zatim, korišten za određivanje pKi vrijednosti 30 novodizajniranih molekula. Zaključeno je da su pet predloženih molekula ChEMBL (1513-7, 1513-15, 92950-7, 92950-8, 92950-9) najaktivniji kao potencijalni blokatori AT<sub>1</sub> receptora. Rezultati su pokazali da aktivnost molekule raste ako je ciklopropilna grupa vezana za ugljik na poziciji između atoma azota u imidazolnom prstenu (R1). Na istoj poziciji alkilni lanac sa karbonilnom grupom, također, pozitivno utiče na aktivnost molekule (ChEMBL 1513). Sa druge strane, ciklopropilna grupa u strukturi ChEMBL 92950 na poziciji R2 smanjuje aktivnost molekule. Može se zaključiti da molekule sa najvećom aktivnošću imaju dvije jednostavne alkilne grupe kao supstituente.

Prisutnost nekoliko funkcionalnih grupa u molekularnoj strukturi ispitivanih blokatora angiotenzinskih receptora, kao što su bifenilna i imidazol, čini RP-HPLC metodu pogodnom za određivanje njihovog sadržaja u farmaceutskim oblicima. Za optimizaciju HPLC metode za istovremeno određivanje (1) losartana i hidrohlorotiazida, (2) irbesartana i hidrohlorotiazida i (3) valsartana, hidrohlorotiazida i amlodipina korištena je metodologija eksperimentalnog dizajna.

Retenciono ponašanje molekula ispitano je hemometrijskim pristupom. Kako su linearne funkcije posmatranih odgovora imale različite ciljeve, za dalju optimizaciju je korištena Derringerova funkcija poželjnosti. Nakon određivanja ukupne poželjnosti u okviru prihvatljivih granica, ustanovljeni su optimalni hromatografski uslovi za izvođenje eksperimenata.

Predložene metode su validirane. Procesom validacije dokazano je da su specifične, tačne, precizne, ponovljive i ne zahtijevaju puno vremena za analizu. Kako ne postoje interferencije sa drugim komponentama prisutnim u dozirnim oblicima, izvođenje metoda

ne zahtijeva složene postupke ekstrakcije. Rezultati pokazuju da predložene HPLC metode mogu biti korištene za rutinsku kvantitativnu analizu ispitivanih supstanci u mješavini ili za njihovo pojedinačno određivanje u farmaceutskim doziranim oblicima.

**Ključne riječi:** AT<sub>1</sub> blokatori, farmakofore, 3D-QSAR, hemometrijski pristup, eksperimentalni dizajn, HPLC, optimizacija.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

**UDK broj:** 615.225:543.544:001.091.5(043.3)

**IDENTIFICATION OF PHARMACOPHORE OF AT<sub>1</sub> RECEPTOR  
ANTAGONISTS AND CHEMOMETRIC APPROACH IN HPLC METHOD  
OPTIMIZATION FOR DETERMINATION OF LOSARTAN, VALSARTAN AND  
IRBESARTAN**

**ABSTRACT**

AT<sub>1</sub> receptors mediate almost all known physiological effects of angiotensin II (Ang II): cardiovascular, renal, nervous, endocrine cells, liver and other target cells. These actions include blood pressure regulation, balance of water and electrolytes maintaining, thirst, hormone secretion and renal function. AT<sub>2</sub> receptors are found in the adrenal gland, uterus and fetal tissue. It is assumed that these receptors play a role in fetal development. AT<sub>2</sub> are not substantially involved in blood pressure control. Binding with AT<sub>1</sub> receptor Ang II causes a conformational change of the receptor molecules resulting in receptor - G proteins interaction and signal transmission through several transmembrane systems (enzyme systems, voltage dependent calcium channels, etc.). Angiotensin II antagonists show 10.000 times greater binding affinity for the AT<sub>1</sub> receptor than AT<sub>2</sub> receptors; they are highly selective for AT<sub>1</sub> receptor. Angiotensin II antagonists include: losartan, valsartan, irbesartan, candesartan, eprosartan, telmisartan and olmesartan ("sartans"). Chemical structures of AT<sub>1</sub> receptor antagonists are similar and consist of biphenyl group and an acidic functional group (carboxylic or tetrazole). Angiotensin II receptor blockers are primarily used for the treatment of hypertension, diabetic nephropathy, congestive heart failure. They are used alone or in combination with other antihypertensive drugs and diuretics.

In order to design new AT<sub>1</sub> blockers computerized methods were applied. The *3D-QSAR* study was performed on a data set composed of 49 ARBs with 32 AT<sub>1</sub> blockers in the training set and 17 AT<sub>1</sub> blockers in the test set. The PLS regression has been applied on selection of the most relevant molecular descriptors and *3D-QSAR* models building. Obtained results demonstrated good predicting capacity of the created *3D-QSAR* model for



the training set molecules and model was further used to predict the pK<sub>i</sub> values of the test set. Ten most important variables that influence the activity (positively and negatively) were selected from the Pentacle program. A validated *3D-QSAR* model was used in determining the pK<sub>i</sub> values of the 30 new molecules. It turned out that five molecules ChEMBL (1513-7, 1513-15, 92950-7, 92950-8, and 92950-9) possess the highest activity. Results showed that: if the cyclopropyl group is linked to carbon situated between the two nitrogen atoms in the imidazole ring (R1), molecule activity increases; an alkyl chain with a carbonyl group in the same place also contributes positively to the activities of the molecule (ChEMBL 1513). On the other hand, the cyclopropyl group in the ChEMBL 92950 structure at the position R2 decreases molecular activity. The highly potent molecule has two simple alkyl groups as substituents.

The presence of functional groups in the molecular structure of the examined angiotensin receptor blockers, like biphenyl and imidazole, makes RP-HPLC method suitable for their analysis in the pharmaceutical forms. Experimental design methodology was used for optimization of HPLC method for the simultaneous determination of (1) losartan and hydrochlorothiazide, (2) of irbesartan and hydrochlorothiazide, and (3) of valsartan, amlodipine and hydrochlorothiazide.

The chemometric methodology chosen for the particular objectives was very successful in the retention behavior exploration. Since there were a mix of linear responses with different targets, Derringer's desirability function was applied. After defining a global desirability according to the accepted constraints, optimal chromatographic conditions were established.

The proposed methods were validated. From the study of validation parameters, it was observed that the methods are specific, accurate, precise, reproducible, and is not time-consuming. Since there was no interference from other components present in the dosage forms, complicated procedures for extraction were not required. The obtained results show

that the proposed HPLC methods can be used for the routine quantitative analysis of the examined substances in a mixture or for their individual determination in pharmaceutical dosage forms.

**Keywords:** AT<sub>1</sub> blockers, pharmacophore, *3D-QSAR*, chemometric approach, experimental design, HPLC, optimization.

**Science Field:** Pharmaceuticals

**Narrow scientific field:** Pharmaceutical and medical chemistry and structural analysis

**UDK number:** 615.225:543.544:001.091.5(043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. HIPERTENZIJA.....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Uloga sistema renin-angiotenzin u regulaciji krvnog pritiska .....	4
1.1.2. Djelovanje angotenzina II .....	5
1.1.3. GPCR receptori .....	6
1.1.4. Receptori angiotenzina II – AT <sub>1</sub> receptori .....	8
<b>1.2. BLOKATORI ANGIOTENZINSKIH (AT<sub>1</sub>) RECEPTORA .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Razvoj nepeptidnih AT <sub>1</sub> blokatora .....	10
1.2.2. Losartan, Valsartan i Irbesartan.....	14
1.2.3. Molekule koje se koriste u kombinovanoj terapiji sa AT <sub>1</sub> blokatorima .....	16
<b>1.3. ISPITIVANJE ODNOSA STRUKTURE I AKTIVNOSTI MOLEKULA ...</b>	<b>18</b>
<b>1.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA POD VISOKIM PRITISKOM - HPLC .....</b>	<b>22</b>
1.4.1. Hromatografija na normalnim fazama .....	23
1.4.2. Hromatografija na obrnutim fazama.....	24
<b>1.5. HEMOMETRIJSKI PRISTUP OPTIMIZACIJI HPLC METODE .....</b>	<b>24</b>
1.5.1. Eksperimentalni dizajn.....	24
1.5.2. Vrste eksperimentalnog dizajna .....	28
1.5.3. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja.....	30
<b>1.6. 3D-QSAR STUDIJA AT<sub>1</sub> BLOKATORA.....</b>	<b>31</b>
<b>1.7. HPLC ODREĐIVANJE BLOKATORA AT<sub>1</sub> RECEPTORA .....</b>	<b>33</b>
1.7.1. HPLC određivanje Irbesartana i Hidrohlorotiazida.....	33
1.7.2. HPLC određivanje Losartana i Hidrohlorotiazida.....	33
1.7.3. HPLC određivanje Valsartana, Amlodipina i Hidrohlorotiazida .....	34
<b>2. CILJ RADA.....</b>	<b>35</b>

---

<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. 3D-QSAR STUDIJA.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2. HPLC ODREĐIVANJE IRBESARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA.....</b>	<b>44</b>
3.2.1. Reagensi i hemikalije.....	44
3.2.2. Aparatura.....	44
3.2.3. Hromatografski uslovi .....	44
3.2.4. Definisanje metode .....	44
3.2.5. Priprema osnovnog rastvora (stock otopina).....	45
3.2.6. Priprema rastvora za analizu .....	45
3.2.7. Kalibraciona kriva .....	45
3.2.8. Preciznost metode.....	45
3.2.9. Tačnost metode.....	45
3.2.10. Postupak HPLC analize .....	46
<b>3.3. HPLC ODREĐIVANJE LOSARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA .....</b>	<b>46</b>
3.3.1. Aparati i softver.....	46
3.3.2. Hemikalije i reagensi .....	47
3.3.3. Priprema rastvora standarda.....	47
3.3.4. Rastvori uzoraka.....	47
3.3.5. Postupak HPLC analize .....	47
<b>3.4. HPLC ODREĐIVANJE VALSARTANA, HIDROHLOROTIAZIDA I AMLODIPINA.....</b>	<b>48</b>
3.4.1. Aparati i softveri.....	48
3.4.2. Hemikalije i reagensi .....	48
3.4.3. Priprema rastvora standarda.....	48
3.4.4. Rastvor uzorka.....	49
3.4.5. Postupak HPLC analize .....	49
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1. 3D-QSAR STUDIJA BLOKATORA AT<sub>1</sub> RECEPTORA.....</b>	<b>51</b>
4.1.1. Kreiranje i validacija 3D-QSAR modela blokatora AT <sub>1</sub> receptora.....	51

---

4.1.2. Određivanje farmakofora blokatora AT <sub>1</sub> receptora .....	54
4.1.3. Dizajniranje novih blokatora AT <sub>1</sub> receptora .....	63
<b>4.2. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE IRBESARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA.....</b>	<b>65</b>
4.2.1. Odabir parametara optimizacije i analiza strukture .....	65
4.2.2. Analiza uticaja faktora na hromatografske parametre .....	69
4.2.3. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode .....	83
4.2.4. Validacija HPLC metode za određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida ..	88
4.2.4.1. Linearnost.....	89
4.2.4.2. Preciznost metode .....	90
4.2.4.3. Tačnost metode.....	92
4.2.4.4. Selektivnost metode.....	93
4.2.4.5. Robusnost metode.....	93
<b>4.3. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE LOSARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA.....</b>	<b>94</b>
4.3.1. Analiza strukture molekula i primjena eksperimentalnog dizajna .....	94
4.3.2. Određivanje faktora optimizacije HPLC metode .....	96
4.3.3. Uticaj faktora na retencione osobine molekula .....	99
4.3.4. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode .....	100
4.3.5. Validacija HPLC metode za određivanje hidrohlorotiazida i losartana ...	101
<b>4.4. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE VALSARTANA, HIDROHLOROTIAZIDA I AMLODIPINA .....</b>	<b>103</b>
4.4.1. Analiza strukture i jonizaciona stanja molekula.....	103
4.4.2. Optimizacija HPLC uslova .....	105
4.4.3. Određivanje faktora i njihov uticaj na retencione karakteristike .....	107
4.4.3.1. Statistička obrada rezultata.....	109
4.4.3.2. Grafička obrada rezultata .....	111
4.4.4. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode .....	116
4.4.5. Validacija HPLC metode za određivanje hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana .....	122

<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>124</b>
<b>6. REFERENCE .....</b>	<b>128</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>147</b>
<b>8. BIOGRAFIJA .....</b>	<b>150</b>

# 1. UVOD

## 1.1. HIPERTENZIJA

Hipertenzija (povišeni arterijski pritisak) je jedan od vodećih faktora rizika za nastajanje hroničnih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih oboljenja. Oko 50% svih slučajeva infarkta miokarda i oko 60% svih cerebrovaskularnih inzulta su posljedica povišenog krvnog pritiska. Zbog asimptomatske prirode, hipertenzija se često naziva "tihi ubica". Cilj terapije hipertenzije je prevencija fatalnih posljedica - iznenadna smrt, infarkt miokarda i cerebrovaskularni inzult. Brojna klinička ispitivanja pokazuju da snižavanje dijastolnog pritiska samo za 5-6 mm Hg smanjuje rizik od nastanka cerebrovaskularnog inzulta za jednu trećinu, a koronarnih komplikacija za jednu šestinu [1]. Krvni pritisak je sila kojom cirkulišuća krv djeluje na jedinicu površine krvnog suda, a koja nastaje usljed kontrakcija srčane muskulature i posljedičnog potiskivanja krvi kroz vaskularni sistem. Visina krvnog pritiska zavisi od minutnog volumena srca (kontraktilnosti miokarda, frekvence srčanog rada i volumena krvi) i perifernog otpora u krvnim sudovima. Vrijednost pritiska je promjenljiva i nastaje kao posljedica aktiviranja brojnih mehanizama kojima organizam pokušava da održi odgovarajući protok krvi u zavisnosti od trenutnih potreba organizma [2].

Hipertenziju je teško definisati zato što ne postoji jasna granica između onog što se može smatrati "bezbijednim" nivoom (ili normalnim krvnim pritiskom) i nivoa iznad kojeg prijeti rizik. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji i Internacionalnom udruženju za hipertenziju, kao povišen, definiše se onaj krvni pritisak kod koga je sistolni pritisak 140 mmHg ili viši i/ili nivo dijastolnog krvnog pritiska od 90 mmHg ili više (u ponovljenim mjerenjima). Hipertenzija može biti:

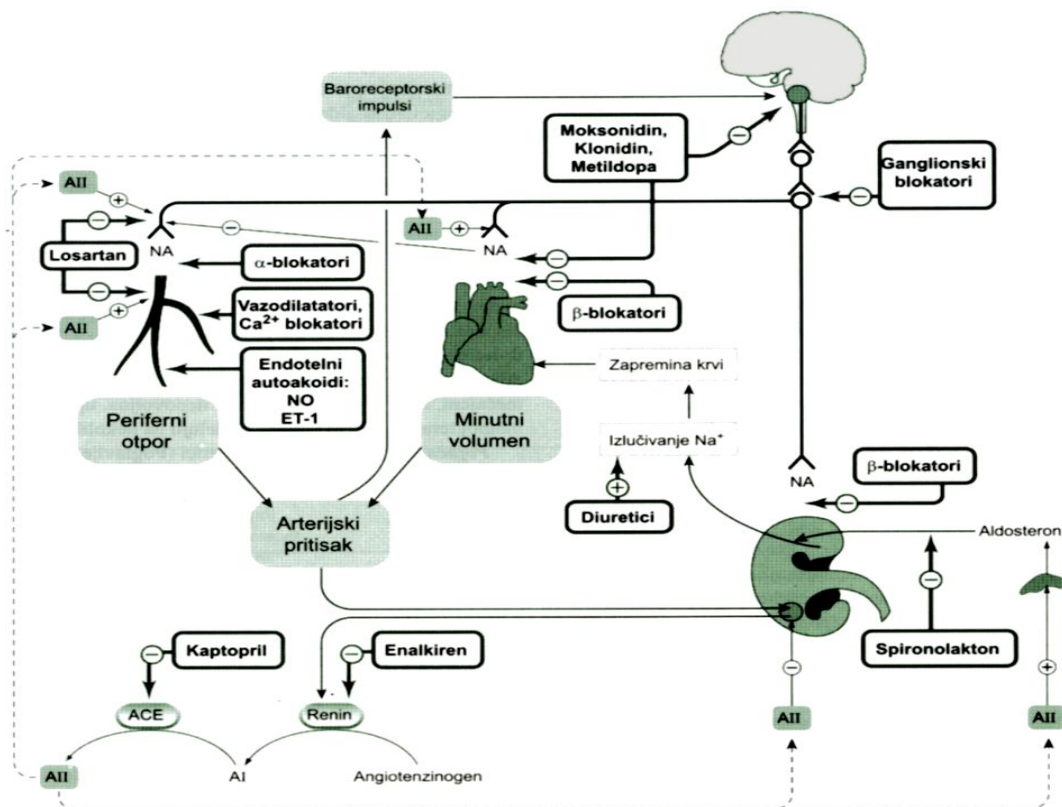
- Primarna (esencijalna ili idiopatska) hipertenzija - nepoznatog je porijekla (95%), povišen nivo krvnog pritiska je uslovljen starošću, polom, rasom, okruženjem, životnim stilom i genetskim faktorima;
- sekundarna hipertenzija - prisutna kod 5% hipertenzivnih pacijenata, može biti posljedica bubrežnih oboljenja (sužavanje bubrežnih arterija, parenhimska bubrežna oboljenja i policistični bubrežni), sistemske skleroze, endokrinih



oboljenja (Kušingov sindrom, Konov sindrom, dijabetes melitus), tumora (feohromocitom, akromegalija, hiperparatireodizam itd.).

Krvni pritisak je strogo kontrolisana fiziološka veličina. Glavni mehanizmi uključeni u regulaciju arterijskog krvnog pritiska su (Slika 1):

- Dominantna simpatikusna kontrola;
- Uloga  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\alpha$  adrenergičkih receptora;
- Uloga bubrega (renin-angiotenzin sistem).



**Slika 1.** Glavni mehanizmi uključeni u regulaciju krvnog pritiska (Preuzeto i prilagođeno: Vujić Z. Antihipertenzivni lekovi, 2014) [3]

Antihipertenzivi su lijekovi koji se koriste za liječenje povišenog krvnog pritiska. Pored antihipertenziva, u terapiji se koriste i jedinjenja koja po ATC klasifikaciji pripadaju drugim farmakoterapijskim grupama, ali pokazuju antihipertenzivno djelovanje (antihipertenzivi u „širem smislu“).

Optimalni cilj kontrole hipertenzije jeste smanjenje sistolnog pritiska na  $\leq 140$  mmHg i dijastolnog pritiska na  $\leq 90$  mmHg, mjereno u ljekarskoj ordinaciji. Kod pacijenata sa dijabetesom, oštećenjem bubrega ili utvrđenom kardiovaskularnom bolešću ovi zahtjevi su strožiji.

Liječenje hipertenzije i odabir lijekova zavisi od više faktora, prije svega od uzroka hipertenzije. Ukoliko dominira povećanje sistolnog pritiska (povećan gornji, a donji relativno normalan) do hipertenzije dolazi zbog povećanog perifernog otpora krvnih sudova pa treba koristiti lijekove koji dovode do vazodilatacije. Ukoliko je značajno povišen dijastolni pritisak u odnosu na sistolni, treba koristiti lijekove koji smanjuju ukupni volumen krvi (diuretici). Odabir lijekova zavisi i od eventualno prisutnog komorbiditeta (dijabetes, angina pectoris, astma, hiperlipidemija, reumatske bolesti i dr.) [4]. U liječenju hipertenzije primjenjuje se princip "korak po korak". Inicijalni tretman hipertenzije započinje se diuretikom ili antagonistima  $\beta$  receptora. Na osnovu novih kliničkih rezultata, lista preporučenih lijekova za inicijalnu antihipertenzivnu terapiju je proširena tako da uključi inhibitore angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE), antagoniste  $AT_1$  receptora i blokatore kalcijumskih kanala. Ne postoji opšte pravilo ni uputstvo koje govori koji lijek će biti uveden u terapiju i kada. Kombinovanje antihipertenzivnih lijekova je vrlo složeno i pri tome se mora voditi računa o mogućim neželjenim interakcijama. Zbog toga je pristup liječenju hipertenzije izrazito individualan [5].

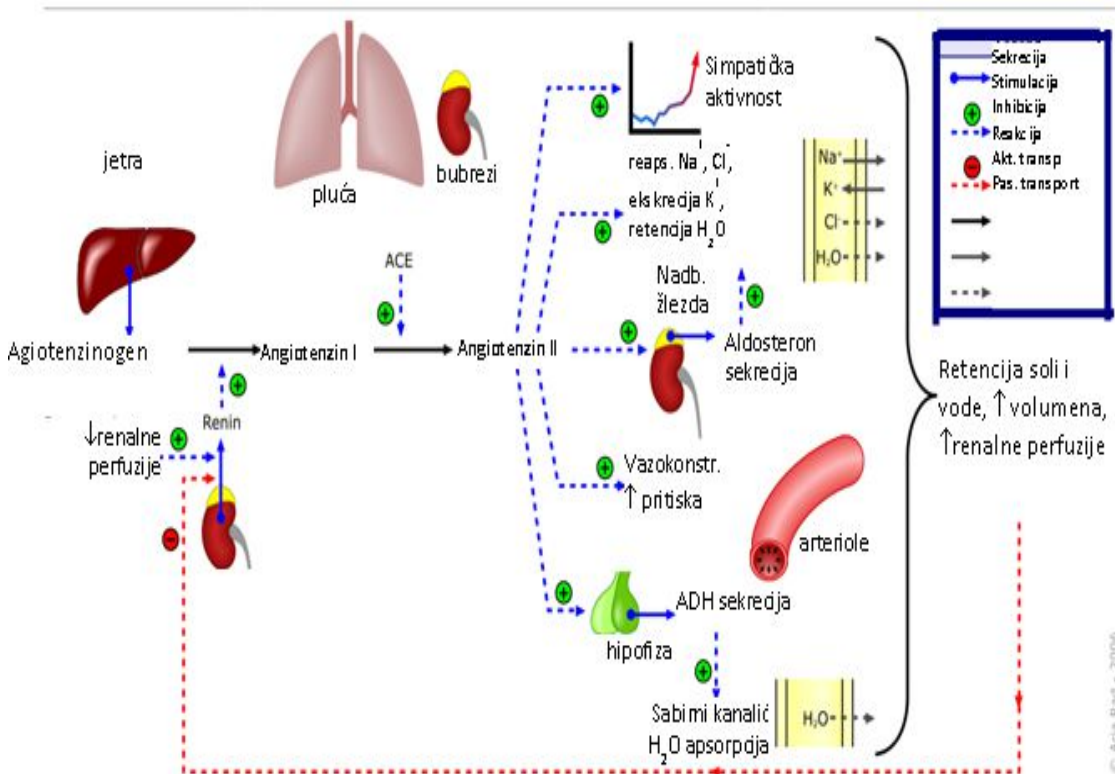
### 1.1.1. Uloga sistema renin-angiotenzin u regulaciji krvnog pritiska

Renin-angiotenzin sistem (RAS) je fundamentalni fiziološki mehanizam regulacije arterijskog pritiska i jedan od mehanizama kojim bubrezi učestvuju u kontroli krvnog pritiska. Renin je proteolitički enzim koji se nalazi u jukstaglomerularnim ćelijama bubrega, u neaktivnom obliku, proreninu. Kada dođe do smanjenja renalne perfuzije oslobađa se renin koji djeluje na glikoprotein angiotenzinogen (u jetri) hidrolizujući peptidnu vezu između aminokiselina leucina i valina pri čemu nastaje dekaeptid, angiotenzin I. Biološka uloga angiotenzina I nije potvrđena, mada neki autori smatraju da može da pokazuje blago vazokonstriktorno dejstvo.

U krvnim sudovima pluća, iz angiotenzina I, pod uticajem angiotenzin - konvertujućeg enzima (ACE), odvajaju se dvije aminokiseline i nastaje oktapeptid, angiotenzin II. Angiotenzin II ima značajnu ulogu u povećanju krvnog pritiska. U nadbubrežnoj žlijezdi angiotenzin II se pretvara u angiotenzin III koji podstiče lučenje aldosterona. Dio angiotenzina II se pretvara u angiotenzin IV koji efekte ostvaruje putem svojih receptora. Angiotenzin II ima kratak poluživot, svega 1-2 minuta i brzo se razgrađuje djelovanjem enzima angiotenzina (peptidaza) [6].

### 1.1.2. Djelovanje angotenzina II

Angiotenzin II pokazuje jako vazokonstriktorno dejstvo koje je naročito izraženo u arteriolama i znatno manje u venama. Vazokonstrikcijom arteriola povećava se periferni otpor, a time i arterijski pritisak. Na nivou bubrega angiotenzin II povećava reapsorpciju vode i natrijuma i stimuliše lučenje aldosterona u nadbubrežnoj žlijezdi zbog čega se ovaj sistem često zove renin-angiotenzin-aldosteron sistem (RAAS).



**Slika 2.** Renin-angiotenzin-aldosteron sistem (preuzeto i prilagođeno:

[https://sr.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotenzin\\_sistem](https://sr.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotenzin_sistem)) [7]

Glavni mehanizam angiotenzina II u reapsorpciji natrijuma je stimulacija  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pumpe i kontratransporta  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  u proksimalnom dijelu renalnih tubula. Sva dejstva angiotenzina koja se ostvaruju putem  $\text{AT}_1$  receptora su [8]:

- Vazokonstriktorno (putem vazokonstrukcije arteriola i povećanjem nadražajnog praga baroreceptora);
- Povećanje aktivnosti simpatikusa;
- Povećanje osjećaja žeđi;
- Podstiče izlučivanje antidiuretičnog i adenokortikotropnog hormona;
- Djeluje na  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATP -azu u bazolateralnoj membrani proksimalnih i distalnih tubula, henleovoj petlji i sabirnim kanalićima.
- Djeluje na  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  - izmjenjivač na luminalnoj membrani i na  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  kotransport u bazolateralnoj membrani što dovodi do reapsorpcije natrijuma, hlora, retencije vode i izlučivanje kalijuma.
- Povećava izlučivanje aldosterona iz kore nadbubrežne žlezde (Slika 2).

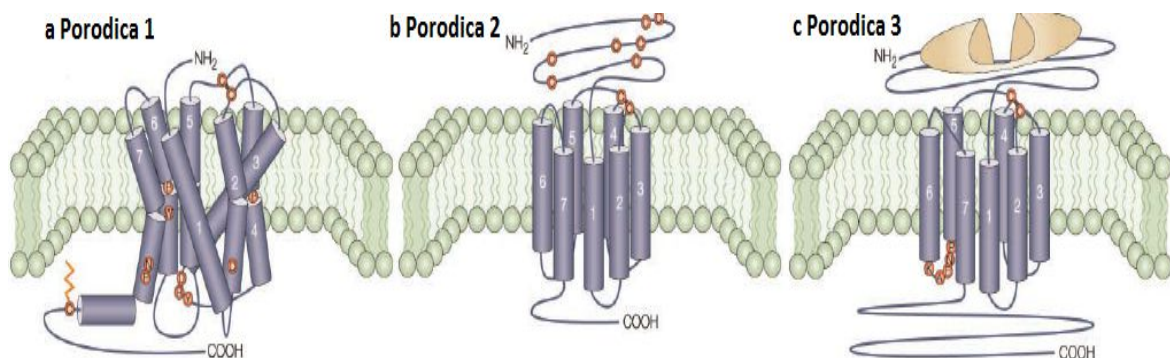
### 1.1.3. GPCR receptori

Najbrojniju klasu membranskih ćelijskih receptora čine G-protein vezani receptori (GPCR), koji su kodirani sa preko 1.000 gena u ljudskom genomu [8]. GPCR receptori usmjeravaju signal kroz širok opseg efektoru, a aktiviraju se raznim ligandima uključujući hormone, peptide, aminokiseline, jone, fotone svjetlosti. Ovi receptori odrađuju mnoge zadatke u centralnom nervnom sistemu (CNS) i periferiji. Mutacije i polimorfizmi u GPCR-ima vezani su za brojne bolesti i poremećaje [9,10], pa su GPCR meta za veliki broj terapijskih agenasa. Skoro jedna četvrtina od 200 najprodavanijih lijekova u 2000. godini, modulira aktivnost GPCR, a procjenjuje se da 50% novorazvijenih modernih lijekova djeluje tako što modulira aktivnost GPCR [11]. GPCR mogu biti podijeljeni na osnovu homologije sekvence u nekoliko porodica [12,13]. Iako svi GPCR imaju sličnu građu sa sedam  $\alpha$  ovojnica, koje se prožimaju kroz ćelijsku membranu, GPCR porodice ne pokazuju homologiju u sekvenci, ukazujući da one mogu biti filogenetski nesrodne i da sličnost struktura njihovih transmembranskih domena (TM) može biti samo ispunjenje uobičajenih funkcionalnih zahtjeva.

Tradicionalno, mehanizam vezivanja liganda i transdukcija signala GPCR receptorima, modeliran je na pretpostavci da monomerni receptori učestvuju u procesima. Dakle, samo monomerni model za GPCR bio je načelno prihvaćen, uprkos činjenici da je za mnoge druge klase receptora (kao što je receptor tirozin-kinaza) poznato da je konstitutivna ili oligomerizacija inducirana ligandom neophodna za prenos signala [14].

GPCR mogu biti podijeljeni filogenetski u šest porodica. Na Slici 3 prikazana je shematska prezentacija receptora monomera koja pokazuje neke ključne strukturne aspekte tri glavne porodice. *Porodica 1* (a, porodica slična rodopsinu) je do sada najveća podgrupa i sadrži receptore za mirise, male molekule (kao što su kateholamini i amini), neke peptide i glikoproteinske hormone. Receptore *porodice 1* karakteriše nekoliko ponavljajućih aminokiselina, te disulfidni mostovi koji spajaju prvu i drugu vanćelijsku petlju (ECL).

Većina ovih receptora ima palmitoilatni cistein (postranslacijska modifikacija u kojoj je palmitinska kiselina spojena na rezidualni cistein sa tioesterskom vezom) u karboksilnom terminusu. Određivanje kristalne strukture rodopsina ukazuje da su transmembranski domeni (TM) *porodice 1* nagnuti i svijeni kako je prikazano na Slici 3. *Porodicu 2* (b) karakteriše relativno dug N – terminalni dio koji sadrži nekoliko cisteinskih ostataka, koji vjerovatno formiraju mrežu disulfidnih mostova. Njihova morfologija je slična nekim receptorima iz *porodice 1*, ali nemaju zajedničku homologiju sekvence. Na primjer, *porodica 2* sadrži disulfidni most između ECL1 i ECL2, ali nedostaje palmitoilacija, prolina su drukčiji od prolina iz *porodice 1*, a odsutna je i DRY (deskriptor hidrofobne interakcije) farmakofora susjedstva aspartata, arginina, tirozina sa TM3.

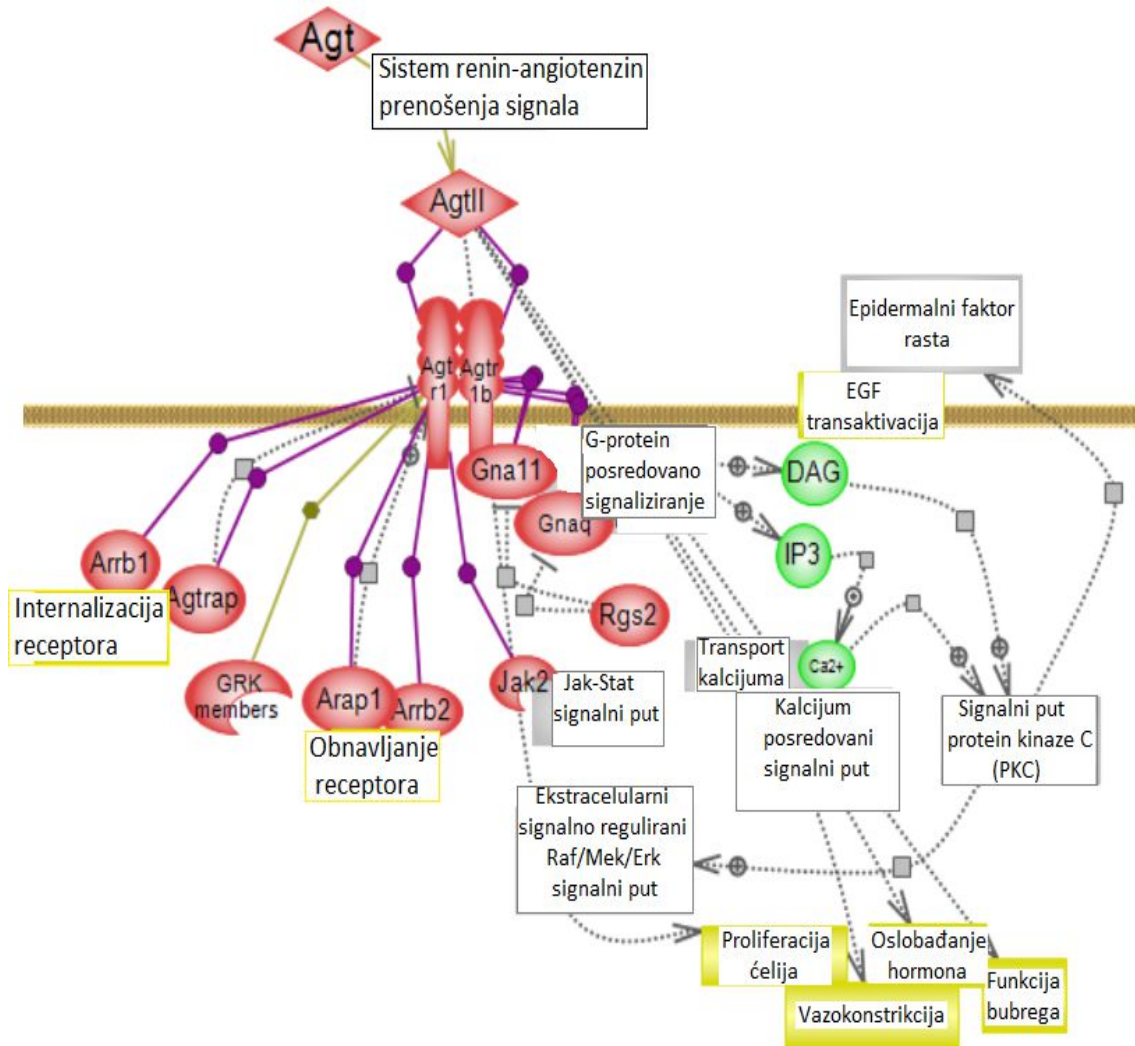


Slika 3. Shematski prikaz GPCR receptora kao monomera [15]

Orijentacija TM domena je malo poznata, ali se pretpostavlja da je drugačija od onog u rodopsinu. Ligandi za *porodicu 2* GPCR uključuju hormone, kao što je glukagon, gonadotropin-oslobađajući hormon i paratireoidni hormon. *Porodicu 3 (c)* čine receptori osjetljivi na  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\gamma$ -aminobuternu kiselinu ( $\text{GABA}_B$ ). Ove receptore karakteriše dugi N terminalni dio, čiji se izgled često opisuje kao biljka “*Venerina muholovka*“. Osim dva ostatka cisteina u ECL1 i ECL2 koji formiraju sulfidni most, *porodica 3* nema neke od ključnih karakteristika sličnih *porodici 1 i 2*. Jedinstvena karakteristika *porodice 3* je da je treća intracelularna petlja, kratka i visoko ponovljiva. Iako je struktura amino terminusa dobro karakterizirana, slično kao i za *porodicu 2*, malo se zna o orijentaciji TM domena.

#### 1.1.4. Receptori angiotenzina II – AT<sub>1</sub> receptori

Angiotenzin II receptori su članovi superfamilije G-protein vezanih membranskih receptora. Identifikovana su četiri podtipa angiotenzinskih receptora, AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, AT<sub>3</sub> i AT<sub>4</sub> receptori [16-18]. Vezivanje angiotenzina II za AT<sub>1</sub> receptore dovodi do oslobađanja vazopresina, aldosterona, endotelina, pojačava aktivaciju simpatikusa, stimulira reapsorpciju natrija, povećava kontraktilnost miokarda [19-21]. Kako AT<sub>1</sub> podtip ima direktan uticaj na održavanje krvnog pritiska, tako su funkcije AT<sub>1</sub> receptora povezane sa patofiziologijom hipertenzije, disbalansom vode i elektrolita, hiperaldosteronizmom, srčanom hipertrofijom i srčanom insuficijencijom. AT<sub>1</sub> receptor je intenzivno izučavan kao važno ciljno mjesto djelovanja novih antihipertenziva [22]. AT<sub>3</sub> i AT<sub>4</sub> receptori još uvijek nisu dobro okarakterisani, pretpostavlja se da su ovi receptori mjesto djelovanja angiotenzina IV (metabolit Ang II) i imaju ulogu u CNS-u i oslobađanju oksitocina. AT<sub>1</sub> receptori posreduju u skoro svim poznatim fiziološkim djelovanjima angiotenzina II (Ang II) u kardiovaskularnim, bubrežnim, nervnim, endokrinim ćelijama, jetrenim i drugim ciljnim ćelijama. Ta djelovanja uključuju regulaciju arterijskog krvnog pritiska, održavanje balansa vode i elektrolita, žeđi, lučenja hormona i bubrežne funkcije (Slika 4). AT<sub>2</sub> receptori se nalaze u srži nadbubrežne žlijezde, maternici i u tkivu fetusa. Pretpostavlja se da ovi receptori vjerovatno igraju ulogu u razvoju fetusa i nisu bitnije uključeni u kontrolu krvnog pritiska [21].



**Slika 4.** Signalni putevi i efekti posredovani AT<sub>1</sub> receptorom (preuzeto i prilagođeno: <http://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway>) [26]

Vezujući se za AT<sub>1</sub> receptor, angiotenzin II izaziva konformacijske promjene u molekuli receptora što dovodi do interakcije receptora sa G proteinom i do prenosa signala preko nekoliko transmembranskih sistema (enzimski sistemi, naponski ovisni kalcijevi kanali, itd.) [23]. Antagonisti angiotenzina II su lijekovi koji se koriste u terapiji hipertenzije. Ovi lijekovi imaju 10.000 puta veći afinitet vezivanja za AT<sub>1</sub> receptore nego za AT<sub>2</sub> receptore tj. selektivni su blokatori AT<sub>1</sub> receptora. Blokatorima AT<sub>1</sub> receptora pripadaju losartan, valsartan, irbesartan, kandesartan, eprosartan, telmisartan i olmesartan. Uglavnom se radi o lijekovima slične hemijske strukture koju karakteriše prisustvo bifenila sa kiselim funkcionalnom grupom (karboksilna ili tetrazol) [24-26].

## 1.2. BLOKATORI ANGIOTENZINSKIH (AT<sub>1</sub>) RECEPTORA

Antagonisti angiotenzin II receptora, poznati i kao blokatori angiotenzinskih receptora (ARB), antagonisti AT<sub>1</sub> receptora ili sartani, su grupa lijekova koja modulira renin-angiotenzin-aldosteron sistem. Glavna primjena ovih lijekova je u liječenju hipertenzije (visokog krvnog pritiska), dijabetičke nefropatije (oštećenja bubrega zbog šećerne bolesti) i kongestivnog zatajenja srca [27,28]. Zbog strukturne sličnosti sa angiotenzinom II vežu se za AT<sub>1</sub> receptore, te djeluju antagonistički.

Antagonisti angiotenzin II receptora predstavljaju dobro poznatu klasu lijekova koji su se počeli upotrebljavati ranih 1980-ih. Mogu biti korišteni sami ili u kombinaciji sa drugim antihipertenzivima ili diureticima. Pored efekata snižavanja pritiska, AT<sub>1</sub> blokatori pokazuju efekat zaštite krvnih sudova i miokarda, promovišu regresiju lijeve ventrikularne hipertrofije i smanjuju kardiovaskularni morbiditet i mortalitet kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom ili hipertenzivnom dijabetičkom nefropatijom sa proteinurijom [21].

Postojeći vodiči za tretman hipertenzije fokusirani su na potrebu višestruke medikacije da bi se kod većine pacijenata postigao željeni krvni pritisak. Najčešće su za to potrebne dvije do tri različite klase antihipertenzivnih agenasa, što povećava rizik smanjene komplijance u terapiji. Stoga, kod pacijenata sa krvnim pritiskom koji je preko 20 mm Hg-stuba normalnog sistolnog pritiska ili preko 10 mm Hg-stuba normalnog dijastolnog pritiska, vodiči preporučuju kombinovanu terapiju. Posljednji napredak u terapiji je razvoj trostruke kombinacije lijekova koja se sastoji od blokatora AT<sub>1</sub> receptora, amlodipina i hidrohlorotiazida [29,30].

### 1.2.1. Razvoj nepeptidnih AT<sub>1</sub> blokatora

Osamdesetih godina prošlog vijeka javlja se značajan napredak u molekularnoj biologiji, teorijskoj i eksperimentalnoj hemiji i kompjuterskoj tehnologiji što je omogućilo sintezu i ispitivanje biološke aktivnosti novih lijekova. Ispitivanje korelacije molekularnih parametara koji se odnose na hemijsku strukturu i fizičko-hemijske osobine molekula i njihove biološke i farmakološke aktivnosti daje mogućnost



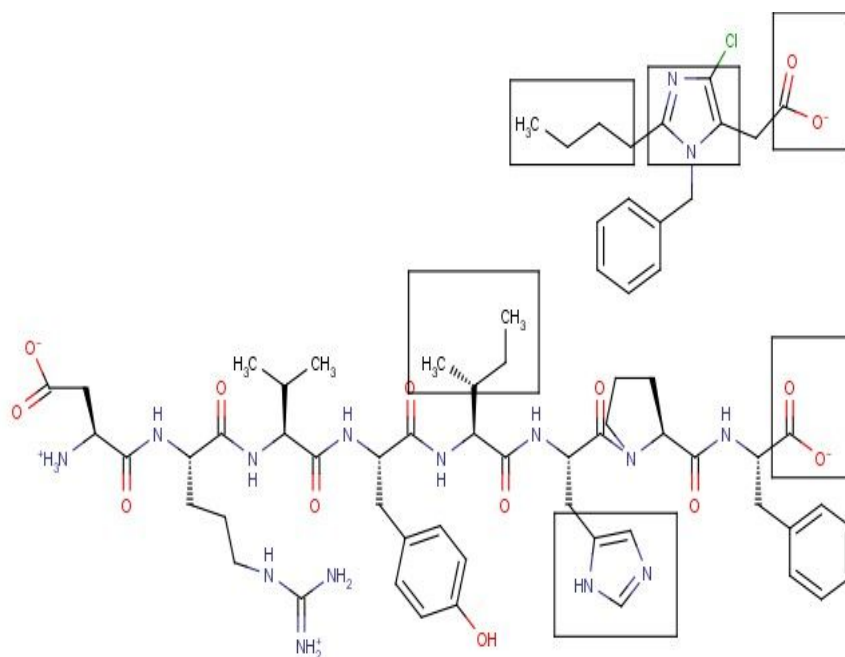
predviđanja strukturnih promjena molekula sa boljim farmakodinamskim i farmakokinetičkim osobinama u liječenju određenog oboljenja. Najznačajniji pomak u brzom predviđanju uticaja promjena strukture dala je upotreba kompjuterskih metoda u dizajniranju lijekova (*Computer-Aided Drug Design, CADD*) i mogućnost optimizacije osobina.

Napori za razvijanje antagonista AT<sub>1</sub> receptora su počeli 70-ih godina prošlog vijeka ispitivanjem peptidnih analoga prirodnih agonista. Ovo istraživanje je rezultiralo otkrićem saralazina, oktapeptida u kome su Asp<sup>1</sup>, Ile<sup>5</sup> i Phe<sup>8</sup> (ostaci angiotenzina II) zamijenjeni sa Ser<sup>1</sup>, Val<sup>5</sup> i Ala<sup>8</sup>. Saralazin je, kao i drugi peptidni analozi, pokazivao sposobnost da smanjuje krvni pritisak, međutim ove komponente su imale slabu bioraspodivnost nakon *per os* primjene, te su pokazivale djelimičnu agonističku aktivnost. Istraživanja su nastavljena ispitivanjem peptidomimetika što je urodilo plodom uvođenjem losartana kao prvog nepeptidnog blokatora AT<sub>1</sub> receptora 1995. godine.

Prva serija spojeva, koji su djelovali kao peptidomimetički blokatori AT<sub>1</sub> receptora, bili su derivati imidazol-5-acetatne kiseline. Predstavnik ove grupe je poznat kao S-8308 za kojeg se kasnije potvrdilo da specifično blokira receptore angiotenzina II (Slika 5). Ovi peptidomimetici su imali slabu antagonističku aktivnost, ali nisu posjedovali agonističke aktivnosti kao peptidni analozi.

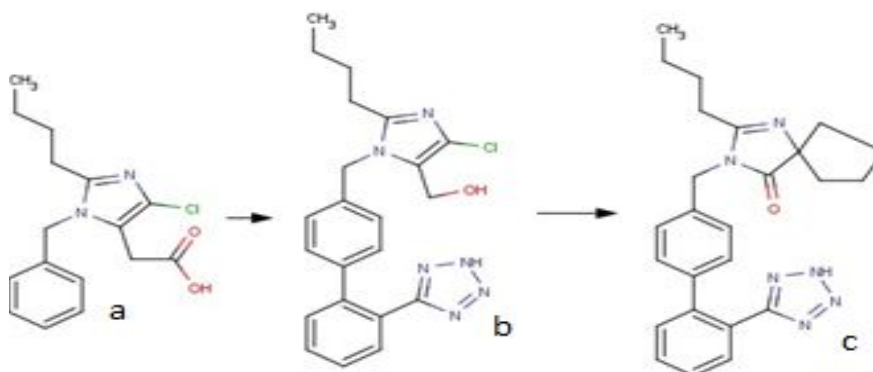
Kompjuterskim preklapanjem struktura S-308 i angiotenzina II otkrivaju se tri strukturne sličnosti:

- jonizovani karboksilat koji korelira sa C-terminalnim karboksilatom u strukturi angiotenzina II;
- imidazolni prsten koji korelira sa strukturom His<sup>6</sup>;
- n-butilna grupa koja korelira sa butilnom grupom Ile.



**Slika 5.** Strukturne sličnosti S-8308 sa molekulom angiotenzina II

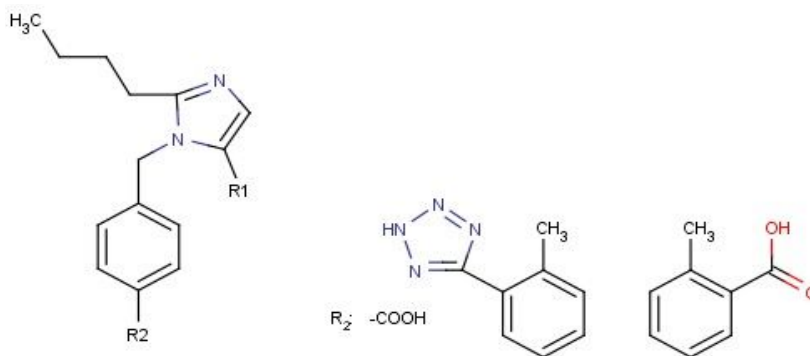
Na osnovnu strukturu S-8308 urađeno je mnoštvo strukturalnih modifikacija da bi se dobili postojeći blokatori  $AT_1$  receptora poznati kao sartani (Slika 6). Cilj modifikacija je bio da se poveća bioraspodjeljivost nakon *per os* primjene, te da se poveća vezivanje za receptor. Ove promjene rezultirale su otkrićem losartana, lijeka sa velikim afinitetom vezivanja za  $AT_1$  receptor i velikom bioraspodjeljivošću. Njegovom daljom strukturalnom modifikacijom dobiveni su ostali blokatori  $AT_1$  receptora (valsartan, irbesartan, olmesartan, telmisartan, kandesartan i eprosartan).



**Slika 6.** Strukturne modifikacije S-8308 (a) koje su dovele do nastanka losartana (b) i irbesartana (c)

Svi danas komercijalno dostupni blokatori AT<sub>1</sub> receptora pokazuju određenu sličnost u pogledu strukture. Neophodan strukturni uslov za djelovanje je da imaju:

- „Kiselu grupu“ koja je potrebna da bi oponašala fenolnu grupu tirozina na poziciji 4 ili Asp<sup>1</sup> karboksilat u strukturi angiotenzina II. Kisela grupa može biti karboksilna, fenil tetrazol ili fenil karboksilat;
- Kod jedinjenja koja u strukturi sadrže bifenilni radikal, tetrazol ili karboksilat moraju se nalaziti u *orto* poziciji;
- Prisutna n-butil grupa obezbjeđuje hidrofoban tip vezivanja za receptor i vjerovatno oponaša bočni lanac Ile<sup>5</sup> angiotenzina II; ona može biti zamijenjena etilnim eterom ili n-propilnom grupom;
- Imidazolni prsten ili izosterni ekvivalent je potreban da oponaša His<sup>6</sup> bočni lanac angiotenzina II;
- Supstituenti „R“ mogu varirati; pretpostavlja se da oni reaguju sa AT<sub>1</sub> receptorom preko jonskih, jon-dipol i dipol-dipol interakcija.



**Slika 7.** Opšta struktura blokatora angiotenzinskih receptora

Iako strukturno slični (Slika 7), antagonisti AT<sub>1</sub> receptora pokazuju različit farmakokinetički profil. Svi *sartani* se vezuju za proteine plazme u velikom procentu, ali se razlikuju po volumenu distribucije (10 L za kandesartan, 500 L za telmisartan). Većina lijekova se dozira jednom dnevno, iako se zbog svog kratkog poluživota losartan i eprosartan mogu dozirati dva puta dnevno.

Bioraspoloživost takođe varira, od 15% za kandesartan do 60% do 80% za irbesartan. Jedinjenja koja se eliminišu primarno renalnim putem, kao što su eprosartan i

kandesartan, imati će veće koncentracije u plazmi pacijenata sa oštećenom bubrežnom funkcijom, te niže doze mogu biti potrebne za postizanje istog farmakodinamičkog efekta kao kod pacijenata sa očuvanom renalnom funkcijom. Farmakokinetičke osobine antagonista AT<sub>1</sub> receptora su prikazane u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Farmakokinetičke osobine blokatora AT<sub>1</sub> receptora [31]

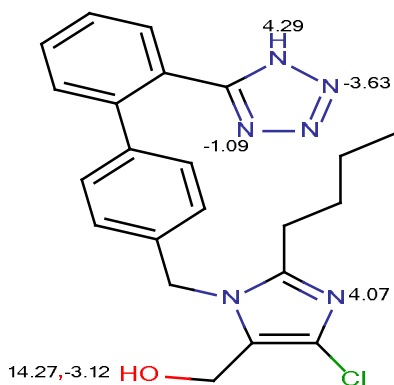
Lijek	Bioraspoloživost <i>per os</i> (%)	Aktivan metabolit	Vezivanje za proteine (%)	V <sub>max</sub> (h)	Poluvrijeme eliminacije (h)	Put eliminacije *
Kandesartan cileksetil	15	Kandesartan	99	3-4	9	b40%, r60%
Eprosartan	15	Nema	98	1-2	5-9	b10%, r90%
Irbesartan	60-80	Nema	90	1,5-2,0	11-15	b75%, r25%
Losartan	33	EXP-3147	98,7	1	1,5-2	b70%, r30%
Olmesartan medoksomil	26	Olmesartan	99	1,5-3	10-15	b60%, r40%
Telmisartan	42-58	Nema	100	5	24	b 100 %
Valsartan	25	Nema	95	2-4	6	b80%, r20%

\*b-bilijarni; r-renalni

Koncentracija u plazmi losartana i aktivnog metabolita EXP-3174 se smanjuje kada se primjenjuje zajedno sa rifampinom i drugim lijekovima koji indukuju citohrom P450 izoenzim 2C9. Flukonazol, koji inhibira 2C9, snižava koncentraciju aktivnog metabolita EXP-3174, ali povećava koncentraciju losartana. Klinički značaj ovih interakcija nije razjašnjen [32].

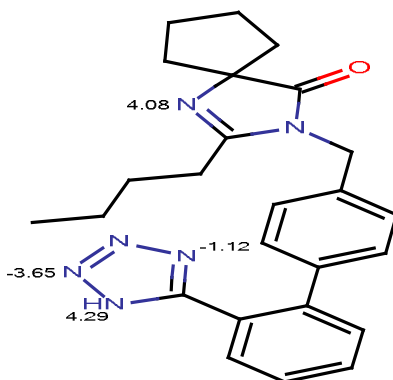
### 1.2.2. Losartan, Valsartan i Irbesartan

**Losartan** [LOS; 2-butyl-4-hloro-1-{[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil}-1H-imidazol -5-il)metanol; Slika 8] je blokator angiotenzin II receptora. Losartan je bio prvi oralni, nepeptidni sartan dugog dejstva za kliničko korištenje u liječenju. Pored osnovne strukture bifenila sa tetrazolom, strukturu karakteriše prisustvo imidazolovog prstena na koji je vezan butil radikal, metanol i hlor.



**Slika 8.** Strukturna formula losartana sa označenim  $pK_a$  vrijednostima

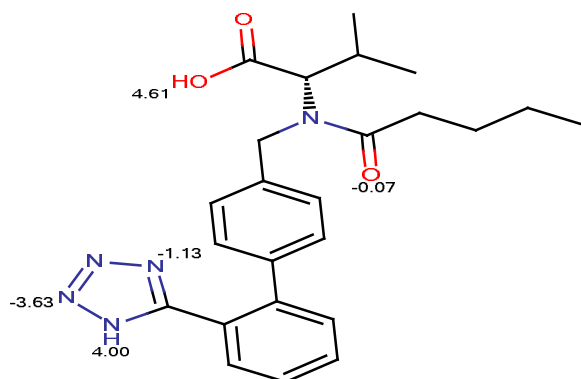
Strukturu **irbesartana** [IRB; 2-butil-3-({-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)fenil]fenil} metil)-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-on] karakteriše prisustvo imidazolovog prstena i spirociklopentana (Slika 9). Ovaj dio molekule odgovoran je za povećan afinitet vezivanja za  $AT_1$  receptore (10 puta) u odnosu na losartan.



**Slika 9.** Strukturna formula irbesartana sa označenim  $pK_a$  vrijednostima.

Irbesartan se uglavnom koristi za terapiju hipertenzije. U odnosu na druge sartane ima dosta dugo poluvrijeme eliminacije (11-15h) i dobru bioraspoloživost (70%). U farmaceutskim formulacijama se nalazi samostalno ili u kombinaciji sa tiazidnim diuretikom, hidrohlorotiazidom [33,34].

**Valsartan** [VAL; Slika 10; (S)-3-metil-2-(N-{{2'-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)bifenil-4-il}metil}pentanamido) butanoična kiselina], je blokator angiotenzin II receptora ( $AT_1$ ). Koristi se kao monoterapija ili u dvokomponentnoj kombinaciji sa hidrohlorotiazidom, te trokomponentnoj smjesi sa hidrohlorotiazidom i amlodipinom.

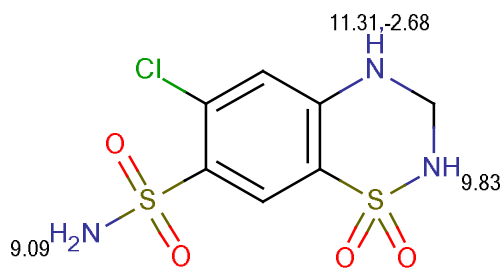


**Slika 10.** Strukturna formula valsartana sa označenim  $pK_a$  vrijednostima

### 1.2.3. Molekule koje se koriste u kombinovanoj terapiji sa $AT_1$ blokatorima

**Hidrohlorotiazid** [HCT, 6-hloro-1,1-dioksa-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamid] je diuretik tiazidne klase, često korišten za medikamentozni tretman hipertenzije i kongestivnog zatajenja srca. Diuretici su lijekovi koji povećavaju izlučivanje vode i elektrolita putem urina tako da se koriste u tretmanu raznih edematoznih stanja (kongestivne srčane mane, nefrotskog sindroma, hroničnih oboljenja jetre i dr.), kao i kod hipertenzivnih stanja. Ovi lijekovi obuhvataju hemijski veoma različite strukture.

Mehanizam djelovanja tiazidnih diuretika je primarno vezan za njihovu sposobnost da inhibiraju  $Na^+/Cl^-$  simporter koji se nalazi u distalnom zavijenom tubulu. Ovi lijekovi se aktivno luče u proksimalni tubul, te preko Henlejeve petlje dolaze do distalnog tubula gdje se natječu sa hloridima na vezivnom mjestu  $Na^+/Cl^-$  simportera i na taj način inhibiraju reapsorpciju natrijevih i hloridnih jona.

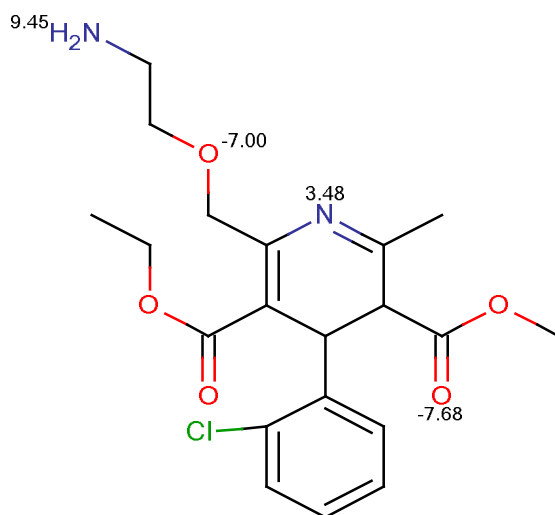


**Slika 11.** Strukturna formula hidrohlorotiazida sa prikazanim  $pK_a$  vrijednostima

Iz ovog razloga se nazivaju i saluretici. Oni, također, inhibiraju i reapsorpciju kalija i bikarbonata, ali u manjoj mjeri [35]. Tiazidni diuretici su slabo kiseli. Osnova strukture je 1,1-dioksobenzotiadiazinsko jezgro (Slika 11). Elektronakceptorska grupa je neophodna na poziciji 6 za diuretičku aktivnost. Uslov za diuretičku aktivnost je prisustvo sulfonamidne grupe u poziciji 7. Hidrohlorotiazid, zahvaljujući prisustvu atoma hlora, ima jaku diuretičku aktivnost.

U pogledu hemijske strukture hidrohlorotiazid ima slabo kisele osobine što omogućava formiranje soli i intravensku primjenu ( $pK_a$  7.9 i 9.2), slabo polarnu strukturu i pogodan je za analizu RP-HPLC metodom [36]. Zbog njihove sinergističke antihipertenzivne aktivnosti,  $AT_1$  blokatori i hidrohlorotiazid tržišno su dostupni u kombinovanim doziranim oblicima. Posljednji napredak u terapiji hipertenzije je razvoj trostruke kombinacije lijekova koja se sastoji od blokatora  $AT_1$  receptora, amlodipina i hidrohlorotiazida [29].

**Amlodipin** [(RS)-3-etil-5-metil-2-[(2-aminoetoksi)metil]-4-(2-hlorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat, Slika 12] je dugodjelujući blokator kalcijevih kanala koji pripada dihidropiridinskim derivatima (DHP). Koristi se kao antihipertenziv i za tretman angine pectoris. Amlodipin djeluje tako što opušta glatku muskulaturu zida arterija, smanjujući ukupan periferni otpor što rezultuje smanjenjem pritiska [30].



**Slika 12.** Strukturna formula amlodipina sa prikazanim  $pK_a$  vrijednostima

### 1.3. ISPITIVANJE ODNOSA STRUKTURE I AKTIVNOSTI MOLEKULA

Posljednjih godina veliki broj istraživanja je usmjeren ka određivanju veze između strukture molekula, fizičko-hemijskih osobina i biološke aktivnosti. Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (*QSAR - Quantitative Structure Activity Relationships*) je oblast istraživanja koja razvojem matematičkih modela uspostavlja funkcionalne zavisnosti između hemijske strukture i biološke aktivnosti. Da bi se izvela odgovarajuća matematička funkcija, veoma je bitan izbor parametara molekula koji će se ispitivati.

Numerički parametri koji definišu odgovarajuće osobine ispitivanih jedinjenja nazivaju se **molekulski deskriptori**. Molekulski deskriptori mogu biti eksperimentalno određeni ili teorijski izračunati, pomoću matematičkih formula ili kompjuterskih algoritama. Poznato je više od 5000 deskriptora koji su definisani ili izračunati pomoću različitih softvera. Za razliku od eksperimentalno određenih, teorijski deskriptori ne sadrže grešku koja potiče od mjerenja. Međutim, pri izračunavanju teorijskih deskriptora potrebne su određene aproksimacije koje, također, mogu da dovedu do greške. Kao molekulski deskriptori najčešće se koriste mjerljive fizičke osobine kao što su: gustina, energija jonizacije, molekulska masa, dipolni momenat, temperatura ključanja, refraktivni indeks, redukcionni potencijal, *pKa*, parametri lipofilnosti. Pored mjerljivih veličina, kao molekulski deskriptori koriste se i oni koji se mogu izračunati: polarizabilnost, volumen molekula, VdW površina, molarna refraktivnost, energija hidratacije, Taftov sterni parametar. U zavisnosti od složenosti informacija koje nose, kao i od načina izračunavanja, deskriptori mogu biti:

- *Nulti molekulski deskriptori (0D)* – najjednostavniji, bezdimenzionalni deskriptori koji se dobivaju iz molekulske formule jedinjenja (npr, vrsta i broj atoma). Ovaj deskriptor ne sadrži nikakve informacije o strukturi molekule.
- *Jednodimenzionalni deskriptori (1D)* - daju informacije o funkcionalnim grupama, supstituentima i broju fragmenata i ne zahtijevaju poznavanje strukture. Kao i nulti deskriptori, jednodimenzionalni se mogu jednostavno izračunati i laki su za tumačenje.



- *Dvodimenzionalni deskriptori (2D)* - karakterišu dvodimenzionalnu strukturu molekula i obuhvataju način povezivanja atoma u molekuli, kao i informacije o prirodi hemijskih veza između atoma. Ovi deskriptori se nazivaju topološki.
- *Trodimenzionalni deskriptori (3D)* - obuhvataju geometrijski prikaz molekula u prostoru i obuhvataju konformaciju molekule i raspored atoma u trodimenzionalnom prostoru. Ovi deskriptori su poznati kao geometrijski.
- *4D molekulski deskriptori* - obuhvataju elektronsku raspodjelu i interakciju polja ispitivanog molekula i atoma i funkcionalnih grupa iz okruženja.

Osim navedenog, molekulski deskriptori mogu se podijeliti na:

- fizičko-hemijske (npr. log P, temperatura ključanja,  $pK_a$ );
- topološke (indeks konektiviteta, valencioni indeksi);
- konstitucioni (Van der Waals-ova zapremina i površina, molekulska masa, refraktivnost, polarizabilnost)
- kvantno-hemijski (energija orbitala, parcijalno naelektrisanje).

Prilikom izbora veoma je važno odabrati one deskriptore koji međusobno korelišu (npr. molekulska masa i temperatura ključanja kod serije homologih jedinjenja) i koji korelišu sa biološkim efektom. Iako veći broj posmatranih deskriptora daje tačniju korelaciju, njihov broj u *QSAR* ispitivanjima direktno zavisi od broja ispitivanih jedinjenja. Proces formiranja *QSAR* modela obuhvata nekoliko koraka. Prvi korak je odabir molekuskog seta podataka za *QSAR* studiju i izračunavanje molekulskih deskriptora. Drugi korak je primjena različitih statističkih metoda u formiranju odgovarajućih modela između izračunatih molekulskih deskriptora i aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Najčešće primjenjivane statističke metode su: multilinearna regresija (*Multiple Linear Regression*, MLR), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Squares regression*, PLS), vještačke neuronske mreže (*Artificial Neural Network*, ANN) i klasifikaciona i regresiona stabla (*classification and regression trees*) [37-40].

U svim navedenim pristupima deskriptori predstavljaju nezavisnu promjenljivu (X), a biološka aktivnost predstavlja zavisnu promjenljivu (Y). Procjena, da li se formirani

model može koristiti za pouzdano predviđanje biološke aktivnosti novih jedinjenja, predstavlja jedan od najvažnijih dijelova formiranja modela. Ova procjena se ujedno može nazvati i trećim korakom (validacija modela). U ovoj doktorskoj disertaciji je korištena metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (*Partial Least Squares regression*, PLS) uz pomoć Pentacle programa [41]. U *3D-QSAR* studiji se računaju polja energetske interakcije (*Molecular Interaction Field* (MIF)) analiziranjem ispitivane molekule i četiri hemijske probe: DRY (koji predstavlja hidrofobnu interakciju), O (sp<sup>2</sup> karbonilni kisik, koji predstavlja donor vodikove veze), N1 (neutralni NH, kao amid, akceptor vodikove veze) i TIP (deskriptor molekulskog oblika). Vrijednosti polja energetskih interakcija između ispitivanih molekula i četiri hemijske probe su upotrijebljene za izračunavanje GRIND deskriptora.

Strukturne varijante svih molekula su analizirane metodom analize glavnih komponenti (PCA) na kompletnom setu GRIND deskriptora, dok su vrijednosti GRIND deskriptora i aktivnosti ispitivanih jedinjenja upotrijebljene za formiranje *3D-QSAR* modela primjenom regresione metode parcijalno najmanjih kvadrata (PLS) [42]. PLS predstavlja generalizaciju multilinearne regresije. PLS pristup uveo je *Herman Wold* 1975. godine za modelovanje komplikovanih setova podataka, organizovanih u matrice (blokove), na koje se nije mogla primijeniti uobičajena regresiona analiza. Najveći značaj PLS regresije, za razliku od MLR analize, ogleda se u mogućnosti analize podataka koji su nepotpuni, sa visokom interkorelacijom i sa velikim brojem promjenljivih X. PLS daje i mogućnost istovremenog modelovanje nekoliko zavisnih promjenljivih Y. Sama metoda se zasniva na uspostavljanju linearne zavisnosti između zavisne promjenljive Y i niza latentnih (eksplanatornih, predviđajućih) promjenljivih, takozvanih, PLS faktora, koji predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih promjenljivih (X) i koji povećavaju kovarijansu između X (matrice molekulskih deskriptora) i Y (retencionog vremena, biološke aktivnosti). PLS se često interpretira i kao projekcija na latentne strukture (*Projection to Latent structures*) [43,44]. Broj jedinjenja koji se koristi u *QSAR* studiji ne bi trebalo da bude suviše mali, a iz praktičnih razloga ni suviše veliki. Softveri i vrijeme dostupno za formiranje modela određenom metodologijom najčešće određuju gornju granicu broja jedinjenja. U cilju formiranja kvalitetnih modela, koji se mogu koristiti za pouzdano predviđanje biološke

aktivnosti ili osobina molekula, odabrani set jedinjenja potrebno je podijeliti na trening i test set [45].

Za formiranje *QSAR* modela koriste se jedinjenja koja ulaze u sastav trening seta, dok se za validaciju formiranih modela i procjenu njihove pouzdanosti koriste jedinjenja test seta. U slučaju velikog broja jedinjenja može se primijeniti nekoliko različitih pristupa kao što su: (1) izdvajanje različitih podsetova jedinjenja, (2) klasterovanje podataka i formiranje nezavisnih modela za svaki klaster itd. Teško je dati egzaktn minimum jedinjenja koji se može koristiti za dobijanje pouzdane regresione jednačine, ali uvijek treba imati u vidu da mali broj molekula u trening setu može dati slučajnu korelaciju i *overfitting* (nepovoljan odnos broja parametara i broja analiziranih jedinjenja usljed čega je dobiveni model previše prilagođen trening setu) što za rezultat može imati dobijanje nepouzdanih regresionih jednačina [45].

Jedan od najkritičnijih koraka *QSAR* analize je validacija modela koja omogućava poređenje formiranih modela i izbor optimalnog modela sa najvećim prognostičkim potencijalom. Najčešće se primjenjuje ukrštena validacija (*Leave-One-Out Cross Validation LOO-CV*) u kojoj se validacioni regresioni faktor (*Leave-One-Out Cross Validated,  $Q^2$* ) koristi kao kriterijum robusnosti i predviđajuće sposobnosti modela. Često se smatra da je visoka vrijednost  $Q^2$  (na primjer  $Q^2 > 0.5$ ) dovoljan pokazatelj dobrog predviđanja datog modela. Međutim, iako niske vrijednosti  $Q^2$  ukazuju na loše predviđanja modela, visoke vrijednosti  $Q^2$  se danas ne smatraju dovoljnim kriterijumom u procjeni kvaliteta formiranog modela [45,46].

Sposobnost formiranog modela da predvidi vrijednost zavisne promjenljive  $Y$  trebalo bi da bude potvrđena primjenom još jedne validacione procedure, eksterne validacije, koja podrazumijeva provjeru sposobnosti datog modela da predvidi ispitivanu osobinu za jedinjenja koja nisu korištena u formiranju modela i koja čine tzv. test set ili eksterni set.

Prema Tropshi i saradnicima test set treba da ima najmanje 5 jedinjenja čije aktivnosti i strukture moraju da budu u opsegu aktivnosti i strukture jedinjenja u trening setu [45,46]. Ovaj zahtjev je neophodan za dobijanje pouzdane statistike za poređenje između eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti ovih jedinjenja.

## 1.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA POD VISOKIM PRITISKOM - HPLC

Tečna hromatografija pod visokim pritiskom ili tečna hromatografija visoke efikasnosti (*High Pressure Liquid Chromatography* ili *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) ima sve širu primjenu u kontroli farmaceutskih proizvoda, analizi tjelesnih tečnosti, ispitivanju životne sredine, hemijskoj industriji i u drugim područjima analitike. Iz dana u dan sve su šira područja u kojima se ova hromatografska metoda primjenjuje kao komplementarna metoda gasnoj hromatografiji, te služi kao efikasna i pouzdana metoda za identifikaciju i određivanje lijekova.

Princip rada HPLC-a je forsiranje prolaska analizirane supstance (ili smjese) kroz kolonu (cijev punjena materijalom sitnih čestica, a time i velikom aktivnom površinom) pumpanjem tečnosti (mobilna faza) pod visokim pritiskom. Mala zapremina uzorka se unosi u tok mobilne faze i na osnovu specifičnih hemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja zavisi od prirode supstance koja se analizira, stacionarne faze i sastava mobilne faze. Vrijeme za koje se supstanca eluira naziva se retenciono vrijeme (vrijeme zadržavanja;  $t_R$ ) i karakteristično je za određenu supstancu.

Najznačajniji parametri HPLC analize od kojih zavisi razdvajanje ispitivanih jedinjenja su: retencija, selektivnost, efikasnost kolone i faktor razdvajanja. Retencija predstavlja zadržavanje komponenti u koloni i definiše se retencionim vremenom ( $t_R$ ). Retenciono vrijeme je kvalitativni hromatografski parametar koji zavisi od brzine protoka mobilne faze i dužine kolone. Ostali hromatografski parameri koji karakterišu retenciju su: redukovano retenciono vrijeme ( $t_{R'}$ ), retenciono vrijeme mobilne faze ( $t_0$ ), relativno retenciono vrijeme ( $Rt_R$ ) i retenciona zapremina ( $V_R$ ) i retencioni faktor. Retencioni faktor predstavlja mjeru zadržavanja komponente u koloni, a izračunava se prema jednačini:

$$k = (t_R - t_0) / t_0$$

$k$  je mjera kvaliteta hromatograma i idealno je da se vrijednost kreće od 1 do 10. Ako je  $k < 1$  komponenta se ne zadržava na koloni tj. eluira se sa pikom mobilne faze. Ako je  $k > 10$  jedinjenje se dugo zadržava u koloni što produžava vrijeme trajanje analize.

Selektivnost predstavlja mjeru razdvajanja dvije komponente, a izražava se preko faktora selektivnosti ( $\alpha$ ). Zadovoljavajuća separacija je postignuta kada je  $\alpha \gg 1$ .

Efikasnost kolone se karakteriše brojem teorijskih platoa ( $N$ ) - što je broj teoretskih platoa veći, veća je i efikasnost kolone. Kvalitet kolone definiše i simetrija pika ili faktor simetrije pika ( $A_s$ ). Optimalna vrijednost  $A_s$  je od 1,0 do 1,2. Ako je  $A_s < 1$  javlja se „razvlačenje“ uzlaznog dijela pika kao posljedica interakcije između ispitivane komponente i stacionarne faze. Ako je  $A_s > 1$  dolazi do razvlačenja silaznog dijela pika (*tailing*) kao posljedica prezasićenja kolone uzorkom. Faktor razdvajanja ili faktor rezolucije ( $R$ ) zavisi od retencije, selektivnosti, širine pika i efikasnosti kolone. Razdvajanje na baznoj liniji je postignuto ukoliko je  $R > 1.5$ .

Kao mobilne faze koriste se uobičajeni rastvarači, čisti ili u kombinaciji (npr. voda, metanol, organski rastvarači, itd.) [47]. Voda može sadržavati i neki pufer, kako bi se poboljšalo razdvajanje. Moguće je koristiti i gradijentno eluiranje, što podrazumijeva promjenu sastava mobilne faze u toku eluiranja. Ako se uslovi pod kojima se vrši razdvajanje komponenti tokom vremena trajanja postupka ne mijenjaju, radi se o izokratskoj hromatografiji.

#### 1.4.1. Hromatografija na normalnim fazama

Hromatografija na normalnim fazama se primjenjuje kada je supstanca koja se analizira polarna, a podrazumijeva korištenje polarne stacionarne faze i nepolarne mobilne faze. Pri prolasku kroz kolonu polarna supstanca se adsorbuje i zadržava na česticama stacionarne faze. Jačina adsorpcije je veća što je veća polarnost supstance, a time je veće i vrijeme zadržavanja.

Korištenje polarnijih rastvarača u mobilnoj fazi smanjuje retenciono vrijeme. Ovaj tip hromatografije je napušten 1970-tih sa razvojem HPLC-a na obrnutim fazama, zbog slabe reproducibilnosti i usljed promjena na česticama stacionarne faze pod uticajem rastvarača.

### 1.4.2. Hromatografija na obrnutim fazama

HPLC na obrnutim fazama (RP-HPLC) koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Najčešća stacionarna faza je silikatna, tretirana sa  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , gdje je R alkilna grupa ravnog lanca, npr.  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  ili  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . Vrijeme zadržavanja je duže za manje polarne supstance, povećava se dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu, a smanjuje dodatkom hidrofobnih rastvarača. RP-HPLC funkcioniše na principu hidrofobnih interakcija analizirane supstance sa nepolarnom stacionarnom fazom [47].

## 1.5. HEMOMETRIJSKI PRISTUP OPTIMIZACIJI HPLC METODE

### 1.5.1. Eksperimentalni dizajn

Da bi se izveli zaključci kako neki sistem funkcioniše, odnosno kako proces radi, koriste se razne vrste eksperimenata. Način obrade rezultata eksperimenata je vrlo važan, jer od toga značajno ovisi i vjerodostojnost zaključaka koji se izvode iz eksperimenata. Iz ovih razloga je potrebno postaviti dizajn eksperimenata tako da vodi ka rješavanju problema, koji je i doveo do potrebe izvođenja eksperimenata. Upotreba eksperimentalnog dizajna omoućava pripremu eksperimenata po određenom statističkom modelu i istovremenu promjenu svih faktora koji su od značaja za određivanje. Na ovaj način moguće je definisati eksperimentalne parametre pri kojima se postižu optimalni uslovi ispitivanja i određivanja [48-50].

Tradicionalni pristup optimizaciji RP-HPLC eksperimentalnih uslova za određivanje lijekova je zasnovan na eksperimentu „pokušaj i pogriješi“. Ovakav način optimizacije, koji se bazira na ispitivanju uticaja jedne promjenljive veličine, dok se ostale održavaju na konstantnoj vrijednosti, neracionalan je, sadrži veliki broj nepotrebnih eksperimenata i ne razmatra uticaje interakcija između faktora.

Tradicionalnim eksperimentalnim pristupom ne mogu se riješiti veoma kompleksni analitički problemi, niti se mogu detaljno analizirati sistemi. Ovakve probleme rješava primjena savremenih hemometrijskih tehnika u razvoju metode tečne

hromatografije. Prilikom razvoja hromatografske metode, kao cilj može se postaviti pronalaženje eksperimentalnih uslova koji omogućavaju maksimalan kvalitet separacije svih analiziranih supstanci, minimalnu dužinu trajanja analize, adekvatan oblik dobivenih pikova, maksimalnu robusnost postavljenih uslova ili, u idealnom slučaju, postizanje svih ovih ciljeva istovremeno.

Za postizanje ovakvih ciljeva tradicionalnim pristupom potrebno je izvesti veoma veliki broj eksperimenata, posebno u slučaju analize kompleksnih analitičkih smjesa koje sadrže više supstanci sa različitim fizičko-hemijskim karakteristikama. Međutim, još bitnija je činjenica da postoji velika opasnost da ovakav pristup identifikuje samo lokalni optimum, ili da uopšte ne identifikuje optimum.

Eksperimentalni dizajn omogućava pripremu eksperimenata po određenom statističkom modelu i istovremenu promjenu svih faktora koji su od značaja za određivanje. Na ovaj način moguće je definisati eksperimentalne uslove pri kojima se postiže optimum čime se može poboljšati razdvajanje, selektivnost, osjetljivost i specifičnost metode [51]. Na osnovu malog broja dobro isplaniranih eksperimenata, uz hemometrijski pristup koji koristi matematičke i statističke tehnike, moguće je detaljno opisati hromatografsko ponašanje sistema. Dalji proces optimizacije vrši se teorijskim pretraživanjem eksperimentalnog prostora, bez izvođenja novih eksperimenata.

Modelovanje sistema i predviđanje ponašanja sistema kompjuterskom simulacijom obuhvata dva ključna koraka. U okviru prvog koraka inicijalni eksperimenti (definisani primjenom eksperimentalnog dizajna) omogućavaju konstruisanje jednačina ili treniranje algoritama koji uspostavljaju matematičku vezu između ispitivanih faktora i odabranih odgovora koji se prate. Hromatografski odgovori za bilo koju kombinaciju eksperimentalnih faktora mogu se predvidjeti kreiranim matematičkim modelima. Nakon toga, eksperimentalni prostor detaljno se pretražuje ispitivanjem vrijednosti svih odabranih odgovora za veliki broj eksperimentalnih uslova, što predstavlja drugi korak u provođenju eksperimentalnog dizajna. Na ovaj način dobija se niz simuliranih hromatograma koji odgovaraju određenom setu eksperimentalnih uslova koji se pažljivo mijenja kroz proces optimizacije, a zatim se

procjenjuje kvalitet dobivenih hromatograma kako bi se identifikovao globalni optimum. Informacija sadržana u simuliranim hromatogramima može se prevesti u numeričku vrijednost koja će se pratiti u toku optimizacije, što omogućava pronalaženje najboljih eksperimentalnih uslova. Funkcija cilja ili funkcija hromatografskog odgovora predstavlja matematički izraz koji omogućava praćenje kvaliteta hromatograma.

Najvažniji parametar koji se može posmatrati kod hromatografije je razdvajanje ili separacija, a pored separacije, funkcije cilja mogu procjenjivati i ukupnu dužinu trajanja analize, željeni oblik pikova, robusnost postignutog optimuma, itd [52]. Na ovaj način problem optimizacije sveden je na problem pronalaženja najadekvatnije vrijednosti funkcije hromatografskog odgovora koja će omogućiti podešavanje eksperimentalnih uslova tako da vode željenom ponašanju sistema [53,54].

Validnost rezultata optimizacije hemometrijskim pristupom zavisi od tačnosti kojom definisani matematički modeli simuliraju hromatograme i sposobnosti funkcije hromatografskog odgovora da procjenjuju hromatograme na način na koji bi to uradili i analitičari. Robusnost optimuma je potvrđena ako su jednom identifikovani optimalni uslovi prihvatljivi i eksperimentalno održivi. Kako bi se izbjeglo kreiranje očigledno nerobusnih metoda poželjno je procjenjivati robusnost optimuma hemometrijskim tehnikama već u ranoj fazi razvoja i optimizacije metode. Eksperimentalno testiranje robusnosti se izvodi po završetku optimizacije, koje se, također, može izvesti primjenom hemometrijskog pristupa. Vrijednosti odgovora sistema dobivene računski, iz polinoma koji opisuje model, a koji se označavaju sa  $\hat{y}$ , rijetko kada odgovaraju eksperimentalno dobivenim vrijednostima odgovora sistema, koje se označavaju sa  $y$  [55].

Koeficijenti u polinomima ( $b_1, b_2...b_k, b_{12}, b_{13}... b_{(k-1)k}, b_{11}, b_{22}...b_{kk}$ ) mogu biti pozitivni ili negativni što ukazuje na to da li su faktor i odgovor sistema u direktnoj ili obrnutoj srazmjeri. Ukoliko je koeficijent negativan, sa povećanjem vrijednosti ispitivanog faktora smanjuje se vrijednost odgovora sistema i obrnuto, u slučaju pozitivne vrijednosti koeficijenta modela. Direktna veza između ispitivanih faktora i odgovora sistema objašnjena je koeficijentima linearnih članova. Za zakrivljenost



površine odgovora i pojavu minimuma i maksimuma odgovorni su koeficijenti kvadratnih članova. Zahvaljujući tome mogu se odrediti optimalni nivoi ispitivanih faktora. Koeficijenti članova interakcija se odnose na eventualno prisutne interakcije između faktora. Značajnost ovih koeficijenata može se procijeniti preko površine odgovora sistema. Ukoliko je ona planarna, može se zaključiti da nema statistički značajnih interakcija. Ukoliko postoje interakcije između dva faktora, to znači da intenzitet uticaja jednog faktora na odgovor sistema zavisi od intenziteta drugog faktora [55,56].

Koeficijenti modela se računaju uz pomoć statističkih programa koji koriste višestruku linearnu regresionu analizu (eng. *multiple linear regression, MLR*), regresionu analizu glavnih komponenata (eng. *principal components regression, PCR*) i metodu parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *partial least squares, PLS*). Nivoi faktora su obično kodirani, da bi koeficijenti modela mogli biti predstavljeni na uporednoj skali i da bi se mogli lakše tumačiti, jer faktori, kao i eksperimentalni opsezi u kojima se oni ispituju, mogu biti veoma različiti. Najčešći način kodiranja je matematički, pri čemu se niži, viši i srednji nivo kodiraju oznakama  $-1$ ,  $+1$  i  $0$ . Značajnost faktora se procjenjuje na osnovu veličine njihovih koeficijenata. Veći koeficijent znači i veći uticaj tog faktora na sistem, a značajnost se statistički procjenjuje najčešće uz pomoć Studentovog  $t$ -testa,  $F$ -testa ili grafika vjerovatnoće normalne raspodjele (eng. *normal probability plots*) [55].

U slučaju Studentovog  $t$ -testa izračunata,  $t$ -vrijednost se upoređuje sa tabelarnom  $t$ -vrijednošću za odgovarajući broj stepeni slobode i odabranu vjerovatnoću. Faktori čija je izračunata  $t$ -vrijednost veća od tabelarne smatraju se statistički značajnim. Značajnost faktora može se grafički prikazati upotrebom *Pareto* dijagrama [50]. Primjenom analize varijanse (eng. *analysis of variance, ANOVA*) procjenjuje se značajnost faktora, te je vrlo značajna i procjena da li postoji neslaganje izabranog matematičkog modela i eksperimentalnih podataka (eng. *lack of fit*) [55]. Procjena faktora koji mogu da utiču na određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida, te losartana i hidrohlorotiazida izvršena je primjenom  $2^3$  faktorskog dizajna. Optimizacija HPLC metode za određivanje valsartana, hidrohlorotiazida i amlodipina je optimizovana korištenjem centralnog kompozitnog dizajna.

U radu je opisan postupak validacije analitičke metode koji je neophodan kako bi se analitička metoda primjenjivala za određivanje lijekova u farmaceutsko-tehnološkim oblicima. Korištenjem validiranih analitičkih metoda smanjuje se mogućnost analitičke greške, a dobiveni rezultati mogu se smatrati tačnim i pouzdanim [52]. Značaj ovog istraživanja ogleda se i u mogućnosti primjene validirane RP-HPLC metode za određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida, losartana i hidrohlorotiazida, te valsartana, hidrohlorotiazida i amlodipina u tabletama.

### 1.5.2. Vrste eksperimentalnog dizajna

Postoje dvije grupe eksperimentalnog dizajna: *screening* i optimizacioni. *Screening* dizajn se izvodi u početnoj fazi eksperimenta i njime se određuju promjenljive veličine koje su značajne za dalje ispitivanje. Primjenom ovog dizajna se smanjuje broj nezavisno promjenljivih veličina koje će dalje biti analizirane.

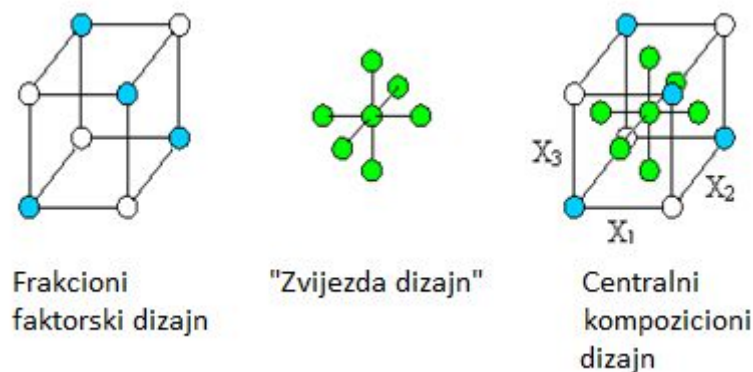
Veliki broj promjenljivih koje teoretski mogu uticati na sistem zahtijevao bi izvođenje velikog broja eksperimenata. Smanjenje broja eksperimenata predstavlja cilj početne faze svakog istraživanja. *Screening* dizajn se radi tako što se procjenjuje koje promjenljive imaju značajan uticaj na ponašanje sistema i samo se one ispituju detaljnije u sljedećim fazama. Kao *screening* dizajn najviše se koriste pun faktorski i frakcioni faktorski dizajn, jer se kao modeli najčešće koriste linearni i interakcioni modeli Plaket-Burman-ov dizajn [57,58].

***Pun faktorski dizajn*** se koristi za procjenu uticaja varijabli na posmatrani odgovor, kao i procjenu značaja interakcija između ispitivanih varijabli. Ovaj tip dizajna se sastoji od  $m^k$  eksperimenata ( $m$  – broj nivoa na kojima se svaka varijabla ispituje,  $k$  – ukupan broj ispitivanih varijabli). Nivoi se određuju na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja, a s obzirom da je cilj *screening* dizajna smanjenje broja eksperimenata, najčešće se promjenljive ispituju na dva nivoa (viši i niži nivo). Pun faktorski dizajn podrazumijeva da se sve promjenljive ispituju na svim nivoima, a ukupan broj eksperimenata, ako se koriste dva nivoa promjenljivih, se računa kao  $2^k$ , gdje je  $k$  broj ispitivanih promjenljivih. Ukoliko se ispituju tri promjenljive na dva nivoa ukupan broj eksperimenata je  $2^3=8$ . Kako raste broj promjenljivih, naglo raste i broj eksperimenata

koje je potrebno izvršiti. Pun faktorski dizajn podrazumijeva ponavljanje eksperimenta u jednoj centralnoj tački što omogućava određivanje eksperimentalne greške [59-61].

**Frakcioni faktorski dizajn** je eksperimentalni dizajn kojim se ispituje samo određeni podskup (frakcija) punog dizajna pri čemu se koriste oni eksperimenti koji pokrivaju što veću površinu eksperimentalnog domena. Kod frakcionog dizajna se interakcije trećeg ili višeg reda mogu zanemariti u modelu polinoma. Ovaj dizajn je definisan sa  $2^{k-p}$  eksperimenata ( $k$  – ukupan broj ispitivanih varijabli,  $p$  – stepen frakcionizacije punog faktorskog dizajna).

**Centralni kompozicioni dizajn** (CCD) se sastoji od punog faktorskog dizajna na dva nivoa i 'zvijezda' dizajna (*star* tj. *axial design*). Kada se centralne tačke punog faktorskog i zvjezdanog dizajna podudaraju, dobija se centralni kompozicioni dizajn (ukoliko se ne podudaraju u pitanju je necentralni kompozicioni dizajn) [62]. Dio centralnog kompozicionog dizajna može činiti frakcioni faktorski dizajn (umjesto punog faktorskog dizajna). Centralni kompozicioni dizajn prikazan je na Slici 13.

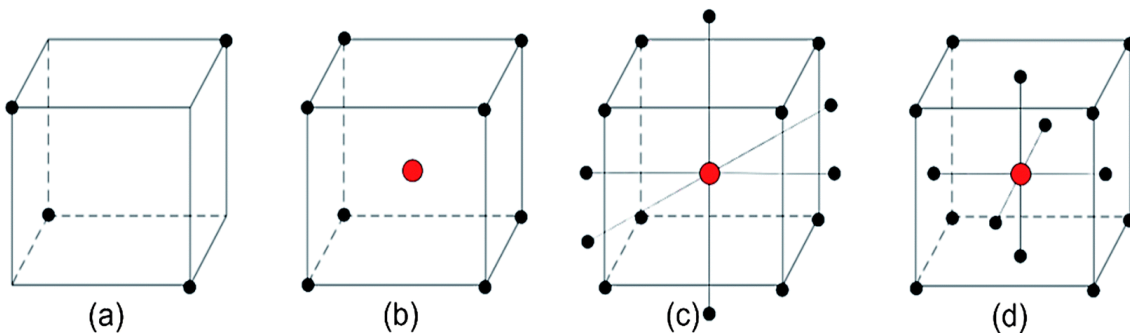


**Slika 13.** Centralni kompozicioni dizajn

Ako CCD čini pun faktorski dizajn, broj eksperimenata će biti:  $2^k + 2k + c$  eksperimenata ( $k$  je broj ispitivanih faktora), dok će se primjenom frakcionog faktorskog dizajna izvoditi  $2^{k-p} + 2k + c$  eksperimenata. Član  $2k$  se odnosi na zvijezda dizajn, koga čine aksijalne tačke, a gradi se variranjem jednog faktora od  $-\alpha$  do  $+\alpha$ , dok se svi ostali faktori drže na konstantnom nivou. Ukoliko se ispituju 3 faktora, a vrijednost  $\alpha$  iznosi 1, dobija se centralni kompozicioni dizajn čije se aksijalne tačke nalaze na sredini stranica kocke orijentisane ka centru (*face centered composite design*).

Kod ove vrste dizajna faktori se ispituju na tri nivoa (-1, 0, +1). Za vrijednost  $\alpha \neq 1$ , broj ispitivanih nivoa se povećava za dva, uzimajući u obzir vrijednosti  $-\alpha$  i  $+\alpha$ . U ovom slučaju, aksijalne tačke se nalaze izvan nivoa kvadratnog (za 2 ispitivana faktora), odnosno kubnog (3 ispitivana faktora) eksperimentalnog prostora, te je u izvođenju eksperimenata veća mogućnost pojave eksperimentalne greške.

Različite vrste dizajna prikazane su na Slici 14.



**Slika 14.** Grafički prikaz dizajna: a) Frakcioni  $2^3$  faktorski dizajn; b) Puni  $2^3$  faktorski dizajn sa centralnom tačkom; c) Centralni kompozicioni dizajn; d) *face-centered* Centralni kompozicioni dizajn

Metodologija površine odgovora (eng. *response surface methodology*, *RSM*) predstavlja geometrijsku prezentaciju odgovora sistema u okviru eksperimentalnog regiona u funkciji jednog ili više faktora. Dobiveni odgovor može biti prikazan kao linija u dvodimenzionalnom prostoru (ispituje se jedan faktor), površina u trodimenzionalnom prostoru (ispituju se dva faktora) ili hiperpovršina u višedimenzionalnom prostoru (ispituje se veći broj faktora) [55-57]. Na ovaj način je jednostavno utvrditi optimalnu vrijednost za određeni faktor, jer ona predstavlja minimum ili maksimum na dobivenoj površini odgovora [62-64].

### 1.5.3. Metodologija multikriterijumskog odlučivanja

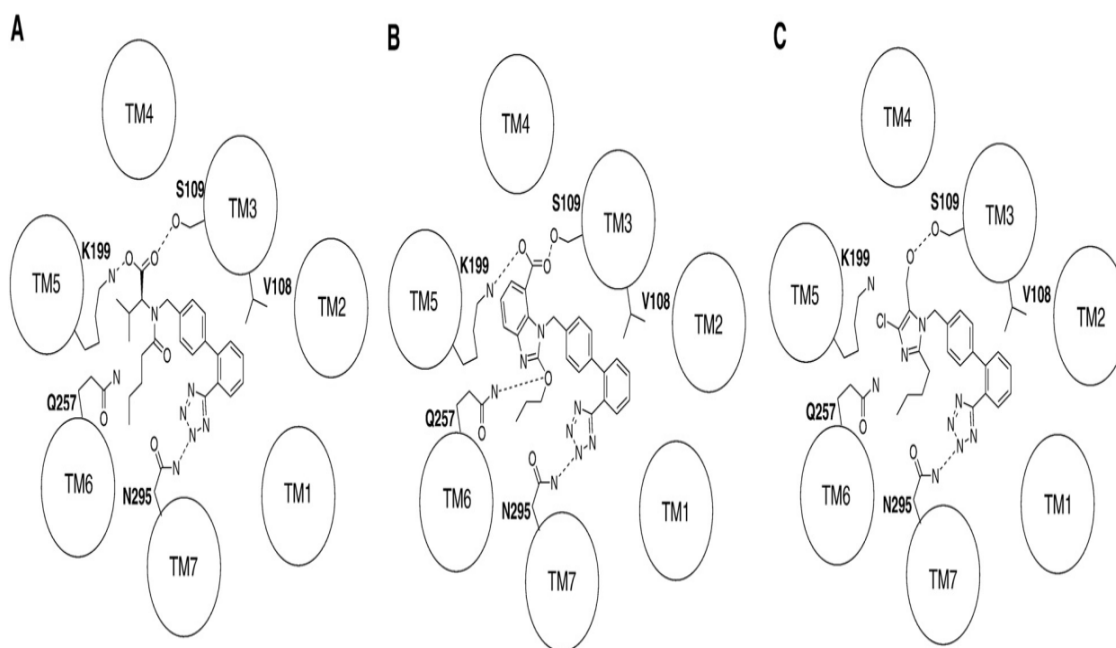
Korištenjem metodologije površine odgovora relativno je jednostavno utvrditi optimalnu vrijednost za jedan faktor, ali problem nastaje ukoliko je potrebno optimizovati više faktora istovremeno, odnosno zadovoljiti više ciljeva u isto vrijeme. U hromatografiji je najčešće potrebno postići dobro razdvajanje svih ispitivanih

komponenti uz najkraće vrijeme trajanja hromatografske analize [65]. Veliki problem je pronaći uslove koji istovremeno zadovoljavaju više hromatografskih ciljeva, odnosno odgovora sistema, posebno ukoliko se optimalne vrijednosti ispitivanih faktora nalaze u različitim dijelovima eksperimentalnog regiona i ne preklapaju se [66]. Da bi se napravio odgovarajući kompromis izmjene zadatih hromatografskih ciljeva u ovakvim slučajevima se koristi metodologija multikriterijumskog odlučivanja (eng. *multicriteria methodology* ili *multiple response methodology*) [67]. Najznačajnija i najčešće korištena metodologija multikriterijumskog odlučivanja, kada je u pitanju optimizacija analitičkih metoda, je Deringerova funkcija poželjnih odgovora (eng. *Derringer desirability function*) [68], jer je primjenljiva na linearne i nelinearne matematičke modele i ne zahtijeva odabir prioritarnog odgovora sistema. Ova metodologija se bazira na konstruisanju funkcije poželjnih odgovora za svaki pojedinačan odgovor sistema (*di*) u koju se unose zahtjevi, odnosno ciljevi koje svaki odgovor sistema treba da zadovolji, kao i relativni značaj tog odgovora. Skala za svaku pojedinačnu funkciju poželjnih odgovora se kreće od  $d = 0$  za potpuno nepoželjan nivo odgovora, do  $d = 1$  za poželjan odgovor [69-71].

## 1.6. 3D-QSAR STUDIJA AT<sub>1</sub> BLOKATORA

U predviđanju farmakofornih zahtjeva za vezivanje za angiotenzin II receptore korišteni su različiti pristupi. Barellini i saradnici su istraživali različite strukturne zahtjeve za specifično vezivanje nepeptidnih i peptidnih antagonista za AT<sub>1</sub> receptore i identifikovali aminokiselinske rezidue koje određuju vezivanje losartana [72]. Clement i saradnici istraživali su okruženje ligand vezivajućeg mjesta kod humanog AT<sub>1</sub> receptora, koristeći analizu blizine metionina [73]. Ji i saradnici su još 1994. godine istraživali selektivnost nepeptidnih antagonista prema AT<sub>1</sub> i AT<sub>2</sub> receptorima [74]. Oni su računali relevantne farmakokinetičke i metaboličke osobine baze podataka od 53 supstance koristeći *VolSurf* i *MetaSite* softver. Bosnyak i saradnici su izveli sistematičnu analizu afiniteta vezivanja važnih angiotenzinskih peptida [75], dok su Aplin i sar. evaluirali znanja o molekularnim determinantama aktivacije AT<sub>1</sub> receptora [76]. Nekoliko radova opisuje odnos strukture i aktivnosti derivata imidazol-5-karboksilnih kiselina i supstituiranih analoga imidazol-bifenil-sulfoniluree, kao

antagoniste AT<sub>1</sub> receptora [77]. Neki autori su primjenjivali *3D-QSAR* model za odabir naj snažnijeg AT<sub>1</sub> antagoniste i ispitivali supstituisane derivate benzimidazola i derivate piridina [78,79]. Proteklih godina, publikovani su brojni radovi koji opisuju različite stepene poboljšanja efekata blokatora AT<sub>1</sub> receptora [80]. Rezultati do kojih su došli Le i saradnici naglasili su različite karakteristike olmesartana i telmisartana [81]. Ispitivanje Arakawe pokazuje da su vazodepresorni efekti kandesartana, valsartana i telmisartana bolji od enalapрила [82]. Smith i saradnici su objavili rezultate prema kojima je olmesartan značajno efektivniji od losartana ili valsartana u tretmanu hipertenzije [83]. Ovi različiti efekti se objašnjavaju postojanjem različitosti u molekularnim karakteristikama AT<sub>1</sub> blokatora. Bolje razumijevanje različitih molekularnih mehanizama za svaki AT<sub>1</sub> blokator može biti korisno za tretman pacijenata [80].



**Slika 15.** Prikaz vezivanja A) valsartana, B) kandesartana i C) losartana sa AT<sub>1</sub> [84]

Prema podacima koji su nastali nakon pregleda literature, ne postoji razvijen *3D-QSAR* model koji koristi različite strukture nedavno ispitivanih AT<sub>1</sub> blokatora na humanim AT<sub>1</sub> receptorima, niti *3D-QSAR* model koji se koristi za predviđanje aktivnosti novih AT<sub>1</sub> blokatora. Stoga je, jedan od glavnih ciljeva ovog rada, bio formiranje *3D-QSAR* modela, definisanje strukturalnih determinanti za AT<sub>1</sub> blokatore i ispitivanje 3D-strukture farmakofora AT<sub>1</sub> blokatora.

## 1.7. HPLC ODREĐIVANJE BLOKATORA AT<sub>1</sub> RECEPTORA

### 1.7.1. HPLC određivanje Irbesartana i Hidrohlorotiazida

Literatura pokazuje da postoji nekoliko HPTLC [85-88], spektrofluorimetrijskih [89-91], voltametrijskih [92], kapilarno elektroforetskih [93], HPLC [94,95] i LC-MC [96,97] metoda za određivanje antagonista Ang II receptora.

Objavljeni radovi koji se odnose na postupak optimizacije različitih instrumentalnih metoda za određivanje blokatora angiotenzinskih receptora [99-101], te sistematične studije za optimizaciju hromatografskih separacionih parametara [102-105], prema dostupnim literaturnim podacima nisu podrazumijevale optimizaciju HPLC metode za istovremeno određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida. Cilj ovog dijela rada bio je evaluacija hromatografskog ponašanja irbesartana i hidrohlorotiazida i primjena metode eksperimentalnog dizajna u cilju definisanja optimalnih eksperimentalnih uslova određivanja.

### 1.7.2. HPLC određivanje Losartana i Hidrohlorotiazida

Pregledom literature ustanovljeno je da su publikovani radovi u kojima je opisano spektrofotometrijsko [106-109], spektrofluorimetrijsko [110], voltametrijsko [92] određivanje pojedinačnih lijekova losartana i hidrohlorotiazida ili ovih lijekova u kombinaciji sa drugim lijekovima. Također, opisane su i metode kapilarne elektroforeze [93,108], UV i derivativne spektrofotometrijske, hromatografske HPLC [111-114] kao i LC-MC [115,116] metode.

Iako postoje metode za određivanje losartana i hidrohlorotiazida i nekoliko sistematičnih studija za optimizaciju separacionih hromatografskih parametara [117-119], prema postojećim saznanjima nema objavljenih studija koji se odnose na optimizaciju HPLC metode za istovremeno određivanje losartana i hidrohlorotiazida. Cilj ovog dijela rada je evaluacija hromatografskog ponašanja losartana i hidrohlorotiazida koristeći odgovarajući eksperimentalni dizajn.

### 1.7.3. HPLC određivanje Valsartana, Amlodipina i Hidrohlorotiazida

Postoji mnogo radova u čijem je fokusu određivanje valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida, pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim lijekovima. Radovi za određivanje hidrohlorotiazida su navedeni u prethodnim referencama. Neki radovi opisuju određivanje amlodipina, samog ili u kombinaciji sa drugim molekulama, primjenom HPLC metode [120,121] i spektrofotometrijske tehnike [122]. Radovi koji se odnose na određivanje valsartana prikazuju voltametrijsko određivanje [123], primjenu HPLC metode u određivanju valsartana pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim molekulama [124-127]. Nekoliko radova opisuju istovremeno određivanje binarnih kombinacija ove tri navedene molekule [128-131]. Galande i saradnici opisuju određivanje sva tri jedinjenja u smjesi primjenom UV spektrofotometrije [132]. Pregled literature daje samo jedan rad koji određuje navedene molekule uz pomoć HPLC u humanoj plazmi [133]. Nijedna od postojećih publikovanih metoda ne opisuje HPLC metodu za istovremeno određivanje sve tri supstance u čvrstoj doziranoj formi, a posebno ne optimizovanu HPLC metodu uz pomoć centralnog kompozicionog dizajna.



## 2. CILJ RADA

**Ciljevi ove doktorske disertacije su:**

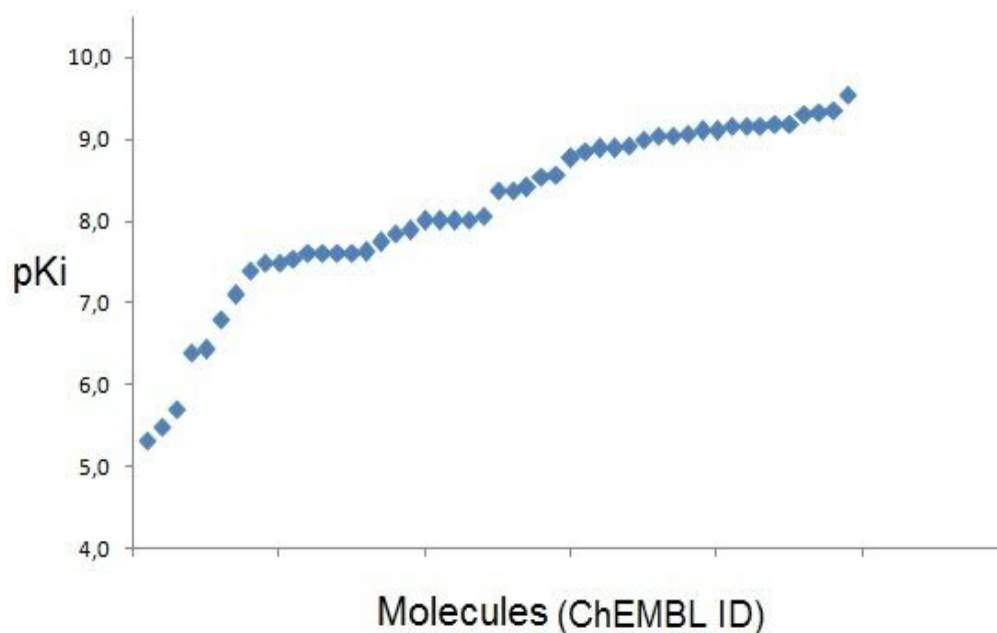
- 1) Razvoj *3D-QSAR* studije u cilju postavljanja matematičke zavisnosti koja definiše kvantitativni odnos hemijske strukture AT<sub>1</sub> blokatora i njihove aktivnosti.
- 2) Na osnovu *3D-QSAR* studije definisati pouzdan model za predviđanje aktivnosti AT<sub>1</sub> blokatora čije aktivnosti nisu eksperimentalno određene.
- 3) Određivanje farmakofora koje su od ključnog značaja za aktivnost ispitivanih AT<sub>1</sub> blokatora.
- 4) *3D-QSAR* analizom predložiti i ispitati nove potencijalno snažnije AT<sub>1</sub> blokatore.
- 5) Hemometrijskom optimizacijom ispitati uticaj fizičko-hemijskih osobina na retenciono ponašanje AT<sub>1</sub> blokatora, što je od značaja za dalje proučavanje farmakofore.
- 6) Primjenom faktorskog dizajna odrediti i kvantifikovati faktore koji su od značaja za HPLC određivanje AT<sub>1</sub> blokatora, pojedinačno ili u smjesi sa drugim lijekovima.
- 7) Dobiti dobru predvidljivost izlaznih hromatografskih parametara na osnovu zadanih vrijednosti ulaznih faktora.
- 8) Primjenom površine odgovora optimizovati eksperimentalne uslove.
- 9) Ispitati signifikantnost modela primjenom statističkih testova (ANOVA, Fisher-F test).
- 10) Validirati RP-HPLC metodu za istovremeno određivanje sadržaja AT<sub>1</sub> blokatora, pojedinačno ili u smjesi.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. 3D-QSAR STUDIJA

Razvoj i primjena *3D-QSAR* metodologije omogućava definisanje veze između varijacija u osobinama molekula i biološke aktivnosti za seriju jedinjenja. Formirane funkcionalne zavisnosti se dalje mogu koristiti za evaluaciju aktivnosti novih hemijski srodnih jedinjenja. Rezultati *3D-QSAR* studije zavise od broja faktora, a parametri moraju biti pažljivo odabrani. Najvažnija razmatranja uključuju izbor farmakofora sa sternim, hidrofobnim i elektronskim efektima, koje su neophodne za optimalnu interakciju sa receptorom. Parametri trebaju biti pažljivo odabrani, moraju se odnositi na afinitet prema receptoru i podaci trebaju biti reproducibilni [134].

*3D-QSAR* studija je izvedena sa 49 jedinjenja, AT<sub>1</sub> blokatora, odabranih iz ChEMBL baze podataka (EMBL-EBI 2015) [135]. Za ligande, korištene u studiji, postoje eksperimentalno određene mjere antagonističke aktivnosti ( $K_i$ , konstante inhibicije) na humanim receptorima [136-153]. Negativni logaritam konstante inhibicije,  $pK_i = (\log(1/K_i))$ , korišten je kao mjera aktivnosti. Vrlo širok  $pK_i$  interval (od 5.328 do 9.538) i homogena distribucija  $pK_i$  vrijednosti u cijelom opsegu aktivnosti, predstavljaju dobre preduslove za formiranje relevantnog *3D-QSAR* modela. Distribucija  $pK_i$  vrijednosti je prikazana na Slici 16.



Slika 16. Distribucija  $pK_i$  vrijednosti AT<sub>1</sub> blokatora

3D-QSAR studija odabranih 49 AT<sub>1</sub> blokatora počinje selekcijom procentualno najzastupljenijih jonizovanih oblika molekula na fiziološkom pH za sve ispitane molekule. Jonizacioni oblici ispitivanih jedinjenja određeni su primjenom *Marvin Sketch* 5.5.1.0 programa (*Chem Axon* 2011) [154]. Marvin 5.5.1.0 računarski algoritmi bazirani su na osnovnoj teoriji hemijskih struktura i korišteni su za dobijanje različitih parametara hemijske reaktivnosti.

Geometrijska optimizacija dominantnih formi svih analiziranih komponenti izvedena je upotrebom *ab initio* Hartree-Fock/3-21G *basis seta* [155], u okviru Gaussian98 programa [156]. Odabrani *ab initio* Hartree-Fock/3-21G bazni set pokazao se kao vrlo dobar izbor za geometrijsku optimizaciju srodnih aromatskih i organskih supstanci [157-161].

Test set od 17 AT<sub>1</sub> blokatora sa homogenom distribucijom *pKi* vrijednosti u kompletnom opsegu aktivnosti (od 5.328 to 9.538) izabran je randomizirano (Tabela 2), dok su preostala 32 jedinjenja (Tabela 3 i 4) izabrana kao trening set za izradu QSAR modela.

3D-QSAR studija za optimizovane molekularne modele AT<sub>1</sub> blokatora izvedena je upotrebom *Pentacle* 1.0.6 programa [162]. *Pentacle* 1.0.6 program je savremeni softver za formiranje 3D-QSAR modela. 3D-QSAR analiza počinje od izračunavanja relevantnih 3D područja interaktivnih energija (GRID bazirana interakcijska polja – MIFs) između ispitivanih molekula i četiri hemijske probe: *DRY* (predstavlja hidrofobne interakcije), *O* (sp<sup>2</sup> karbonil kisik, donor H-veze), *NI* (neutralni NH, kao u amidu, akceptor H-veze) i *TIP* (deskriptor molekulskog oblika).

Molekule su poredane po opadajućoj aktivnosti (od većeg ka manjem *pKi*) i odabrani su parametri za izračunavanje deskriptora. Opcija MIF računanja daje mogućnost određivanja GRID farmakofore sa opcijama (*DRY*, *O*, *NI*, *TIP*). Diskretizacija je urađena opcijom *ALMOND* sa vrijednostima (*DRY*=-3.5, *O*=-6.1, *N1*=-7.2, *TYPE*=-1.3), dok je kodirajuća opcija *CLACC* urađena sa vrijednostima (*DRY*=-2.8, *O*=-6.1, *N1*=-7.2, *TIP*=-1).

Energija interakcije između proba i ciljne molekule je računata na svakoj tački kao suma energija Lennarde Jones ( $E_{lj}$ ), vodikove veze ( $E_{hb}$ ), elektrostatske interakcije ( $E_{el}$ ) i entropije:

$$E_{xyz} = \sum E_{lj} + \sum E_{hb} + \sum E_{el} + S$$

Na osnovu *MIF* vrijednosti vrši se izračunavanje GRID deskriptora (*GRIND* i *GRIND2 deskriptori*), koji su nezavisni od linearne serije [163]. *GRIND* pristup omogućava izdvajanje informacija dobivenih u *MIF* računanju i dobivene informacije kompresuje u novi tip varijabli čije su vrijednosti nezavisne od prostorne pozicije molekule. Te varijable se zatim proučavaju koristeći optimizacioni algoritam sa jačinom polja na amplitudi i raznim udaljenostima između odabranih amplituda u funkciji bodovanja. Varijable formiraju matricu deskriptora koji se analizira koristeći multivarijantne tehnike, kao što su analiza glavnih komponenti (*Principal Component Analysis, PCA*) i metoda najmanjih kvadrata (*Partial Least Squares, PLS*).

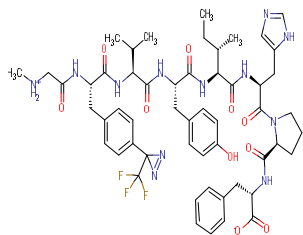
Kvalitet *3D-QSAR* modela može se procijeniti različitim statističkim mjerenjima. Vrijednosti  $R^2$  i  $Q^2$  su uobičajeno prihvaćene kao statistička mjera pouzdanosti *3D-QSAR* modela. U mnogim *3D-QSAR* studijama, kriterij  $R^2 \geq 0.9$  je dokaz da je model interno postojan.  $Q^2$  je mjera sposobnosti modela da interpolira trening set i  $Q^2 \geq 0.5$  potvrđuje prihvatljivost modela.

U ovom radu, *3D-QSAR* model je evaluiran koristeći regresioni faktor  $R^2$  i ukršteni validacijski parametar (*the leave-one-out cross-validation parameter -  $Q^2$* ), *RMSEE* (*Root Mean Square Error of Estimation*) vrijednost trening seta, *RMSEP* (*Root Mean Square Error of Prediction*) vrijednost test seta, i  $R^2_{\text{Obs vs. pred}}$  test seta. *PLS* modeli sa  $Q^2 \geq 0.5$  mogu biti smatrani kao modeli koji imaju dobri predvidljivost.

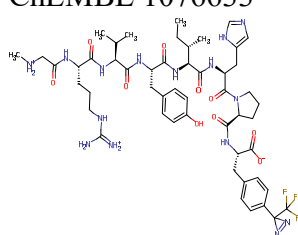
U ovom radu je izvedena *QSAR* studija koristeći gotovo sve blokatore  $AT_1$  receptora za koje postoje eksperimentalno određene vrijednosti konstanti inhibicije ( $K_i$ ) na humanim  $AT_1$  receptorima. Rezultati *QSAR* studije nadalje su korišteni za dizajn, evaluaciju i selekciju novih blokatora  $AT_1$  receptora sa jačim afinitetom za  $AT_1$  receptore.

Tabela 2. Molekule test seta AT<sub>1</sub> blokatora

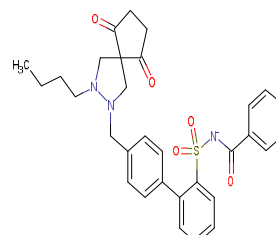
ChEMBL1076602



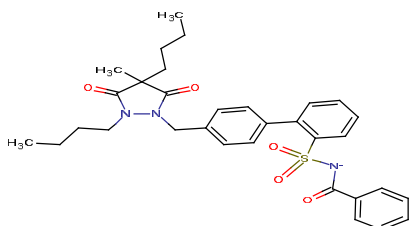
ChEMBL 1076633



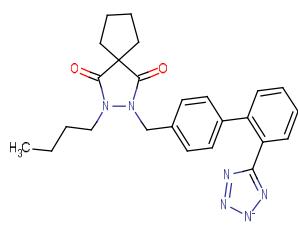
ChEMBL 1668000



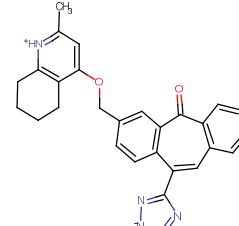
ChEMBL 313392



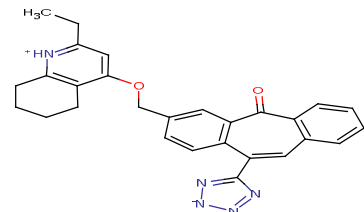
ChEMBL 31544



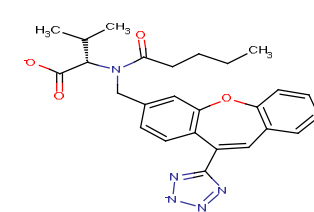
ChEMBL 327633



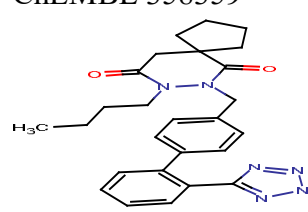
ChEMBL 327903



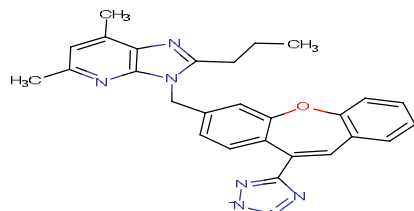
ChEMBL 328738



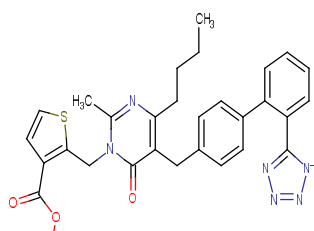
ChEMBL 358359



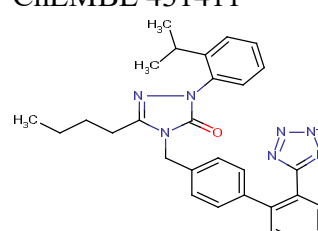
ChEMBL 410417



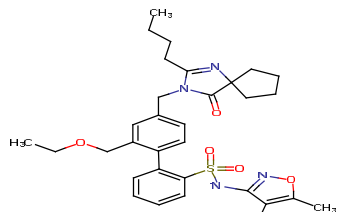
ChEMBL 429847



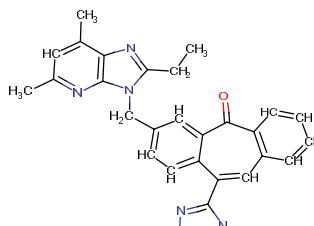
ChEMBL 431411



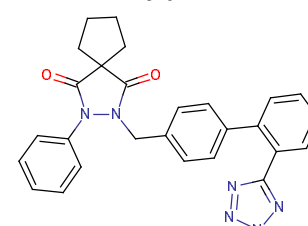
ChEMBL 539423



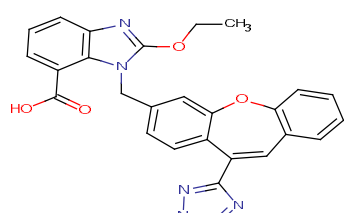
ChEMBL 90027



ChEMBL 90411



ChEMBL 91928



ChEMBL 96552

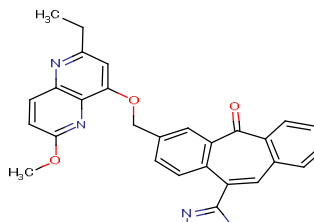


Tabela 3. Pregled AT<sub>1</sub> blokatora trening seta (I dio)

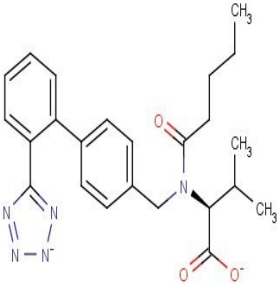
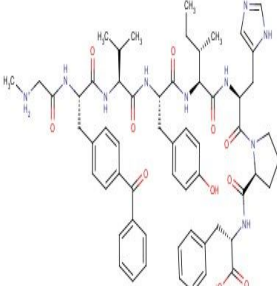
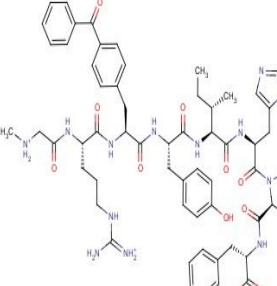
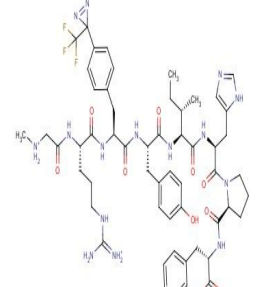
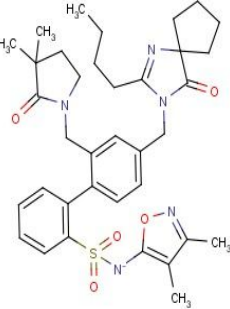
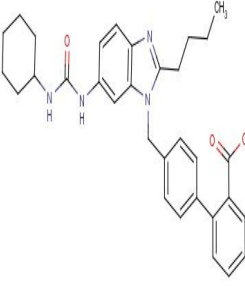

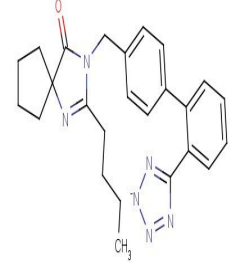
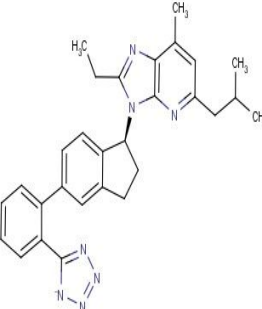
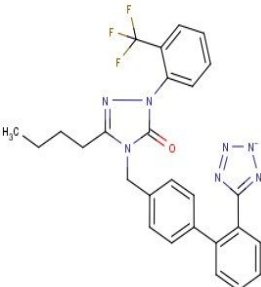
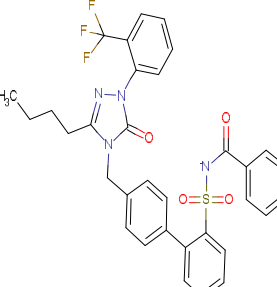
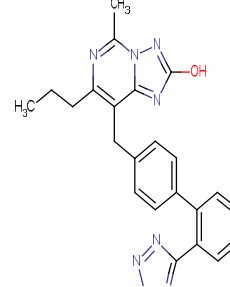
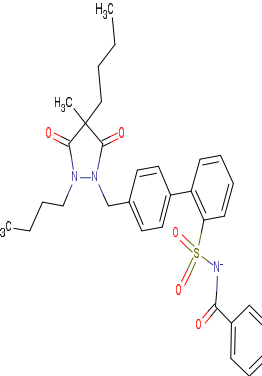
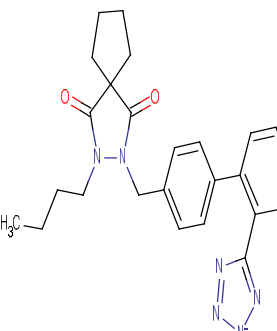
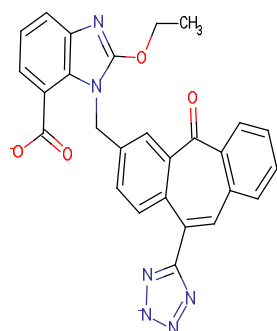
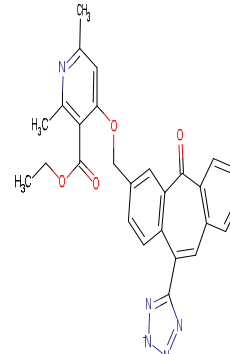
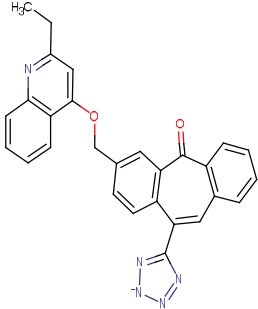
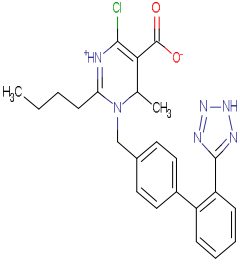
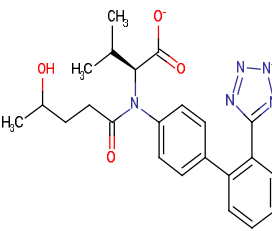
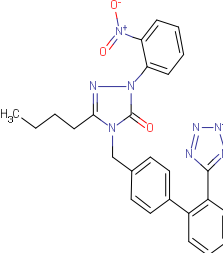
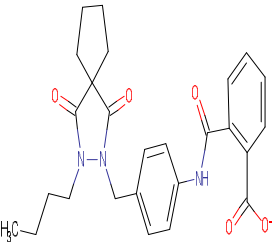
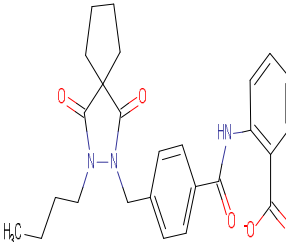
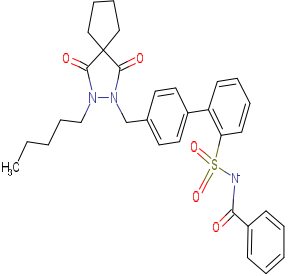
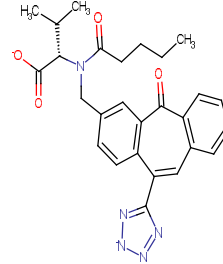
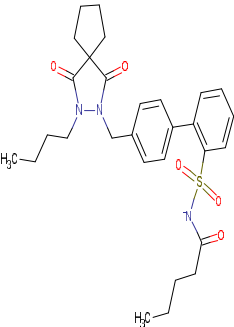
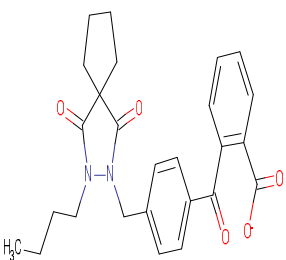
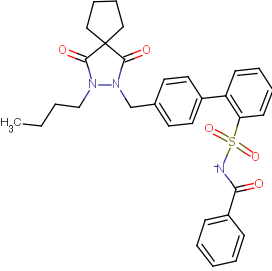
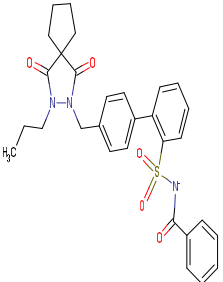
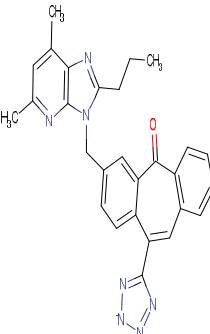
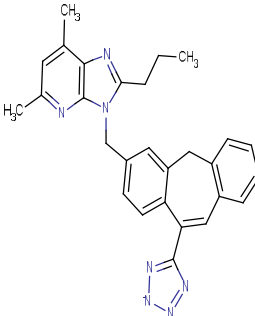
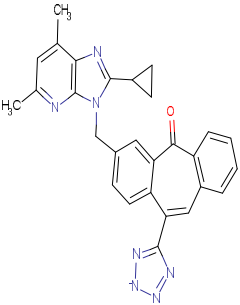
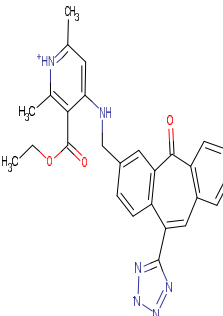
ChEMBL1069	ChEMBL1076601	ChEMBL1076603	ChEMBL1076604
			
ChEMBL11706	ChEMBL130896	ChEMBL146275	ChEMBL1513
			
ChEMBL1801740	ChEMBL19018	ChEMBL279629	ChEMBL312104
			
ChEMBL313392	ChEMBL31544	ChEMBL328296	ChEMBL330109
			



Tabela 4. Pregled AT<sub>1</sub> blokatora trening seta (II dio)

ChEMBL330298 	ChEMBL358335 	ChEMBL74767 	ChEMBL87074 
ChEMBL88471 	ChEMBL90187 	ChEMBL90483 	ChEMBL90834 
ChEMBL90872 	ChEMBL90885 	ChEMBL91113 	ChEMBL92225 
ChEMBL92950 	ChEMBL93159 	ChEMBL93522 	ChEMBL94106 

## 3.2. HPLC ODREĐIVANJE IRBESARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA

### 3.2.1. Reagensi i hemikalije

U radu su korišteni USP standardi irbesartana i hidrohlorotiazida i tržišno dostupne tablete koje sadrže 150 mg irbesartana i 12.5 mg hidrohlorotiazida. Kao rastvarači korišteni su: metanol (Chromasolv, Sigma Aldrich), tetrahidrofuran (Chromasolv, Sigma Aldrich) i redestilovana voda. Za pripremu pufera su korišteni natrium acetat trihidrat (Sigma Aldrich) i acetatna kiselina p.a. (Fluka). Svi korišteni rastvarači su hromatografskog stepena čistoće.

### 3.2.2. Aparatura

Hromatografsko razdvajanje je vršeno na HPLC sistemu Thermo Finnigan Surveyor sa PDA detektorom i fiksnom petljom za uzorkovanje od 5  $\mu$ L.

### 3.2.3. Hromatografski uslovi

Za razdvajanje je korištena hromatografija na obrnutim fazama na C18 koloni (Supelcosil LC-18-DB 150 x 4.6, 5 $\mu$ m). Kao mobilna faza korištena je smjesa rastvarača koju čini eksperimentalnim dizajnom utvrđen međusobni omjer tetrahidrofurana, metanola i acetatnog pufera, hromatografskog stepena čistoće. Brzina protoka mobilne faze je 0.75 mL/min, volumen injektovanja 5 $\mu$ L, a detekcija na 271 nm. Mobilna faza je filtrirana kroz najlonski filter promjera pora 0.45  $\mu$ m. Razdvajanje je izokratsko, a temperatura, pH i sastav mobilne faze su varirani prema dizajnu eksperimenta.

### 3.2.4. Definisanje metode

Primjenom punog faktorskog dizajna 2<sup>3</sup> ispitani su uticaji faktora: temperatura kolone, pH mobilne faze i udjela metanola u mobilnoj fazi. HPLC metoda je optimizovana korištenjem RSM metode.

### 3.2.5. Priprema osnovnog rastvora (*stock* otopina)

Odvagano je 20 mg irbesartana i 5 mg hidrohlorotiazida, te preneseno u odmjerni sud od 25 mL, otopljeno metanolom i dopunjeno istim do oznake (*stock* otopina). Koncentracije irbesartana i hidrohlorotiazida su 0.8 i 0.2 mg/mL.

### 3.2.6. Priprema rastvora za analizu

U odmjerni sud od 10 mL je preneseno 1 mL *stock* otopine i dopunjeno metanolom do oznake. Ovaj rastvor je korišten za ispitivanje uticaja faktora na proces razdvajanja i za optimizaciju metode.

### 3.2.7. Kalibraciona kriva

U odmjerne sudove od 10 mL je preneseno po 1, 2, 3, 4 i 5 mL *stock* otopine i dopunjeno diluentom (metanol : pufer = 50 : 50) do oznake. Sastav mobilne faze je bio pufer (pH 6.5) : metanol : THF = 43 : 47 : 10 v/v/v, temperatura kolone 25°C i brzina protoka 0.75 mL/min. Nakon mjerenja, konstruisane su kalibracione krive gdje su na apscisu nanese vrijednosti koncentracija irbesartana i hidrohlorotiazida, a na ordinatu pripadajuće vrijednosti područja ispod pika za irbesartan i hidrohlorotiazid. Izračunate su regresione jednačine.

### 3.2.8. Preciznost metode

Odvagano je 1 mg radnog standarda hidrohlorotiazida i 4 mg radnog standarda irbesartana u tamni odmjerni sud od 25 mL, dodan je placebo, otopljeno i dopunjeno metanolom. Otopine su filtrirane kroz najlon filter 0.45 µm i korištene kao uzorci.

### 3.2.9. Tačnost metode

I-Odvagano je 0.8 mg radnog standarda hidrohlorotiazida i 3.2 mg radnog standarda irbesartana u tamni odmjerni sud od 25 mL, potom je dodan placebo,

otopljeno i dopunjeno sa diluentom. Koncentracija dobivenog rastvora je 0.032 mg/mL hidrohlorotiazida i 0.128 mg/mL irbesartana.

II-Odvagano je 1.0 mg radnog standarda hidrohlorotiazida i 4.0 mg radnog standarda irbesartana u tamni odmjerni sud od 25 mL, dodan je placebo, otopljeno i dopunjeno diluentom. Koncentracija dobivenog rastvora je 0.04 mg/mL hidrohlorotiazida i 0.16 mg/mL irbesartana.

III-Odvagano je 1.2 mg radnog standarda hidrohlorotiazida i 4.8 mg radnog standarda irbesartana u tamni odmjerni sud od 25 mL, dodan je placebo, otopljeno i dopunjeno diluentom. Koncentracija dobivenog rastvora je 0.048 mg/mL hidrohlorotiazida i 0.192 mg/mL irbesartana.

### 3.2.10. Postupak HPLC analize

Izvagano je dvadeset tableta, te su usitnjene u tarioniku. Izračunata je srednja vrijednost mase tableta. Zatim je precizno odvagana količina kojoj odgovara 150 mg irbesartana i 12.5 mg hidrohlorotiazida, te prenesena u odmjerni sud od 100 mL u kome se nalazilo 20 mL metanola. Nakon rastvaranja na ultrazvučnom kupatilu dopunjeno je rastvaračem do oznake. Otopina je filtrirana kroz najlonski filter promjera pora 0.45  $\mu\text{m}$ . Od ove otopine je uzeto 2 mL, preneseno u sud od 10 mL i dopunjeno metanolom. Za svaku otopinu urađeno je osam eksperimenata. Korištenjem regresionih jednačina izračunate su koncentracije irbesartana i hidrohlorotiazida.

## 3.3. HPLC ODREĐIVANJE LOSARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA

### 3.3.1. Aparati i softver

Za HPLC analizu korišten je Shimadzu HPLC sistem (Shimadzu Technologies, Kyoto, Japan), pumpa (LC-20AD VP), UV detektor (SPD-20AV VP), kolona Zorbax C<sub>8</sub> (150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), sistem za degasiranje (DGU-20AS). Eksperimentalni dizajn, statistička analiza i izračunavanje funkcije poželjnosti izvedeno je uz pomoć programa *Marvin Sketch* 5.8.2 (Chem Axon Ltd., Somerville, MA, USA, and Budapest, Hungary) i *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0 (Stat-Ease Inc.).

### 3.3.2. Hemikalije i reagensi

Korišteni su standardi supstanci losartana i hidrohlorotiazida (čistoća losartana=100.13 %; hidrohlorotiazida=101.12 %) i tržišno dostupne tablete koje se sastoje od 50 mg losartana i 12.5 mg hidrohlorotiazida. Svi korišteni rastvarači: metanol, acetonitril i natrijum-acetat (Chromosol, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) i acetatna kiselina (Fluka, Eindhoven, The Netherlands) su zadovoljavali stepen čistoće za HPLC analizu.

### 3.3.3. Priprema rastvora standarda

*Stock* otopina koncentracije 1 mg/mL losartana i 0.25 mg/mL hidrohlorotiazida je pripremljena rastvaranjem odgovarajućih odmjerenih količina standarda u metanolu. Rastvori za optimizaciju metode su pripremani prenošenjem 1 mL *stock* otopine u normalni sud od 10 mL i dopunjavanjem metanolom do crte. Koncentracija dobivenog rastvora je: 0.1 mg/mL losartana i 0.025 mg/mL hidrohlorotiazida. Rastvori standarda za konstruisanje kalibracione krive su dobiveni pripremom osam rastvora standarda u koncentracionom rasponu od 0.01 do 0.5 mg/mL losartana i od 0.025 do 0.125 mg/mL hidrohlorotiazida. Za kvantitativnu analizu pripremljena su tri rastvora, čija koncentracija odgovara 80%, 100% i 120% ciljne koncentracije. Da bi se odredila preciznost metode, pripremljeno je po deset rastvora sa tri različite koncentracije (0.2, 0.3 i 0.4 mg/mL za losartan; 0.05, 0.075 i 0.1 mg/mL za hidrohlorotiazid).

### 3.3.4. Rastvori uzoraka

Masa tablete koja odgovara 50 mg losartana i 12.5 mg hidrohlorotiazida (deset tableta je precizno izvagano i usitnjeno u prah) rastvorena je u 50 mL volumetrijskoj posudi sa metanolom, stavljeno na ultrasonično kupatilo i filtrirano. 5 mL filtrata je diluirano sa metanolom do 25 mL.

### 3.3.5. Postupak HPLC analize

Separacija je izvedena na Zorbax C<sub>8</sub> koloni (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) sa detekcijom na 254 nm. Mobilna faza je pripremljena prema planu eksperimenta datom u Tabelama 31-33. Mobilna faza je degasirana i filtrirana kroz 0.45 μm membranski filter (Alltech Associates, Lokeren, Belgium).

### 3.4. HPLC ODREĐIVANJE VALSARTANA, HIDROHLOROTIAZIDA I AMLODIPINA

#### 3.4.1. Aparati i softveri

Za HPLC analizu korišten je Shimadzu HPLC sistem (Shimadzu Technologies, Kyoto, Japan), pumpa (LC-20AD VP), UV detektor (SPD-20AV VP), kolona Zorbax C<sub>8</sub> (150 x 4.6 mm, 5 μm), sistem za degasiranje (DGU-20AS). Eksperimentalni dizajn, statistička analiza i izračunavanje funkcije poželjnosti izvedeno je uz pomoć programa *Marvin Sketch* 5.8.2 (Chem Axon Ltd., Somerville, MA, USA, and Budapest, Hungary) i *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0 (Stat-Ease Inc.).

#### 3.4.2. Hemikalije i reagensi

Korišteni su standardi supstanci valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida (HCT=101.12 %, AML=100.97 %, VAL=100.13 %) i tržišno dostupne tablete koje se sastoje od 25 mg hidrohlorotiazida, 10 mg amlodipina i 160 mg valsartana. Svi korišteni rastvarači: metanol, acetonitril i natrijum-acetat (Chromosol, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) i acetatna kiselina (Fluka, Eindhoven, The Netherlands) su hromatografskog stepena čistoće.

#### 3.4.3. Priprema rastvora standarda

*Stock* otopina je pripremljena rastvaranjem supstance standarda u metanolu tako da se dobije koncentracija 0.25 mg/mL hidrohlorotiazida, 0.1 mg/mL amlodipina i 1.6 mg/mL valsartana. Tri rastvora za optimizaciju metode su pripremani rastvaranjem 1 mL *stock* otopine u 10 mL metanola. Koncentracija dobivenih rastvora je 0.025 mg/mL hidrohlorotiazida, 0.01 mg/mL amlodipina i 0.16 mg/mL valsartana. Pripremljeno je osam rastvora standarda za kalibracionu krivu u koncentracionom rasponu od 0.0125 do 0.125 mg/mL za hidrohlorotiazid, od 0.005 do 0.05 mg/mL za amlodipin i od 0.08 do 0.8 mg/mL za valsartan. Rastvori za određivanje preciznosti pripremljeni su kao laboratorijska smjesa koja sadrži rastvove hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana u odnosu istom kao kod ispitivanih tableta. Za kvantitativnu analizu pripremljena su tri

rastvora, čija koncentracija odgovara 80%, 100% i 120% ciljne koncentracije, odnosno, pripremljene su tri serije koncentracija: 0.025, 0.05, i 0.075 mg/mL za hidrohlorotiazid; 0.01, 0.02, i 0.03 mg/mL za amlodipin, 0.08, 0.16, i 0.24 mg/mL za valsartan, sa deset rastvora za svaku koncentraciju.

#### **3.4.4. Rastvor uzorka**

Masa tablete koja odgovara 25 mg hidrohlorotiazida, 10 mg amlodipina and 160 mg valsartana (deset tableta je precizno izvagano i usitnjeno u prah) rastvorena je u 50 mL volumetrijskoj posudi sa metanolom, stavljeno na ultrasonično kupatilo i filtrirano. 5 mL filtrata je diluirano sa metanolom do 25 mL.

#### **3.4.5. Postupak HPLC analize**

Separacija je izvedena na Zorbax C<sub>8</sub> koloni (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) sa detekcijom na 254 nm. Mobilna faza je pripremljena prema planu eksperimenta datom u Tabeli 41. Rezultujuća mobilna faza je degasirana i vakum filtrirana kroz 0.45 μm membranski filter (Alltech Associates, Lokeren, Belgium).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

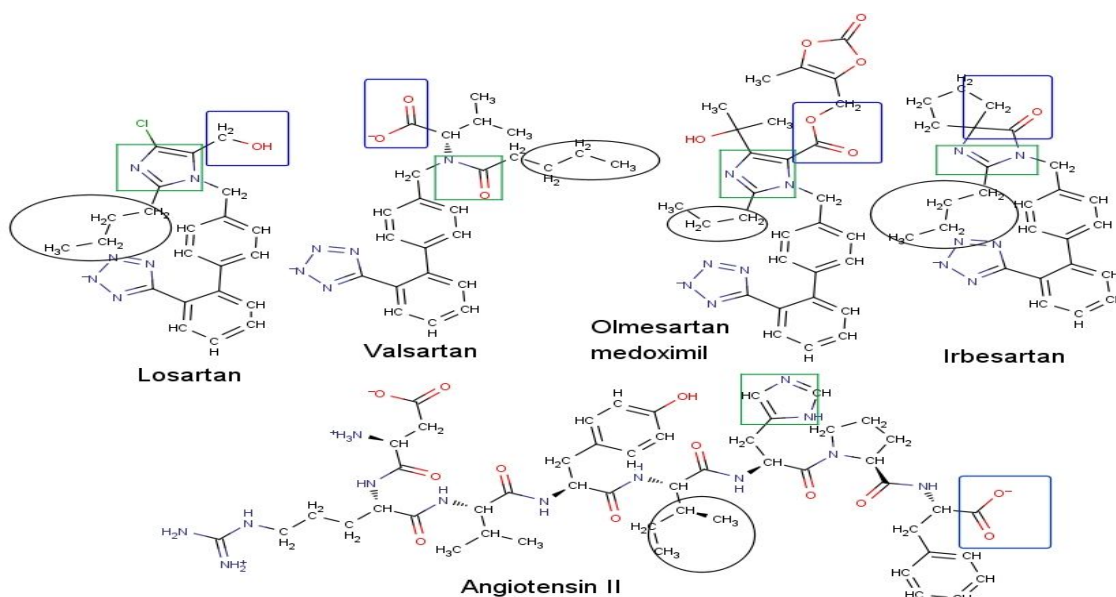


## 4.1. 3D-QSAR STUDIJA BLOKATORA AT<sub>1</sub> RECEPTORA

3D-QSAR studija je izvedena sa setom od 49 AT<sub>1</sub> blokatora, od kojih je 32 služilo kao trening set (Tabela 3 i 4), a 17 kao test set (Tabela 2). Primijenjena je PLS regresija za selekciju najrelevantnijih molekulskih deskriptora i formiranje 3D-QSAR modela.

### 4.1.1. Kreiranje i validacija 3D-QSAR modela blokatora AT<sub>1</sub> receptora

3D-QSAR analizom blokatora AT<sub>1</sub> receptora došlo se do zaključka o tri značajne strukturne karakteristike za aktivnost: prisustvo karboksilatnog anjona (ili bioizostera) AT<sub>1</sub> blokatora (koji odgovara položaju karboksilata u strukturi angiotenzina II), imidazolni prsten (i njegovi bioizosteri) AT<sub>1</sub> blokatora (koji odgovara položaju imidazolu His<sup>6</sup> rezidue) i *n*-butil grupa AT<sub>1</sub> blokatora (koja odgovara položaju ugljovodoničnog lanca Ile<sup>5</sup> rezidue) (Slika 17).



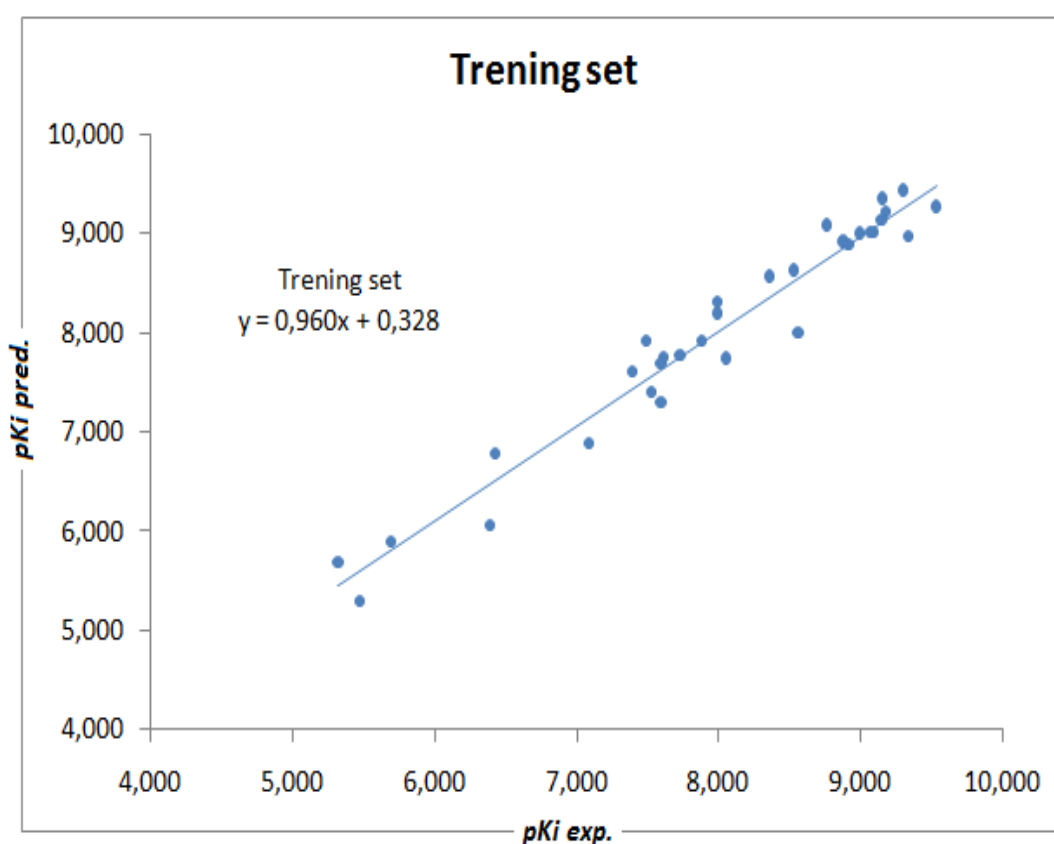
**Slika 17.** Strukturne karakteristike AT<sub>1</sub> blokatora i angiotenzina II

Strukturne varijance svih molekula su analizirane metodom analize glavnih komponenti (PCA) na kompletnom setu GRIND deskriptora, dok su vrijednosti GRIND deskriptora i aktivnosti ispitivanih jedinjenja upotrebljene za formiranje 3D-QSAR modela primjenom regresione metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS). U Tabeli 5 prikazane su eksperimentalno određene i 3D-QSAR predviđene *pKi* vrijednosti za jedinjenja trening i test seta.

**Tabela 5.** Eksperimentalno određene (*exp*) i predviđene (*pred*) vrijednosti *pKi* trening i test seta molekula

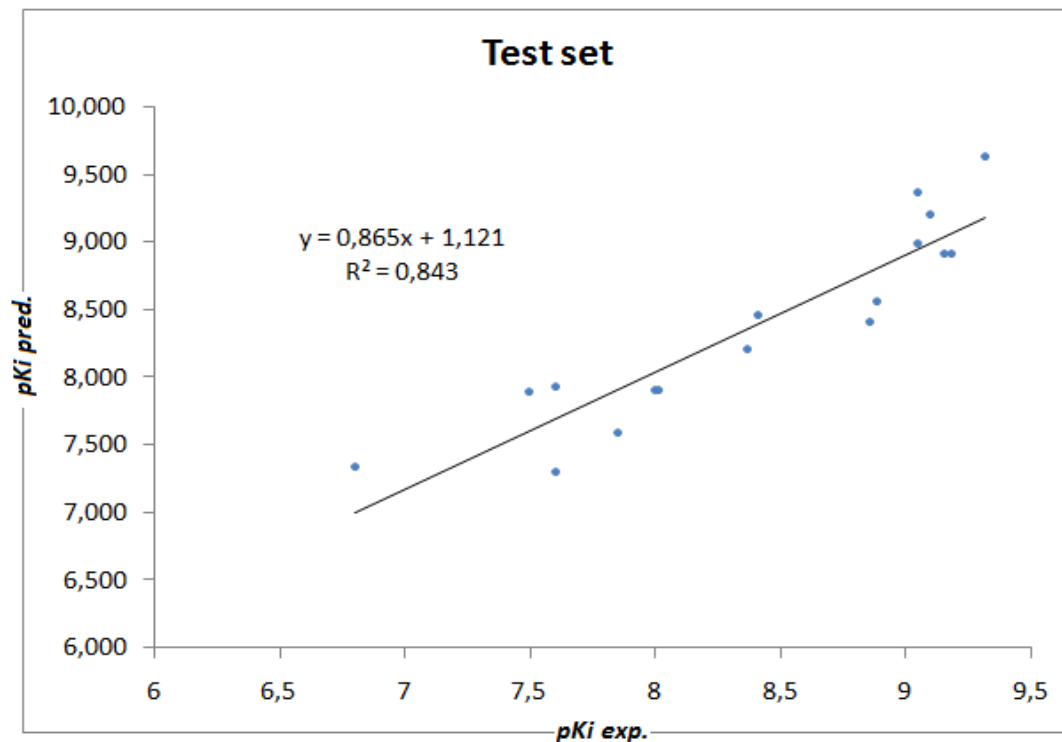
Br	Trening set			Test set		
	CHEMBL ID	<i>pKi</i> exp.	<i>pKi</i> pred.	CHEMBL ID	<i>pKi</i> exp.	<i>pKi</i> pred.
1	ChEMBL1069	5.328	5.690	ChEMBL1076602	7.607	7.936
2	ChEMBL1076601	7.738	7.776	ChEMBL1076633	9.046	9.376
3	ChEMBL1076603	9.155	9.135	ChEMBL1668000	8.000	7.908
4	ChEMBL1076604	8.886	8.922	ChEMBL313392	7.495	7.902
5	ChEMBL11706	8.000	8.200	ChEMBL31544	7.602	7.299
6	ChEMBL130896	7.538	7.400	ChEMBL327633	8.367	8.215
7	ChEMBL146275	7.097	6.886	ChEMBL327903	8.886	8.569
8	ChEMBL1513	9.097	9.013	ChEMBL328738	8.018	7.907
9	ChEMBL1801740	9.161	9.354	ChEMBL358359	7.854	7.592
10	ChEMBL19018	8.921	8.886	ChEMBL410417	9.155	8.918
11	ChEMBL279629	8.770	9.088	ChEMBL429847	9.046	8.993
12	ChEMBL312104	7.620	7.753	ChEMBL431411	8.854	8.420
13	ChEMBL313392	7.495	7.923	ChEMBL539423	9.097	9.209
14	ChEMBL31544	7.602	7.306	ChEMBL90027	9.18	8.919
15	ChEMBL328296	8.569	7.998	ChEMBL90411	6.801	7.345
16	ChEMBL330109	8.367	8.568	ChEMBL91928	8.409	8.467
17	ChEMBL330298	9.187	9.223	ChEMBL96552	9.319	9.637
18	ChEMBL358335	9.000	9.008			
19	ChEMBL74767	6.432	6.784	<b>Trening set</b>		
20	ChEMBL87074	9.071	9.010	<i>RMSEE</i>	0.239	
21	ChEMBL88471	6.400	6.060	<i>R</i> <sup>2</sup>	0.978	
22	ChEMBL90187	5.701	5.896	<i>Q</i> <sup>2</sup>	0.956	
23	ChEMBL90483	7.602	7.696			
24	ChEMBL90834	8.060	7.747	<b>Test set</b>		
25	ChEMBL90872	7.886	7.914	<i>RMSEP</i>	0.288	
26	ChEMBL90885	5.481	5.296	<i>R</i> <sup>2</sup> <sub>Obs. vs. Pred.</sub>	0.918	
27	ChEMBL91113	8.000	8.311	<i>Q</i> <sup>2</sup> <sub>test</sub>	0.843	
28	ChEMBL92225	7.398	7.611			
29	ChEMBL92950	9.538	9.275			
30	ChEMBL93159	9.310	9.437			
31	ChEMBL93522	9.347	8.975			
32	ChEMBL94106	8.538	8.631			

Frakcioni faktorski dizajn (FFD) je upotrebljen za izbor najvažnijih varijabli sa ciljem da se kreira *3D-QSAR* model sa optimalnim statističkim parametrima koji najbolje opisuje ispitivane AT<sub>1</sub> blokatore. Na osnovu dobivenih vrijednosti statističkih parametara trening seta *RMSEE*,  $R^2$  i  $Q^2$  ( $RMSEE=0.239$ ;  $R^2=0.978$ ;  $Q^2=0.956$ ) i test seta ( $RMSEP=0.288$ ;  $R^2_{\text{Obs. vs. Pred.}}=0.918$ ; i  $Q^2_{\text{test}}=0.843$ ) izabran je optimalan trokomponentni *3D-QSAR* model za dalju studiju farmakofora i dizajn novih AT<sub>1</sub> blokatora.



**Slika 18.** Kriva odnosa *pKi* vrijednosti molekula trening seta

Test set se koristi za eksternu validaciju dobivenog *3D-QSAR* modela. Predviđene *pKi* vrijednosti su poređene sa eksperimentalno određenim vrijednostima. Dobiveni statistički parametri,  $RMSEP=0.288$ ;  $R^2_{\text{Obs. vs. Pred.}}=0.918$ ; i  $Q^2_{\text{test}}=0.843$  pokazuju dobru pouzdanost *3D-QSAR* modela za predviđanje aktivnosti AT<sub>1</sub> blokatora (Tabela 5, Slika 18 i 19), što dokazuje da je ovaj *3D-QSAR* model pouzdan [164,165].



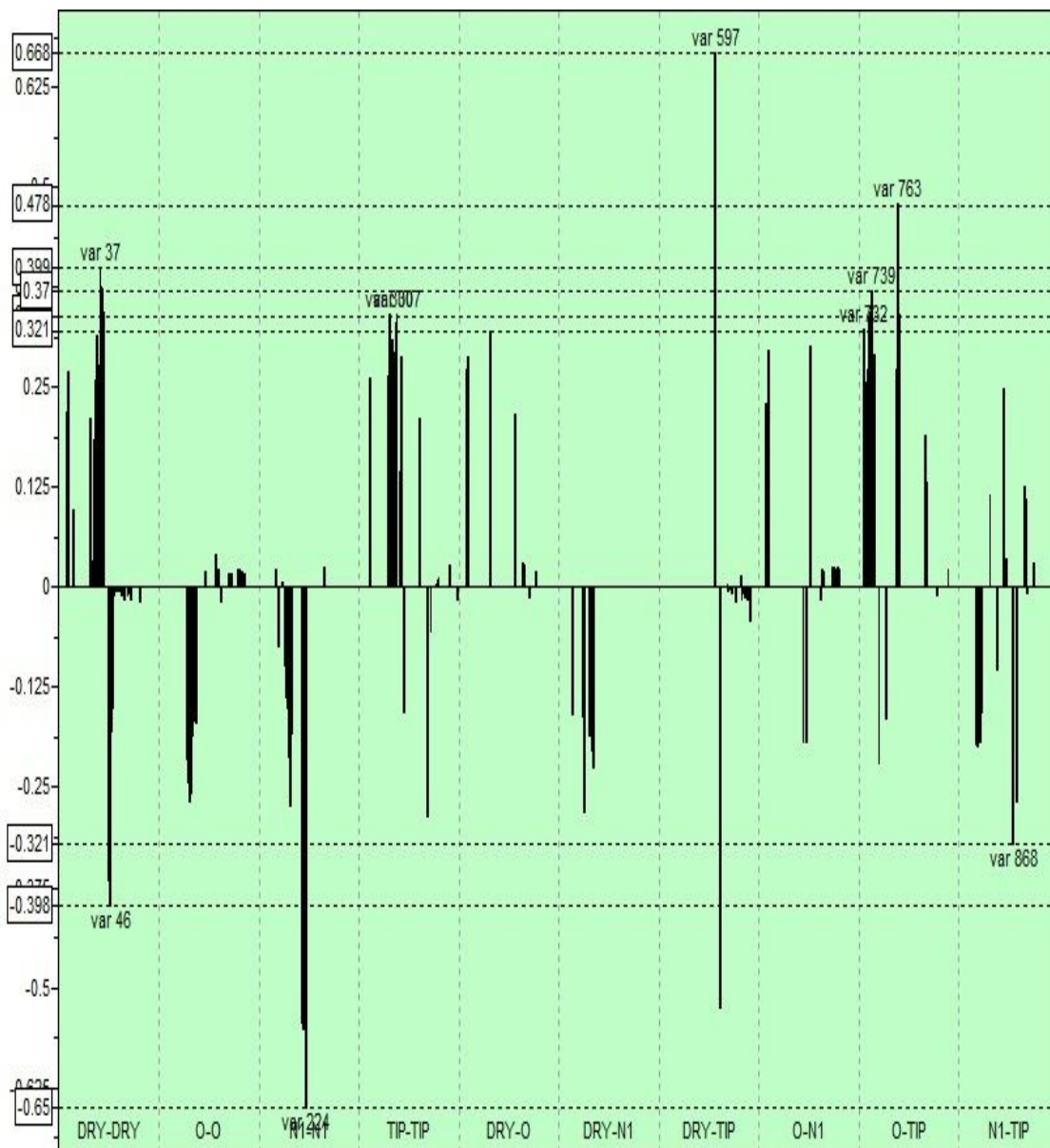
Slika 19. Kriva odnosa  $pKi$  vrijednosti molekula test seta

#### 4.1.2. Određivanje farmakofora blokatora $AT_1$ receptora

Nakon validacije  $3D-QSAR$  modela, određene su i analizirane najvažnije varijable koje utiču na aktivnost  $AT_1$  blokatora. Varijable mogu imati pozitivne i negativne uticaje na aktivnosti molekula.

Rezultati PLS analize dobivenih  $3D-QSAR$  modela prikazani su u obliku histograma PLS koeficijenata koji omogućavaju analizu najuticajnijih varijabli i definisanje farmakofornih karakteristika. Apscisa je podijeljena na dijelove koji reprezentuju autokorelograme (DRY-DRY; O-O; N1-N1; TIP-TIP) i kroskorelograme (DRY-O; DRY-N1; DRY-TIP; O-N1; O-TIP; N1-TIP). Varijable sa pozitivnim vrijednostima  $y$  pozitivno korelišu sa aktivnošću i obrnuto (varijable sa negativnim vrijednostima  $y$  smanjuju aktivnost).

Prikaz koeficijenata sa najznačajnijim varijablama za aktivnost  $AT_1$  blokatora je prikazan na Slici 20. Varijable sa najvećim uticajem na aktivnost  $AT_1$  blokatora su: V868 (N1-TIP), V46 (DRY-DRY), V224 (N1-N1), V732 (O-TIP), V739(O-TIP), V763 (O-TIP), V37 (DRY-DRY), V597 (DRY-TIP), V300 (TIP-TIP), V307 (TIP-TIP).



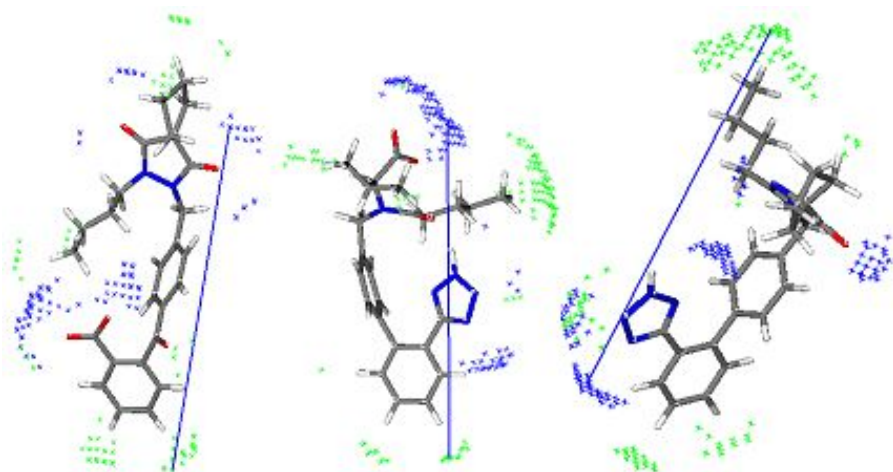
**Slika 20.** Histogrami PLS koeficijena sa najvažnijim varijablama formiranog 3D-QSAR modela

Varijable koje negativno utiču na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora su: V868 (N1-TIP), V46 (DRY-DRY) i V224 (N1-N1). Varijable V732 (O-TIP), V739 (O-TIP), V763 (O-TIP), V37 (DRY-DRY), V597 (DRY-TIP), V307 (TIP-TIP) i V379 (TIP-TIP) pozitivno utiču na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora (Tabela 6).

Tabela 6. Pregled GRIND varijabli i odgovarajućih rastojanja

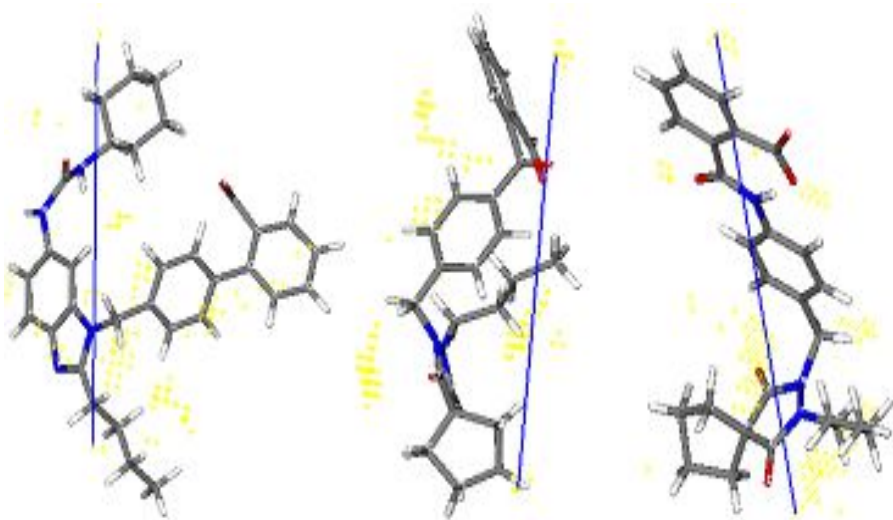
VAR	Korelogram	Rastojanje	Var. Koeficijenti	Napomena
V868	N1-TIP	19.6-20.0 Å	-0.321	Akceptor H-veze, tetrazolna N-grupa ili O-most, udaljen od sterne tačke.
V46	DRY-DRY	18.4-18.8 Å	-0.398	Rastojanje koje razdvaja hidrofobni oblak fenil, bifenil ili alifatski lanac nije optimalno. Negativno doprinosi <i>pKi</i> vrijednosti.
V224	N1-N1	16.8-17.2 Å	-0.630	Predstavlja rastojanje između dva akceptora vodika, tetrazolnog N ili karboskilne grupe u molekuli.
V732	O-TIP	1.6-2.0 Å	0.321	Povećanje rastojanja između donora H veze, N-grupe tetrazola i bifenila, fenila ili alifatskog lanca daje pozitivan doprinos <i>pKi</i> vrijednosti.
V739	O-TIP	4.4-4.8 Å	0.370	
V763	O-TIP	14.0-14.4 Å	0.478	
V37	DRY-DRY	14.8-15.2 Å	0.399	Optimalno rastojanje dva hidrofobna bifenila, fenil ili alifatske grupe.
V597	DRY-TIP	20.4-20.8 Å	0.668	Optimalno rastojanje dva bifenila, fenil ili alifatske grupe ima pozitivan uticaj na vrijednost <i>pKi</i> .
V300	TIP-TIP	10.8-11.2 Å	0.339	Optimalno rastojanje između dvije sterne tačke u molekuli.
V307	TIP-TIP	13.6-14.0 Å	0.339	

*N1-TIP* varijabla (V868) (Slika 21) koja predstavlja rastojanje između akceptora vodikove veze, karboksilne grupe ili tetrazolnog prstena i topološkog područja oko benzenovog prstena ili alifatskog lanca ima negativan uticaj na aktivnost blokatora  $AT_1$  receptora. Skoro sve molekule trening seta imaju ovu varijablu, a ne posjeduju je molekule ChEMBL (146273, 19018, 31544, 328296, 87074, 90483, 90872, 91113 i 92225).



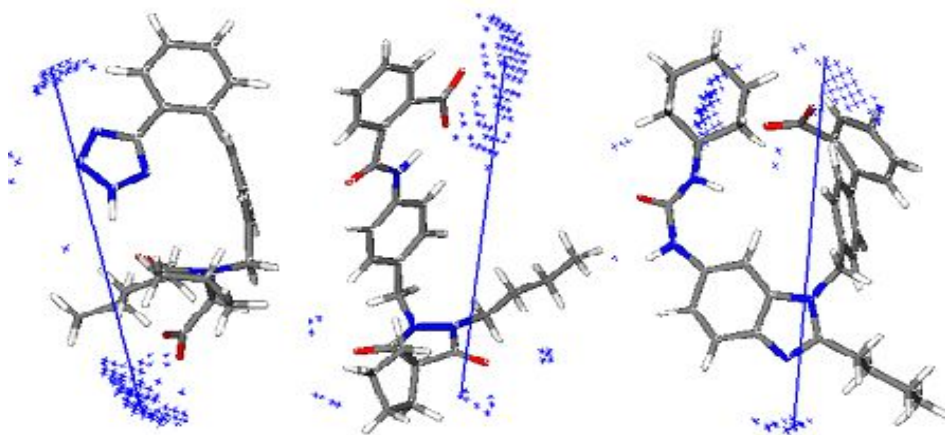
**Slika 21.** V868 N1-TIP, varijabla koja negativno utiče na  $pK_i$  vrijednost  $AT_1$  blokatora

*DRY-DRY* varijabla (V46) (Slika 22) koja definiše rastojanje između hidrofobnog oblaka benzenovog prstena i alifatskog lanca ima negativan doprinos prema aktivnosti  $AT_1$  blokatora. V46 je prisutna u nekoliko molekula trening seta ChEMBL (1076601, 1076603, 130869, 313392, 88471, 90187, 90834 i 90885).



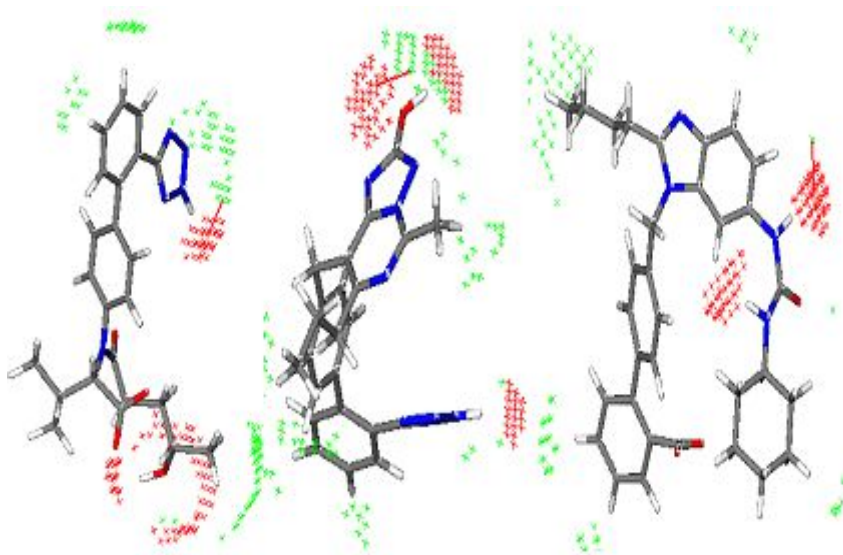
**Slika 22.** V46 DRY-DRY, negativan uticaj na  $pK_i$  vrijednosti  $AT_1$  blokatora

*NI-NI* varijabla (V224) (Slika 23) je nepoželjna varijabla nastala između dva oblaka akceptora vodika, kao što su karboksil, karbonil, tetrazol i amino funkcionalne grupe. Varijabla V224 je prisutna kod 21 molekule trening seta, dok kod ostalih 11 molekula trening seta ChEMBL (1076603, 19018, 279629, 313392, 31544, 330298, 87074, 90483, 90872, 91113 i 92225) ova varijabla nije formirana.



**Slika 23.** V224 (N1-N1), visok negativan uticaj na  $pK_i$  vrijednosti  $AT_1$  blokatora

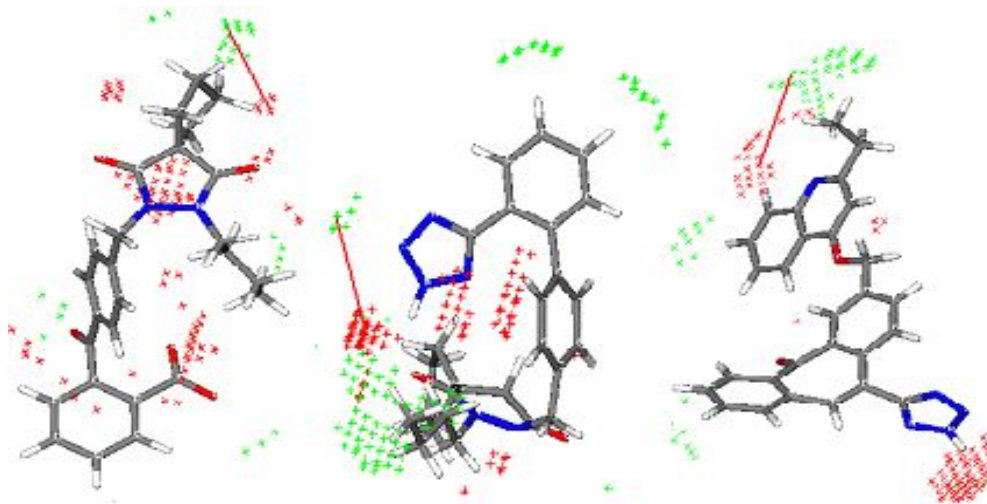
Varijabla *O-TIP* (V732) (Slika 24) predstavlja rastojanje između donora vodikove veze, tetrazolnog azota, ili amina, kisika u hidroksilnoj grupi i sternih topoloških regiona tetrazola ili benzena pokazuje pozitivan uticaj na aktivnost  $AT_1$  blokatora. Varijabla V732 se formira kod 13 molekula trening seta: ChEMBL (1076603, 1076604, 130896, 1513, 328296, 330109, 330298, 74767, 90834, 92950, 93159, 93522 i 94106).



**Slika 24.** (O-TIP) pozitivan uticaj na  $pK_i$  vrijednosti.

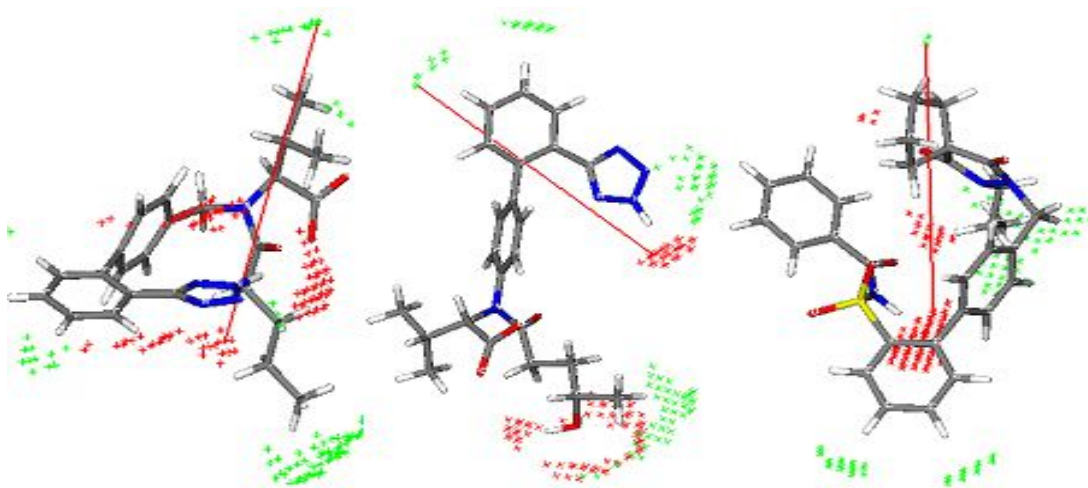


*O-TIP* varijabla (V739) (Slika 25) koja definiše rastojanje između oblaka donora vodika, kao što je tetrazolni azot, azot sekundarnog amina ili karbonilna grupa i sterne tačke, ima pozitivan uticaj na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora. V739 varijabla je prisutna u većini molekula trening seta, osim kod ChEMBL (11706, 279629, 90483, 91113 i 92225).



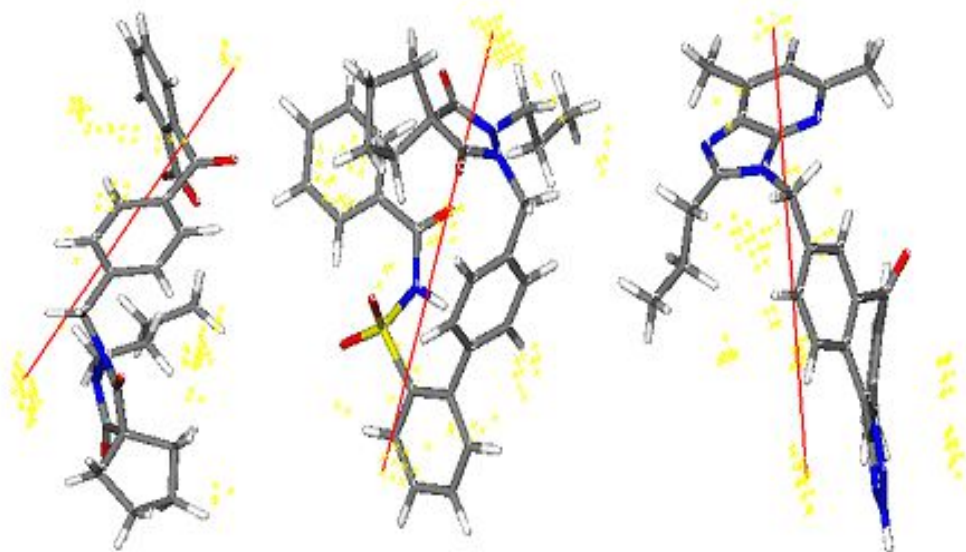
**Slika 25.** V739 (O-TIP), rastojanje između donora vodika i sternog centra pozitivno utiče na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora

*O-TIP* varijabla (V763) (Slika 26) između donora vodika, kao što je tetrazolni azot ili amin, i sterne tačke, ima pozitivan uticaj na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora. Ova varijabla je prisutna kod svih molekula trening seta.



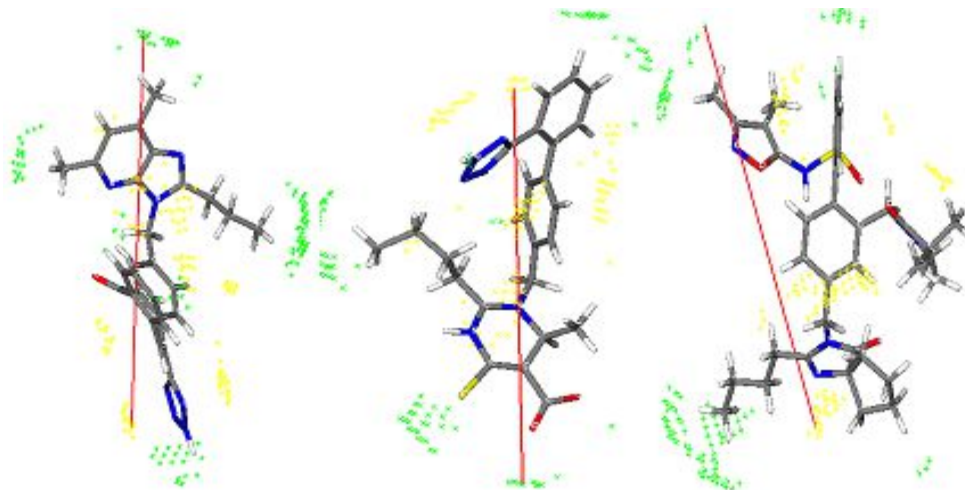
**Slika 26.** V763 (O-TIP) pozitivno utiče na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora u svim molekulama trening seta

*DRY-DRY* varijabla (V37) (Slika 27) se formira između dva hidrofobna centra u strukturi ispitivanih molekula, te ima pozitivan uticaj na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora.



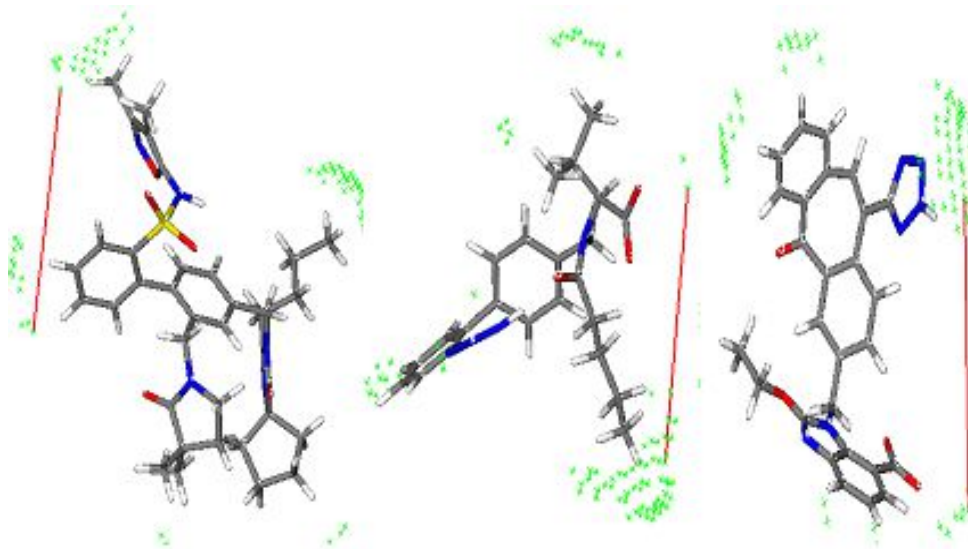
**Slika 27.** V37 (DRY-DRY) između dva hidrofobna centra pozitivno utiče na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora

*DRY-TIP* varijabla (V597) (Slika 28) između hidrofobnog regiona i sternog centra ima najveći pozitivan uticaj na aktivnost ispitivanih AT<sub>1</sub> blokatora. V597 je prisutna kod većine molekula trening seta, a ChEMBL (1069, 146273, 312104, 31544, 328296, 74767, 90483, 90872, 91113, 92225) je ne posjeduju.

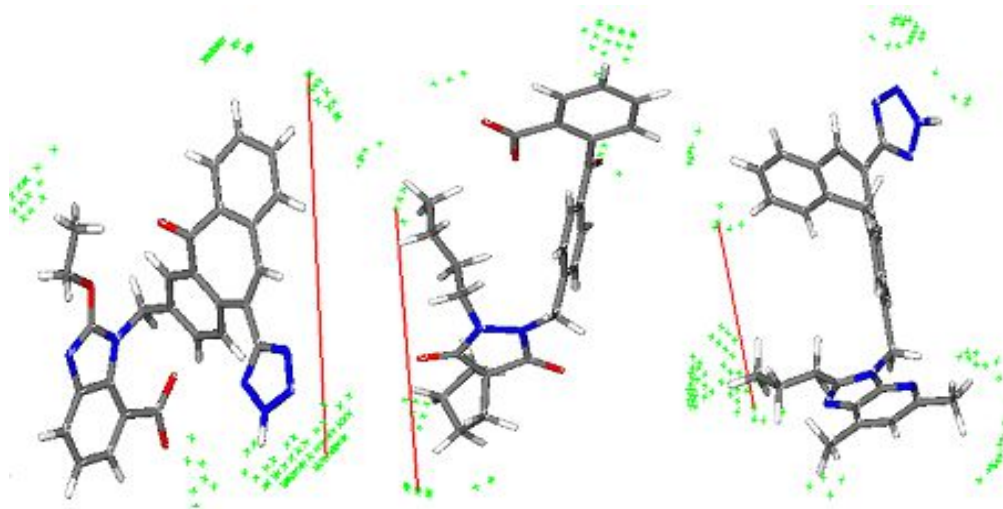


**Slika 28.** V597 (DRY-TIP), formirana između hidrofobnog regiona i sternog centra pozitivno utiče na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora

*TIP-TIP* varijable (V300 i V307) (Slika 29 i 30) između sternih centara alifatskih grupa i benzenovog prstena ima pozitivan uticaj na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora. Obje varijable su prisutne u svim molekulama trening seta.

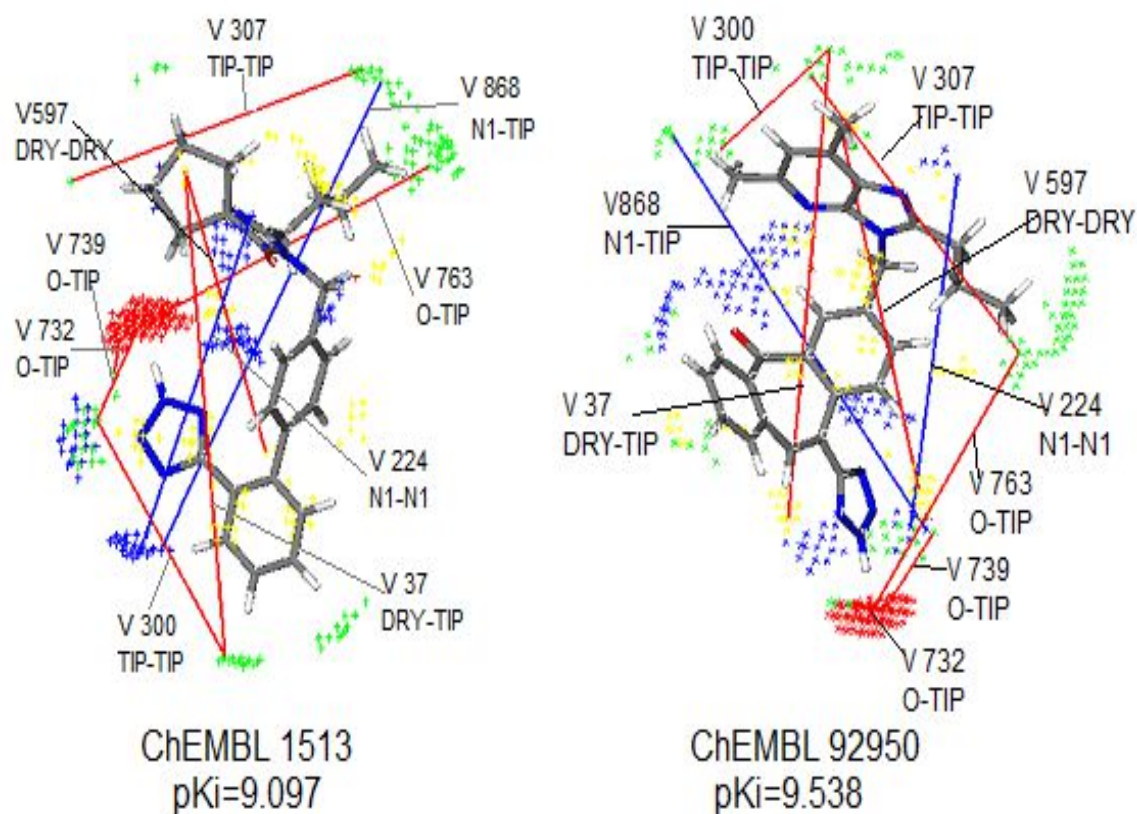


**Slika 29.** V300 (TIP-TIP), između sternih centara pozitivno utiče na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora.



**Slika 30.** V307 (TIP-TIP) između sternih centara pozitivno utiče na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora

Dvije molekule u trening setu, ChEMBL92950 i ChEMBL1513 pokazuju veliku aktivnost kod različitih tipova AT<sub>1</sub> blokatora. Ova dva liganda predstavljaju dobre polazne strukture za dizajniranje novih antagonista AT<sub>1</sub> receptora koje će imati veći potencijal vezivanja za ovaj receptor.



**Slika 31.** 3D-farmakofore ChEMBL 1513 i ChEMBL 92950 molekula trening seta odabranih kao polazna jedinjenja za modeliranje i dizajniranje novih AT<sub>1</sub> blokatora.

Varijable koje utiču pozitivno na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora označene su crveno, a varijable koje negativno utiču na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora označene su plavo.

Slika 31 pokazuje varijable sa pozitivnim i negativnim uticajem na aktivnost ChEMBL 1513 i ChEMBL 92950 molekula trening seta odabranih kao polazna jedinjenja za modeliranje i dizajniranje novih AT<sub>1</sub> blokatora. Da bi se dizajnirao AT<sub>1</sub> blokator sa većom aktivnosti, trebale bi se dodatno potencirati varijable koje imaju pozitivan uticaj na aktivnost blokatora AT<sub>1</sub> receptora.

U obje strukture (Slika 31) su prisutni alkilni lanci i biciklusi sa azotom kao mjesta gdje bi se mogla dodati hidrofobna grupa, alkilni lanac ili voluminozna grupa. Strukturna modifikacija ovih molekula bazirana je na povećavanju vrijednosti uticaja varijabli (V732: O-TIP, V739: O-TIP, V763: O-TIP, V37: DRY-DRY, V597: DRY-TIP, V300: TIP-TIP i V307: TIP-TIP) koje imaju pozitivan uticaj na njihovu aktivnost.

Sve specifične GRID varijable sa pozitivnim uticajem na aktivnost (V732: O-TIP, V739: O-TIP, V763: O-TIP, V37: DRY-DRY, V597: DRY-TIP, V300: TIP-TIP i V307: TIP-TIP) pokazuju da je optimalna udaljenost između tetrazola i bifenilne/fenilne grupe, kao i između bifenilne/fenilne grupe i alifatskog lanca neophodna za aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora.

Ovi rezultati su poređeni sa skoro objavljenom kristalnom strukturom humanog AT<sub>1</sub> receptora u kompleksu sa antagonistom ZD7155 na 2.9-Å rezoluciji. AT<sub>1</sub> receptor-ZD7155 kompleks kristalne strukture pokazuje ključne interakcije tetrazolnog prstena i karbonilne grupe sa Arg<sup>167</sup>, alifatskog lanca sa Tyr<sup>35</sup> i bifenilnog prstena sa drugim aminokiselinama na aktivnom mjestu AT<sub>1</sub> receptora [166]. Nadalje, rezultati daju dobre uvide u funkciju AT<sub>1</sub> receptora i važne interakcije koje bi trebali da ostvare novi AT<sub>1</sub> blokatori. Vrlo dobro slaganje između 3D-farmakofora AT<sub>1</sub> blokatora i vezujućeg modela AT<sub>1</sub> receptor-ZD7155 kompleksa potvrđuje visok kvalitet izvedene 3D-QSAR studije.

#### 4.1.3. Dizajniranje novih blokatora AT<sub>1</sub> receptora

Od polaznih jedinjenja za modeliranje i dizajniranje novih AT<sub>1</sub> blokatora (Slika 31) izvedeno je 30 novih molekula prikazanih u Tabeli 7. Validirani 3D-QSAR model je korišten da se predvide vrijednosti *pKi* novih 30 molekula.

Na osnovu rezultata 3D-QSAR analize izdvojeno je pet molekula ChEMBL (1513-7, 1513-15, 92950-7, 92950-8, 92950-9) kao potencijalno najaktivnijih blokatora AT<sub>1</sub> receptora.

Zaključeno je da aktivnost molekule raste ako je ciklopropil grupa vezana za ugljik pozicioniran između dva azota u imidazolnom prstenu (R1). Vezivanje alkilnog lanca sa karbonilnom grupom za isto mjesto pozitivno doprinosi aktivnosti molekule (ChEMBL 1513). Sa druge strane, ciklopropilna grupa kod ChEMBL 92950 na poziciji R2 smanjuje aktivnost molekule. Molekula sa najvećom aktivnosti ima dvije jednostavne alkilne grupe kao supstituente.

Tabela 7. Najpotentniji AT<sub>1</sub> blokatori i dizajnirane nove strukture

CHEMBL1513; <i>pKi</i> =9.013					CHEMBL92950; <i>pKi</i> =9.275			
CHEMBL	R1	R2	R3	<i>pKi</i> pred.	CHEMBL	R1	R2	<i>pKi</i> pred.
1513-1	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	-	-	8.952	92950-1	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	8.800
1513-2	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-	8.950	92950-2	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	8.910
1513-3	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-	8.961	92950-3	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Δ	-CH <sub>3</sub>	7.888
1513-4	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-	8.780	92950-4	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-Δ	8.655
1513-5	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Δ	-	-	8.810	92950-5	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Δ	-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	7.809
1513-6	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Δ	-CH <sub>3</sub>	-	9.038	92950-6	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	9.093
1513-7	-Δ	-	-	9.288	92950-7	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	9.494
1513-8	-Δ	-CH <sub>3</sub>	-	8.448	92950-8	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	9.499
1513-9	-Δ	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	8.523	92950-9	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -O-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	9.357
1513-10	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	8.933	92950-10	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>3</sub>	8.694
1513-11	-CH <sub>2</sub> -Δ	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	8.290	92950-11	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -C(=O)-CH <sub>3</sub>	8.478
1513-12	-CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	7.978	92950-12	-(CH <sub>2</sub> )-C(=O)-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	7.833
1513-13	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	-	-CH <sub>3</sub>	7.401	92950-13	-CH <sub>2</sub> -Δ	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	8.505
1513-14	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -C(=O)-CH <sub>3</sub>	-	-CH <sub>3</sub>	8.870	92950-14	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-Δ	8.547
1513-15	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -C(=O)-CH <sub>3</sub>	-	-CH <sub>3</sub>	9.382	92950-15	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>3</sub>	9.082

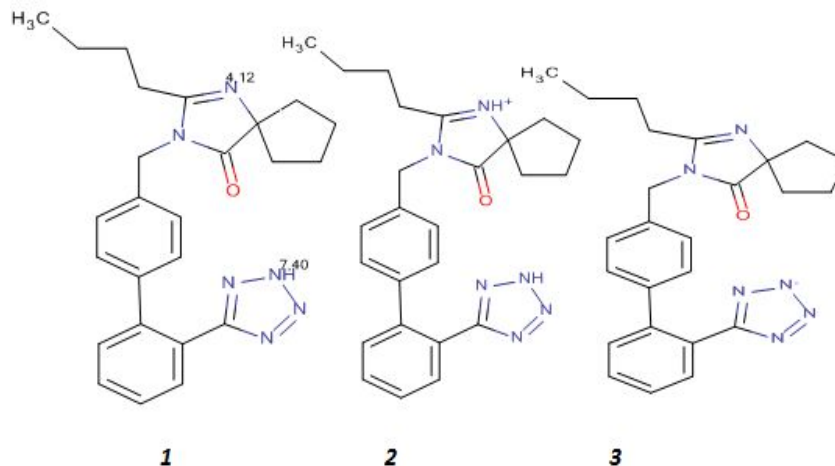
## 4.2. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE IRBESARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA

### 4.2.1. Odabir parametara optimizacije i analiza strukture

Za optimizaciju i validaciju nove RP-HPLC metode za istovremeno određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida u kombinovanim farmaceutskim oblicima korištena je metodologija eksperimentalnog dizajna. U radu su korišteni puni faktorski dizajn (FFD) i metoda površine odgovora (RSM). Faktorskim dizajnom određeni su faktori koji imaju najvažniju ulogu, dok je metoda površine odgovora korištena da bi se pronašao opseg u kome se javljaju optimalni rezultati ispitivanja. Istraživanje je provedeno u nekoliko koraka. Prvi korak u istraživanju je bio da se izvrši analiza faktora koji potencijalno mogu uticati na hromatografske procese, odnosno, da se definišu nezavisne varijable. Na temelju preliminarnih istraživanja odabrana su tri faktora, nezavisne varijable, čiji uticaj će se ispitivati: sadržaj metanola u mobilnoj fazi - faktor A, pH mobilne faze - faktor B i temperatura kolone - faktor C. Kao zavisne varijable odabrano je pet odgovora: rezolucija, simetrija pika irbesartana, simetrija pika hidrohlorotiazida, vrijeme zadržavanja irbesartana i vrijeme zadržavanja hidrohlorotiazida. Kako bi se utvrdilo koji faktori imaju uticaj na ispitivani odgovor korišten je puni faktorski dizajn  $2^3$ , gdje su ispitivani faktori na dva različita nivoa "niski" i "visoki". Nakon toga, eksperimentalni dizajn je korišten za optimizaciju ispitivanih parametara u prethodno odabranim granicama eksperimenta. Optimalni eksperimentalni prostor optimizovan je primjenom Derringer-ove funkcije. Nakon optimizacije, metoda je validirana i uspješno primijenjena na razdvajanje irbesartana i hidrohlorotiazida i njihovo određivanje u komercijalno dostupnim tabletama.

Odabir faktora:

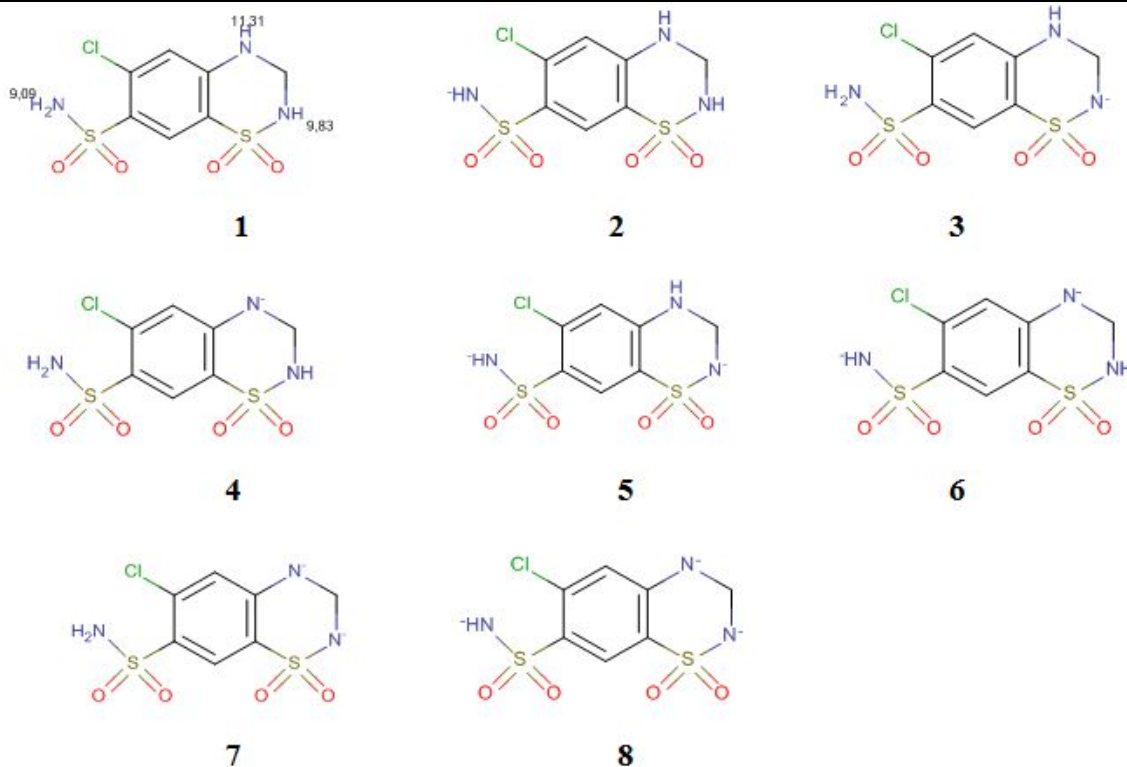
*pH mobilne faze* - za izvođenje eksperimenta odabrane su granice pH vrijednosti mobilne faze od 4 do 6. Da bi se mogle odrediti pH granične vrijednosti mobilne faze potrebno je poznavanje konstanti jonizacije spojeva koji se razdvajaju hromatografskom metodom. U okviru definisanih graničnih vrijednosti određena je procentualna zastupljenost jonskih vrsta u molekulama irbesartana (Slika 32, Tabela 8) i hidrohlorotiazida (Slika 33, Tabela 9) i procijenjen je uticaj jonizacije na procese razdvajanja.



Slika 32. Jonizacioni oblici irbesartana u zavisnosti od pH

Tabela 8. Zastupljenost jonizacionih oblika irbesartana u zavisnosti od pH

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
%-1	0.08	0.76	7.11	43.34	88.12	94.96	71.43	20.05	2.45	0.25	0.03
%-2	99.92	99.24	92.89	56.64	11.52	1.24	0.09	0	0	0	0
%-3	0	0	0	0.02	0.35	3.79	28.47	79.94	97.55	99.75	99.97



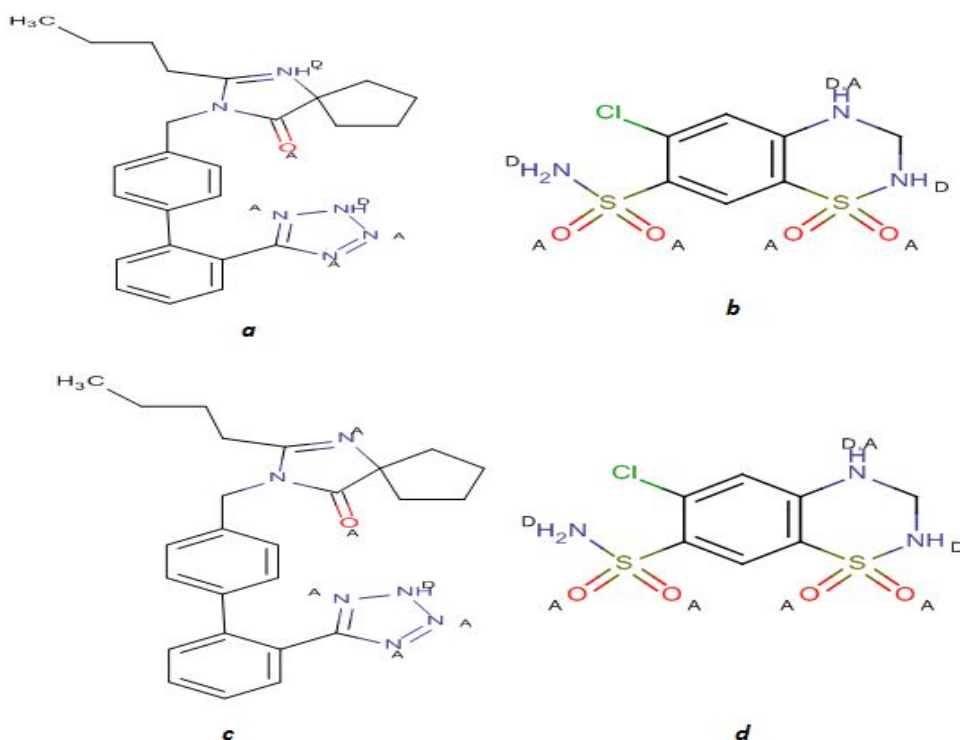
Slika 33. Jonizacioni oblici hidroklorotiazida u zavisnosti od pH



**Tabela 9.** Zastupljenost jonizacionih oblika hidrohlorotiazida u zavisnosti od pH

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
%-1	100	100	100	100	99.99	99.92	99.19	92.33	51.53	4.55	0.05	0	0
%-2	0	0	0	0	0	0.04	0.41	3.78	21.11	18.65	2.16	0.06	0
%-3	0	0	0	0	0	0.04	0.39	3.62	20.21	17.85	2.07	0.05	0
%-4	0	0	0	0	0	0	0.02	0.15	0.84	0.74	0.09	0	0
%-5	0	0	0	0	0	0	0	0.1	5.78	51.04	59.03	15.56	1.84
%-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0.74	0.86	0.23	0.03
%-7	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.42	3.70	4.28	1.13	0.13
%-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	2.72	31.47	82.97	98

Na osnovu hemijske strukture ispitivanih jedinjenja utvrđen je broj akceptora protona i protondonorskih grupa (Slika 34).



**Slika 34.** Proton akceptorske (A) i proton donorske grupe (D) irbesartana (*a* i *c*) i hidrohlorotiazida (*b* i *d*) pri pH 4.

*Temperatura* - pri povećanju temperature kolone dolazi do ubrzavanja procesa koji su ključni za razdvajanje komponenti. Pored toga, samo povećanje temperature smanjuje viskoznost rastvarača što može uticati na trajanje postupka razdvajanja.

*Sastav mobilne faze* - mobilnu fazu čini smjesa tri rastvarača čiji je sastav tokom procesa mijenjan u skladu sa dizajnom eksperimenta. Brzina kretanja komponenti pri analizi zavisi od polarnosti mobilne faze. Na osnovu poznavanja fizičko-hemijskih osobina ispitivanih jedinjenja može se zaključiti da se irbesartan i hidrohlorotiazid razlikuju u pogledu polarnosti (irbesartan ima 5 akceptora H i 1 donor; hidrohlorotiazid ima 5 akceptora i 3 donora H) i lipofilnosti ( $\log P_{\text{IRB}} = 5,5$ ;  $\log P_{\text{HCT}} = -0,58$ ) (Slika 34). Kako hidrohlorotiazid pokazuje kisele osobine, izabrana je mobilna faza sa niskim vrijednostima pH i nepolarna stacionarna faza (C18). Pod navedenim uslovima očekivani redosljed eluiranja ispitivanih jedinjenja je: hidrohlorotiazid (polarnije jedinjenje), ima kraće vrijeme zadržavanja i brže se eluira, irbesartan (hidrofobniji i duže se zadržava u koloni).

Za određivanje fizičko-hemijskih karakteristika irbesartana i hidrohlorotiazida korišten je program *Marvin Beans* 5.5.0.1. Za dizajn eksperimenta, odabrani faktori (pH mobilne faze, udio metanola u mobilnoj fazi i temperatura) su varirani na dva nivoa. Faktori i njihovi nivoi su prikazani u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Faktori i njihovi nivoi

Faktori	Novi faktora		
	(-)	(+)	(0)
A CH <sub>3</sub> OH (%)	35	55	45
B pH mobilne faze	4.0	6.5	6.0
C Temperatura(°C)	25	50	35

Pored graničnih vrijednosti faktora, eksperimenti su izvedeni i u tri centralne tačke koje su potrebne radi validacije rezultata (u matrici eksperimenta označene sa „0“). Oznakama “-1” i “+1” su označene “niske” i “visoke” vrijednosti faktora koje su prethodno određene dizajnom eksperimenta.

Pošto se dobro razdvajanje karakterizira dobrom rezolucijom i budući da je važno postići kratko vrijeme trajanja analitičkog postupka (s praktične tačke gledišta) izabrano je pet zavisnih varijabli koje su praćene tokom eksperimenta: faktor rezolucije ( $R_s$ ), simetrija pika irbesartana ( $A_{S_{IRB}}$ ), simetrija pika hidrohlorotiazida ( $A_{S_{HCT}}$ ), vrijeme zadržavanja irbesartana ( $t_{R_{IRB}}$ ) i vrijeme zadržavanja hidrohlorotiazida ( $t_{R_{HCT}}$ ). Prisutnost nekoliko funkcionalnih grupa u molekularnoj strukturi irbesartana i hidrohlorotiazida, kao što su bifenilna, imidazol i benzen, čini RP-HPLC metodu pogodnom za određivanje njihovog sadržaja u farmaceutskim oblicima.

Posebno treba istaći da je uvođenje metode predstavljalo izazov, jer je odnos količina irbesartana i hidrohlorotiazida u tabletama bio 12:1 u korist irbesartana.

#### 4.2.2. Analiza uticaja faktora na hromatografske parametre

##### *Faktor rezolucije ( $R_s$ )*

Matrica eksperimenta sa kodiranim vrijednostima ispitivanih faktora (MetOH-faktor A, pH mobilne faze – faktor B i temperature kolone – faktor C) kao i odgovori sistema (faktori rezolucije) prikazani su u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Matrica eksperimenta i vrijednosti faktora rezolucije

Faktori	Kodirane vrijednosti faktora										
A	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0	0	0
B	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	0	0	0
C	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	0	0	0
$R_s$	27.56	7.11	14.68	2.65	25.20	5.80	11.56	2.52	5.95	5.33	5.14

Efekti svakog od ispitivanih faktora kao i njihovih interakcija na faktor rezolucije prikazani su u Tabeli 12.

**Tabela 12.** Efekti faktora i njihovih interakcija na faktor rezolucije

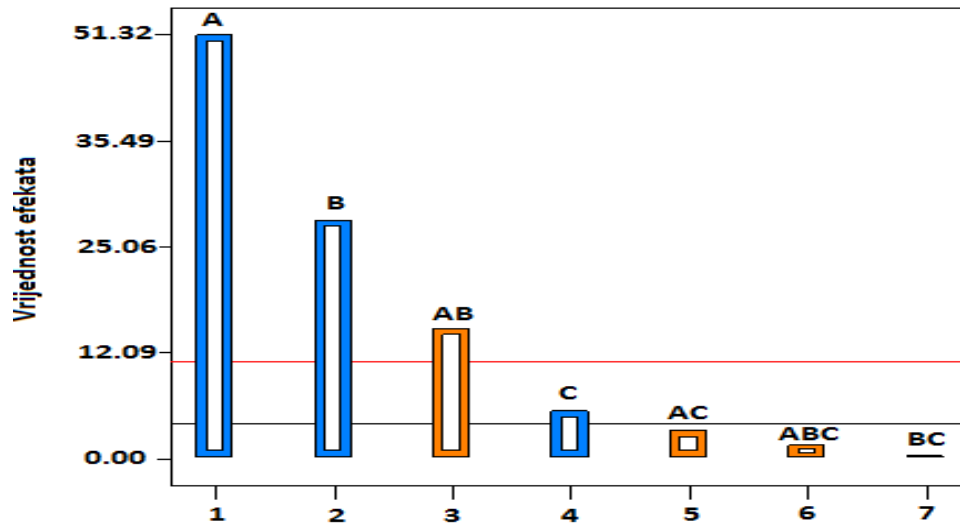
Faktori i interakcije	Efekti	Suma kvadrata	% efekat na faktor rezolucije
A-A	-15.23	463.906	61.0155
B-B	-8.57	146.718	19.2972
C-C	-1.73	5.986	0.7873
AB	4.70	44.086	5.7984
AC	1.01	2.040	0.2683
BC	0.10	0.022	0.0029
ABC	0.49	0.470	0.0619

Numerička vrijednost efekta odražava uticaj faktora na posmatrani odgovor. Na osnovu Tabele 12 zaključeno je da najveći efekat pokazuju faktori A i B. Negativan predznak znači da rezolucija opada povećanjem vrijednosti ovih faktora. U zadnjoj koloni su dati procentualni udjeli efekata faktora na faktor rezolucije. ANOVA testom je provjerena statistička značajnost efekata. Rezultati testiranja su dati u Tabeli 13 i prikazani grafički u obliku Pareto dijagrama (Slika 35).

**Tabela 13.** Rezultati testiranja statističke značajnosti efekata faktora na  $R_s$ 

	SS model	Stepeni slobode (df)	SS model/df	F	P
Model	663.23	7	94.75	537.93	0.0019
A-A	463.91	1	463.91	2633.83	0.0004
B-B	146.72	1	146.72	833.00	0.0012
C-C	5.99	1	5.99	33.98	0.0282
AB	44.09	1	44.09	250.3	0.0040
AC	2.04	1	2.04	11.58	0.0765
BC	0.022	1	0.022	0.13	0.7573
ABC	0.47	1	0.47	2.67	0.2438
				$R^2$	0.9995

SS-suma kvadrata; SS model/df-odnos sume kvadrata i broja stepeni slobode.



**Slika 35.** Grafički prikaz rezultata testiranja statističke značajnosti efekata faktora na  $R_s$  (granična vrijednost  $t=4.20662$  za  $p=0.05$ )

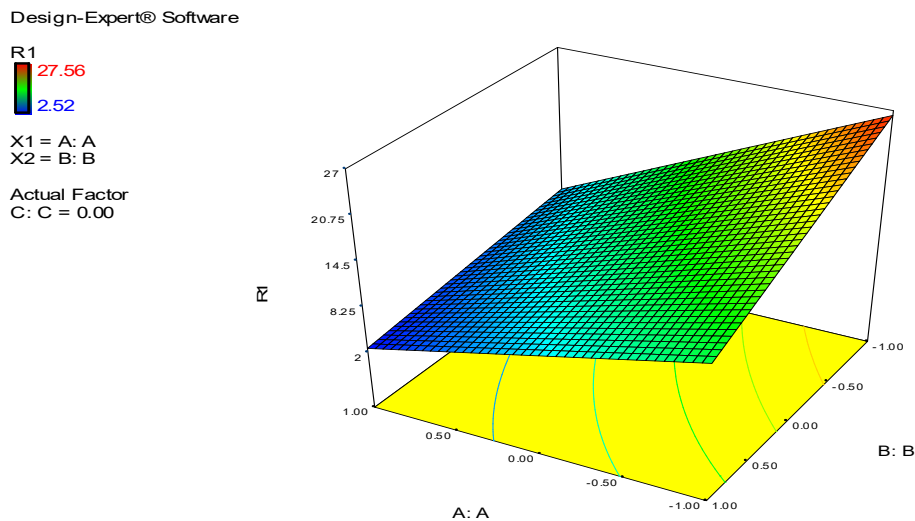
Niska vrijednost  $p$  ukazuje na statistički značajan regresioni model ( $p \leq 0.05$ ). Visoka vrijednost  $R^2$  u ovom modelu znači da se preko 99.95% varijacija u eksperimentu može objasniti predloženim modelom. Vrijednost  $F$  537.93 znači da je model značajan tj. da dobro opisuje korelaciju (postoji samo 0.19% vjerovatnoće da su dobivene vrijednosti posljedica greške). Kada se govori o faktorima, značajni su oni kod kojih je vrijednost  $p$  manja od 0.05. Kada je utvrđeno koji su parametri statistički značajni uspostavljena je korelacija, tj. nađen je matematički model koji ih opisuje. U navedenom slučaju značajni su faktori A, B, C i AB interakcija. Odnos između faktora A, B i C i faktora rezolucije može se predstaviti opštim polinomijalnim modelom:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC$$

gdje je  $b_0$  odsječak na ordinati, a  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{23}$  i  $b_{123}$  regresioni koeficijenti dok su A, B i C nezavisno promjenljive veličine (faktori). U navedenom slučaju, za model ovisnosti faktora rezolucije o nezavisno promjenljivim veličinama (faktorima i njihovim interakcijama) jednačina poprima sljedeći oblik:

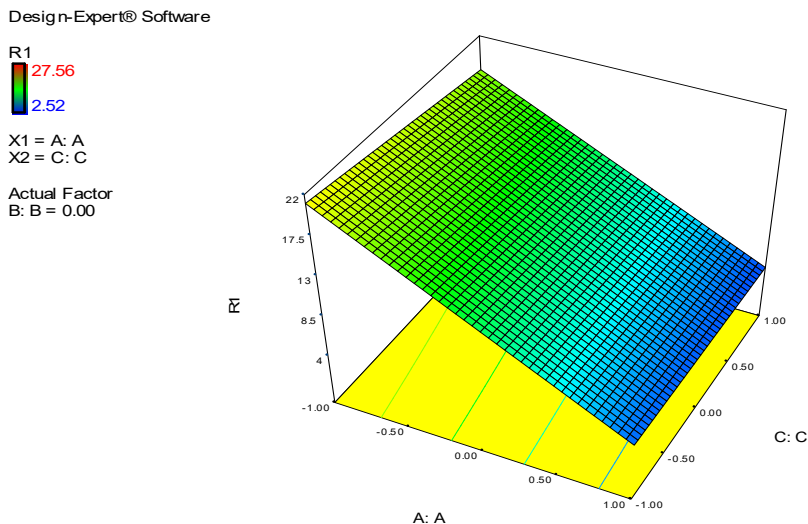
$$R_s = +12.14 - 7.62A - 4.28B - 0.87C + 2.35AB + 0.51AC + 0.052BC + 0.24ABC$$

Ovisnost faktora rezolucije o faktorima A, B i C je prikazana grafički 3D dijagramima na Slikama 36 i 37.



**Slika 36.** 3D dijagram ovisnosti faktora rezolucije o udjelu metanola (A) i pH mobilne faze (B)

Na osnovu prikazanog 3D dijagrama (Slika 36) zaključuje se da na faktor rezolucije veći uticaj pokazuje procenat udjela metanola u mobilnoj fazi od pH mobilne faze. Također, iz dijagrama se vidi da faktor rezolucije raste sa pomijeranjem vrijednosti faktora A prema nižim kodiranim vrijednostima.



**Slika 37.** 3D pregled ovisnosti  $R_s$  o temperaturi (C) i udjelu metanola (A) u mobilnoj fazi

*Retenciono vrijeme irbesartana*

Retenciono vrijeme irbesartana je važan parametar, jer vrijeme trajanja analize direktno korelira sa vremenom zadržavanja irbesartana (irbesartan je lipofilnija komponenta i duže se zadržava u koloni). Primjenom faktorskog dizajna procijenjen je uticaj faktora i njihovih interakcija na vrijeme zadržavanja irbesartana ( $t_{RIRB}$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Matrica eksperimenta i vrijednosti retencionih vremena

Faktori	Kodirane vrijednosti faktora										
A	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0	0	0
B	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	0	0	0
C	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	0	0	0
$t_{RIRB}$	14.5	3.72	8.14	2.84	9.76	3.22	5.35	2.60	3.68	3.44	3.31

U Tabeli 14 su prikazane kodirane vrijednosti faktora: %MetOH - faktor A, pH mobilne faze – faktor B i temperature kolone – faktor C; praćeno je retenciono vrijeme irbesartana. Unošenjem kodiranih vrijednosti kombinacija faktora i pripadajućih vrijednosti vremena zadržavanja irbesartana za svaku kombinaciju faktora, te njihovom evaluacijom uz pomoć programa *Design expert 7.0* utvrđeni su uticaji faktora na  $t_{RIRB}$  (Tabela 15). U posljednjoj koloni Tabele 15 dati su procentualni udjeli efekata faktora na retenciju irbesartana.

**Tabela 15.** Uticaj faktora i njihovih interakcija na retenciono vrijeme irbesartana

Faktori i interakcije	Efekti	Suma kvadrata	% efekat na $t_{RIRB}$
A-A	-6.3555	80.7848	56.3181
B-B	-3.083	19.0098	13.2524
C-C	-2.0855	8.69862	6.06414
AB	2.333	10.8858	7.58889
AC	1.7135	5.87216	4.09371
BC	0.568	0.645248	0.449827
ABC	-0.438	0.383688	0.267484

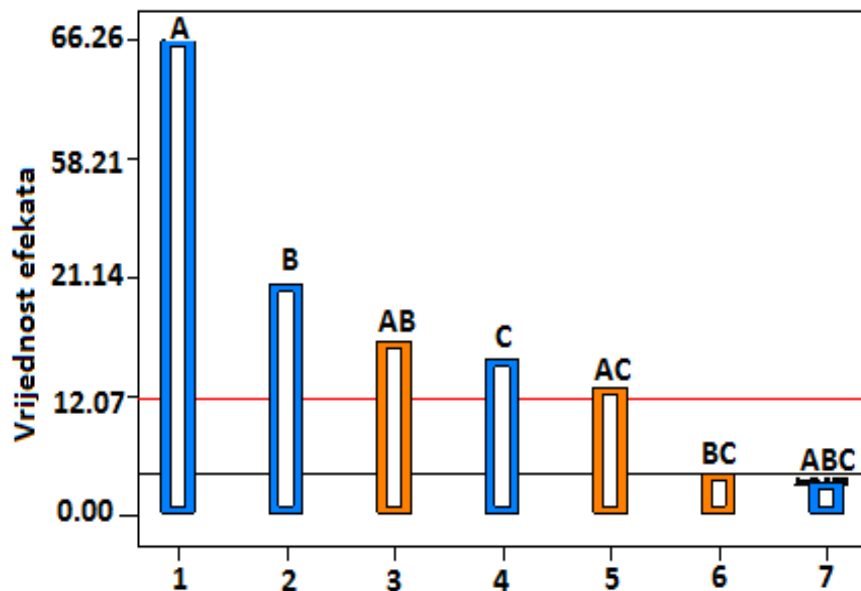
ANOVA testom je provjerena statistička značajnost ovih efekata i dobivenog modela (Tabela 16).

**Tabela 16.** Rezultati testiranja statističke značajnosti odnosa  $t_{RIRB}$  i faktora A, B i C

	SS model	Stepeni slobode (df)	SS model/df	F	P
Model	126.28	7	18.04	520.54	0.0019
A-A	80.78	1	80.78	2331.02	0.0004
B-B	19.01	1	19.01	548.52	0.0018
C-C	8.70	1	8.70	251.00	0.0040
AB	10.89	1	10.89	314.11	0.0032
AC	5.87	1	5.87	169.44	0.0059
BC	0.65	1	0.65	18.62	0.0497
ABC	0.38	1	0.38	11.07	0.0797
				$R^2$	0.9995

SS-suma kvadrata; SS model/df-odnos sume kvadrata i broja stepeni slobode.

Iz tabele se može zaključiti da na retenciju irbesartana najveći uticaj imaju faktori A, B, C, te AB i AC interakcija. Niska vrijednost p ( $p=0.0019$ ), visoka vrijednost koeficijenta regresije ( $R^2 = 0.9995$ ) kao i vrijednost F (520.54) ukazuju na statističku značajnost modela. Statistička značajnost ispitivanih faktora (faktori kod kojih je p manje od 0.05) prikazana je grafički (Slika 38).



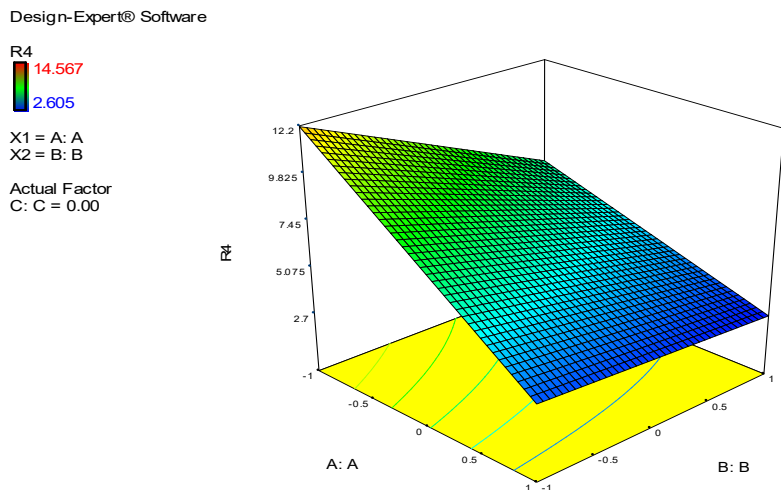
**Slika 38.** Grafički prikaz rezultata testiranja statističke značajnosti efekata faktora na  $t_{RIRB}$  (granična vrijednost  $t=4.20662$  za  $p=0.05$ )



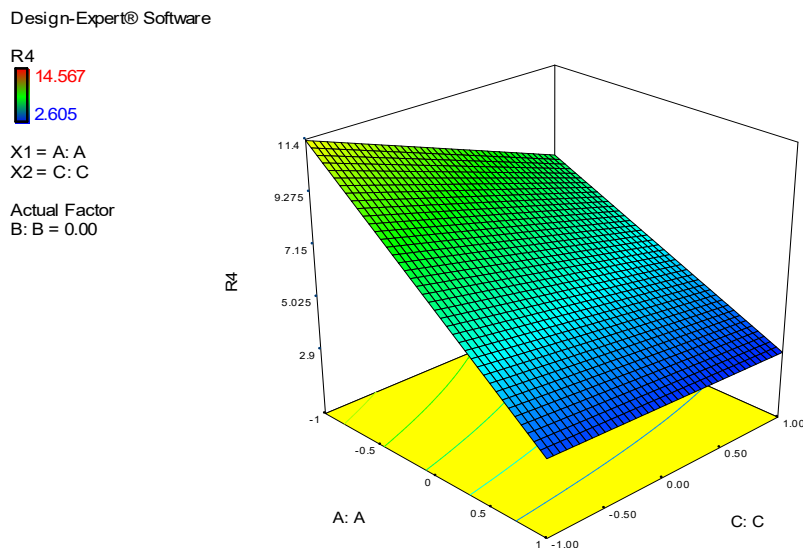
Odnos statistički značajnih faktora A, B i C i interakcija na hromatografski parametar retencije irbesartana predstavljen je polinomijalnim modelom:

$$t_{R\text{IRB}} = +6.28 - 3.18A - 1.54B - 1.04C + 1.17AB + 0.86AC + 0.28BC - 0.22ABC$$

Ovisnost faktora retencije irbesartana o faktorima A, B i C je prikazana i grafički, 3D dijagramima (Slika 39 i 40).



**Slika 39.** 3D prikaz ovisnosti vremena zadržavanja irbesartana o promjeni sadržaja metanola u mobilnoj fazi (A) i pH mobilne faze (B)



**Slika 40.** 3D prikaz ovisnosti vremena zadržavanja irbesartana o promjeni sadržaja metanola u mobilnoj fazi (A) i temperaturi (C)

Sa Slike 39 se može zaključiti da, slično uticaju na faktor rezolucije, i ovdje  $t_{RIRB}$  u većoj mjeri zavisi od sadržaja metanola u mobilnoj fazi nego što ovisi od pH mobilne faze. Analizirajući dijagram na Slike 40 uočava se da promjena temperature nema značajnu ulogu u promjeni retencionog vremena irbesartana.

#### *Faktor simetrije pika irbesartana*

Uticaj faktora i interakcija na simetriju pika irbesartana ( $A_{SIRB}$ ) prikazan je u Tabeli 17. Rezultati su pokazali da na simetriju pika irbesartana najveći efekat pokazuje pH mobilne faze, dok sadržaj metanola u mobilnoj fazi nije statistički značajan efekat (Slika 41).

**Tabela 17.** Tabelarni prikaz uticaja faktora i njihovih interakcija na  $A_{SIRB}$

Faktori i interakcije	Efekti	Suma kvadrata	% efekat na $A_{SIRB}$
A-A	-0.0125	0.0003125	0.0806963
B-B	0.3875	0.300312	77.5491
C-C	0.0725	0.0105125	2.71462
AB	-0.1475	0.0435125	11.2361
AC	0.0875	0.0153125	3.95412
BC	0.0475	0.0045125	1.16525
ABC	0.0625	0.0078125	2.01741

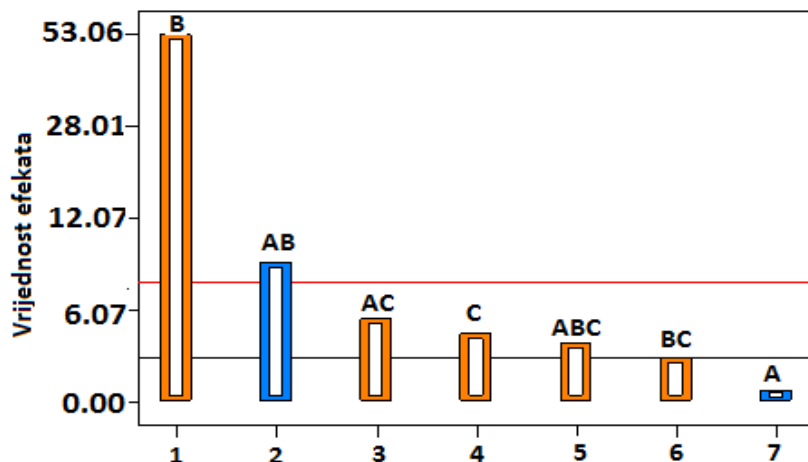
Statistička značajnost faktora prikazana je u Tabeli 18.

**Tabela 18.** Rezultati testiranja statističke značajnosti odnosa  $A_{SIRB}$  i faktora A, B i C

	SS model	Stepeni slobode (df)	SS model/df	F	P
Model	0.38	7	0.055	409.59	0.0024
A-A	3.125E-004	1	3.125E-004	2.34	0.2654
B-B	0.30	1	0.30	2252.34	0.0004
C-C	0.011	1	0.011	78.84	0.0124
AB	0.044	1	0.044	326.34	0.0031
AC	0.015	1	0.015	114.84	0.0086
BC	4.512E-003	1	4.512E-003	33.84	0.0283
ABC	7.813E-003	1	7.813E-003	58.59	0.0166
				$R^2$	0.9993

SS-suma kvadrata; SS model/df-odnos sume kvadrata i broja stepeni slobode.

Statistička značajnost ispitivanih faktora (faktori kod kojih je  $p$  manje od 0.05) prikazana je grafički (Slika 41).



**Slika 41.** Grafički prikaz rezultata testiranja statističke značajnosti efekata faktora na  $AS_{IRB}$  (granična vrijednost  $t=4.20662$  za  $p=0.05$ )

Matematički model odnosa između faktora A, B i C i  $AS_{IRB}$  predstavljen je polinomijalnim modelom:

$$AS_{IRB} = 1.23 - 6.250E-003A + 0.19B + 0.036C - 0.074AB + 0.044AC + 0.024BC + 0.031ABC$$

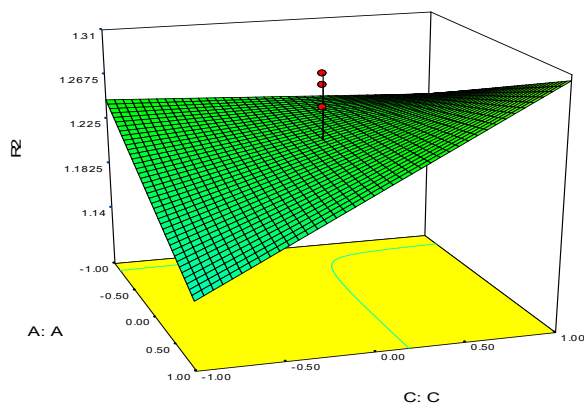
Sa dijagrama na Slici 42 zaključuje se da simetrija pika irbesartana ne zavisi značajno o promjenama sadržaja metanola (A) u mobilnoj fazi i da veći uticaj pokazuje temperatura kolone.

Design-Expert® Software

R<sup>2</sup>  
1.52  
0.97

X1 = A: A  
X2 = C: C

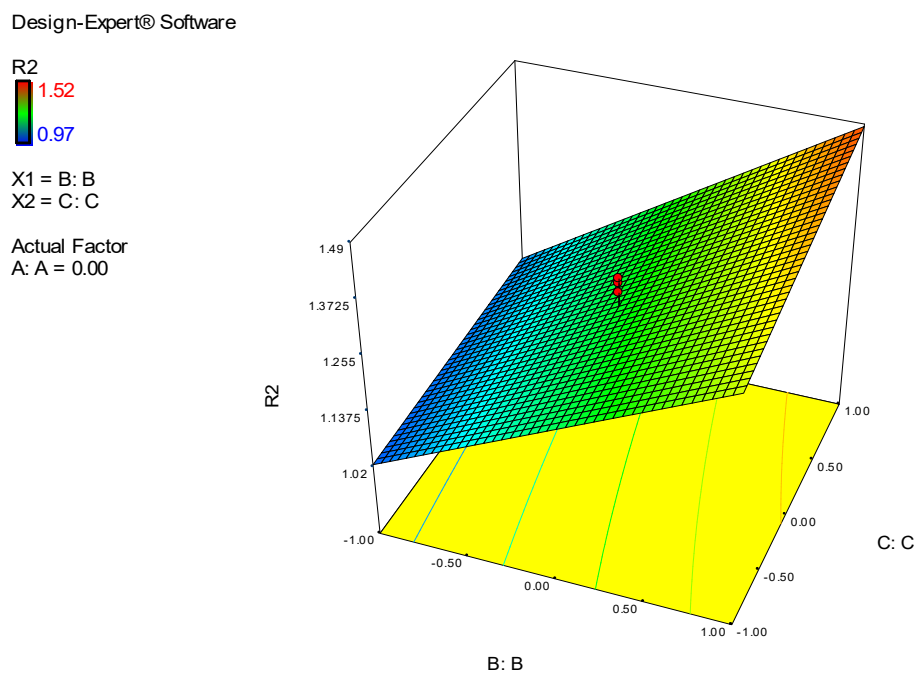
Actual Factor  
B: B = 0.00



**Slika 42.** 3D prikaz ovisnosti  $AS_{IRB}$  o faktorima sadržaja metanola u mobilnoj fazi (A) i temperaturi (C)

Na osnovu zakrivljenosti 3D dijagrama može se zaključiti da se odnosi tokom promjena mijenjaju, odnosno da su vrijednosti simetrije pika male pri visokom procentualnom učešću metanola u mobilnoj fazi i niskoj temperaturi kolone kao i pri niskom sadržaju metanola i visokim temperaturama kolone.

Za razliku od sadržaja metanola u mobilnoj fazi, simetrija pika irbesartana jako je ovisna o pH mobilne faze što se vidi po velikom nagibu dijagrama (Slika 43).



**Slika 43.** 3D dijagram ovisnosti  $AS_{IRB}$  o faktorima pH mobilne faze (B) i temperature (C)

Posmatranjem 3D dijagrama sa Slike 43 zaključeno je da na simetriju pika irbesartana najviše utiče pH mobilne faze, dok sastav mobilne faze i temperatura, iako statistički značajni faktori, pokazuju manji uticaj.

#### *Faktor simetrije pika hidrohlorotiazida*

Prikaz uticaja faktora i njihovih interakcija na simetriju pika hidrohlorotiazida ( $AS_{HCT}$ ) prikazan je u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Tabelarni prikaz uticaja faktora i njihovih interakcija na  $AS_{HCT}$ 

Faktori i interakcije	Efekti	Suma kvadrata	% efekat na $AS_{HCT}$
A-A	-0.065	0.00845	8.27989
B-B	0	0	0
C-C	-0.135	0.03645	35.7162
AB	0.04	0.0032	3.13558
AC	0.155	0.04805	47.0827
BC	0	0	0
ABC	-0.03	0.0018	1.76376

Ispitana je statistička značajnost svakog faktora. Rezultati su prikazani u Tabeli 20 i Slici 44.

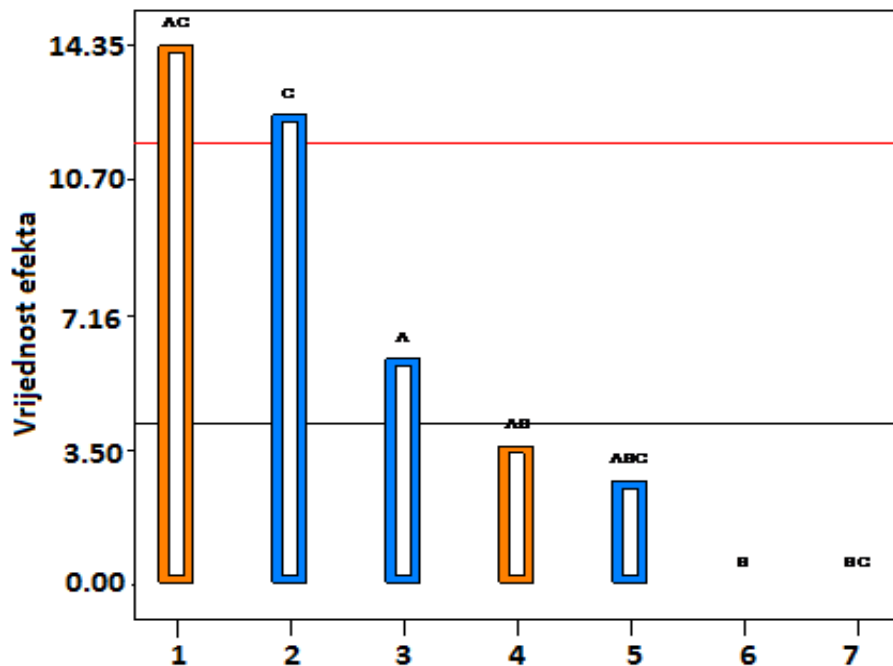
**Tabela 20.** Rezultati testiranja statističke značajnosti odnosa  $AS_{HCT}$  i faktora A, B i C

	SS model	Stepeni slobode (df)	SS model/df	F	P
Model	0.098	7	0.014	59.97	0.0165
A-A	8.450E-003	1	8.450E-003	36.21	0.0265
B-B	0	1	0	0	1.0000
C-C	0.036	1	0.036	156.21	0.0063
AB	3.200E-003	1	3.200E-003	13.71	0.0658
AC	0.048	1	0.048	205.93	0.0048
BC	0	1	0	0	1.0000
ABC	1.800E-003	1	1.800E-003	7.71	0.1089
				$R^2$	0.9953

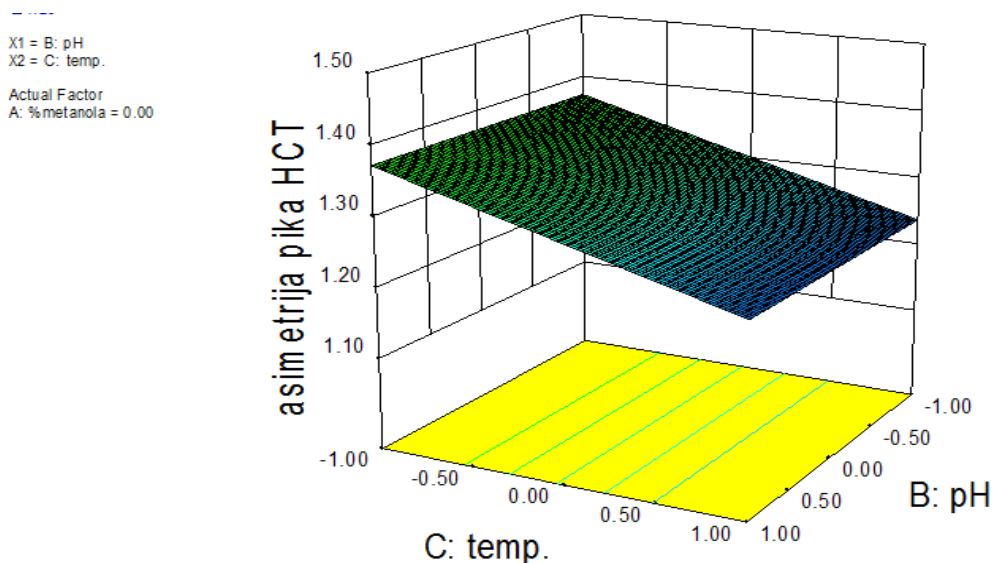
SS-suma kvadrata; SS model/df-odnos sume kvadrata i broja stepeni slobode.

Matematički model koji opisuje korelaciju praćenog hromatografskog parametra i ispitivanih faktora prikazan je jednačinom:

$$AS_{HCT} = 1.32 - 0.032A + 0.000B - 0.068C + 0.020AB + 0.078AC + 0.000BC - 0.015ABC$$

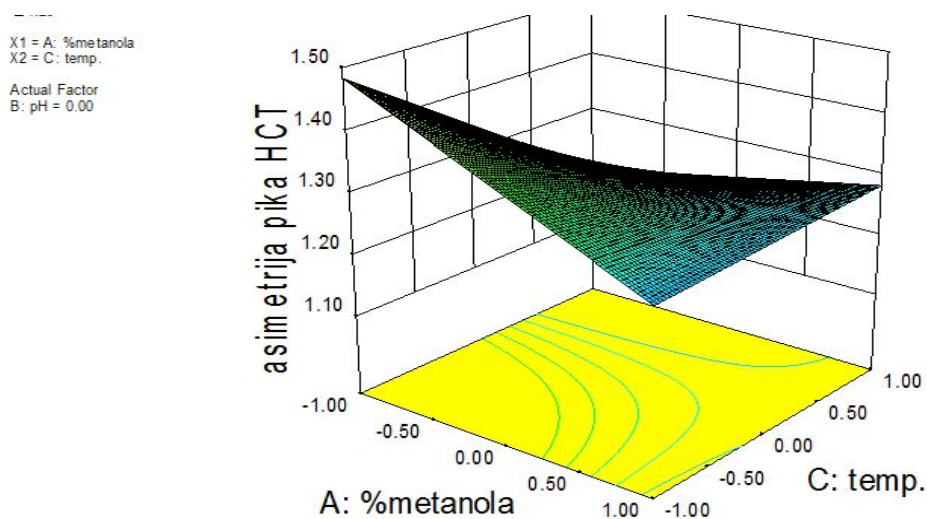


**Slika 44.** Grafički prikaz rezultata testiranja statističke značajnosti efekata faktora na  $A_{S_{HCT}}$  (granična vrijednost  $t=4.20662$  za  $p=0.05$ )



**Slika 45.** 3D dijagram ovisnosti  $A_{S_{HCT}}$  o faktorima temperature (C) i pH mobilne faze (B)

Iz dijagrama na Slici 45 i 46 vidi se da simetrija pika hidrohlorotiazida pri visokim vrijednostima sadržaja metanola u mobilnoj fazi ne ovisi značajno o temperaturi, dok je efekat temperature znatno izraženiji pri niskim vrijednostima sadržaja metanola u mobilnoj fazi. Za razliku od efekta pH mobilne faze na simetriju pika irbesartana, ovaj faktor nema nikakvog efekta na simetriju pika hidrohlorotiazida.



**Slika 46.** 3D prikaz ovisnosti  $AS_{HCT}$  o faktorima udjela metanola u mobilnoj fazi (A) i temperature (C)

#### *Retenciono vrijeme hidrohlorotiazida*

Prikaz uticaja faktora i njihovih interakcija na retenciono vrijeme hidrohlorotiazida prikazan je u Tabeli 21.

**Tabela 21.** Tabelarni prikaz uticaja faktora i njihovih interakcija na vrijeme zadržavanja hidrohlorotiazida

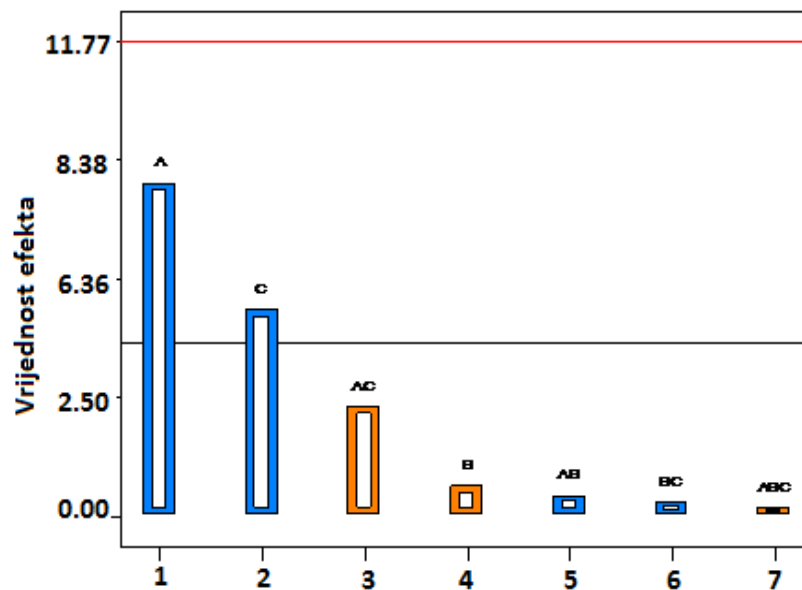
Faktori i interakcije	Efekti	Suma kvadrata	% efekat na $t_{RHCT}$
A-A	-0.35025	0.24535	64.92
B-B	0.03175	0.00201	0.53
C-C	-0.21775	0.09483	25.09
AB	-0.02175	0.00094	0.25
AC	0.11575	0.02679	7.09
BC	-0.01425	0.00040	0.10
ABC	0.00925	0.00017	0.04

Iz prikazane Tabele 21 može se zaključiti da na retenciju hidrohlorotiazida procentualno najveći uticaj ima sadržaj metanola u mobilnoj fazi. Pored toga, značajni su i faktori temperatura kolone i interakcija ova dva faktora. Statistička značajnost svih faktora i interakcija prikazani su u Tabeli 22 i na Slici 47.

**Tabela 22.** Rezultati testiranja statističke značajnosti odnosa vremena zadržavanja hidrohlorotiazida i faktora A, B i C

	SS model	Stepeni slobode (df)	SS model/df	F	P
Model	0.37	7	0.053	14.70	0.0652
A-A	0.25	1	0.25	68.13	0.0144
B-B	2.016E-003	1	2.016E-003	0.56	0.5323
C-C	0.095	1	0.095	26.33	0.0359
AB	9.461E-004	1	9.461E-004	0.26	0.6593
AC	0.027	1	0.027	7.44	0.1122
BC	4.061E-004	1	4.061E-004	0.11	0.7690
ABC	1.711E-004	1	1.711E-004	0.048	0.8477

SS-suma kvadrata; SS model/df-odnos sume kvadrata i broja stepeni slobode.



**Slika 47.** Grafički prikaz rezultata testiranja statističke značajnosti efekata faktora na  $t_{RHCT}$  (granična vrijednost  $t=4.20662$  za  $p=0.05$ )

Ovisnost se može prikazati modelom:

$$t_{RHCT} = +2.49 - 0.18A + 0.016B - 0.11C - 0.011AB + 0.058 AC - 7.125E-003BC + 4.625E-003A BC$$



### 4.2.3. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da faktorski dizajn daje uvid u pojedinačne efekte koji utiču na ispitivani proces i da se efekti mogu pratiti istovremeno, što značajno skraćuje postupak evaluacije metode. Dobiveni rezultati su pokazali da najveći uticaj na faktor rezolucije i retenciono vrijeme irbesartana ima procentualni udio metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze. Najbolje razdvajanje ispitivanih jedinjenja postignuto je pri najnižim graničnim vrijednostima ispitivanih faktora, ali je tada vrijeme trajanja analize najduže. S druge strane, povećanjem procenta metanola u mobilnoj fazi skraćuje se vrijeme analize, ali se smanjuje i faktor rezolucije. Obzirom da odabrane varijable ne utiču na posmatrane odgovore na isti način, neophodna je dodatna metoda optimizacije.

Da bi se dobili optimalni hromatografski uslovi primijenjena je metodologija multikriterijumskog odlučivanja, odnosno Derringerova funkcija poželjnih odgovora. Derringer-ova funkcija poželjnih odgovora je metoda kojom se vrši istovremena optimizacija više nezavisno promjenjivih veličina prema većem broju posmatranih odgovora. Funkcije poželjnih odgovora transformišu različite karakteristike sistema u jedan jedinstveni cilj (transformišu mjerne karakteristike predviđenih odgovora sistema,  $\hat{y}$ , u bezdimenzionalnu skalu) [167].

Derringer-ova funkcija poželjnih odgovora se zasniva na određivanju individualne funkcije poželjnih odgovora ( $d_i$ ) koja daje informacije o tome kako kombinacije faktorskih nivoa zadovoljavaju postavljeni cilj za svaki od posmatranih odgovora. Individualna funkcija poželjnih odgovora,  $d_i$ , se kreće od 0 (nepoželjan odgovor) do 1 (najpoželjniji odgovor). U oba slučaja  $d_i$  će varirati nelinearno, dok se približava poželjnoj vrijednosti. Vrijednost  $w_i$  (*weight*) dodjeljuje istraživač i ona se može kretati od 0,1 do 10. Ova vrijednost određuje izgled funkcije  $d_i$  (linearna, konkavna, konveksna), a time i način na koji se dolazi do najprihvatljivijih rješenja tokom optimizacije. Kada je vrijednost  $w_i$  veća od 1 kao prihvatljivi odgovori se uzimaju oni koji su bliže postavljenom cilju, a kada je  $w_i$  manje od 1, prihvataju se i oni odgovori

koji ne ispunjavaju u potpunosti postavljeni cilj. Kada je vrijednost  $w_i = 1$ , funkcija je linearna. U ovom radu odabrana vrijednost je  $w_i = 1$ , za sve posmatrane odgovore.

Globalna funkcija poželjnih odgovora (D) se definiše individualnim funkcijama poželjnih odgovora ( $d_i$ ) i određuje u kom stepenu kombinacije faktorskih nivoa zadovoljavaju postavljene ciljeve za sve odgovore sistema. Ona predstavlja geometrijsku sredinu individualnih funkcija poželjnih odgovora i može se izraziti jednačinom:

$$D = \left( d_1^{p_1} x d_2^{p_2} x \dots x d_n^{p_n} \right)^{1/n}$$

gdje je:

$n$  – broj odgovora

$p_n$  – 'weight' odgovora

Postoji nekoliko načina izračunavanja funkcije poželjnih odgovora, u zavisnosti od toga da li svaki od  $n$  odgovora treba biti maksimiziran ili minimiziran ili ima ciljnu vrijednost. Ako odgovor treba biti maksimiziran, vrijednost  $d_i$  se definiše jednačinom:

$$d_i = \left( \frac{\hat{y} - y_{\min}}{y_{\max} - y_{\min}} \right)^{w_i}, y_{\min} \leq \hat{y} \leq y_{\max} \dots$$

$$d_i = 1, \hat{y} > y_{\max}; d_i = 0, \hat{y} < y_{\min}$$

gdje su:

$y_{\min}, y_{\max}$  – najniže i najviše vrijednosti dobivene za odgovor  $i$

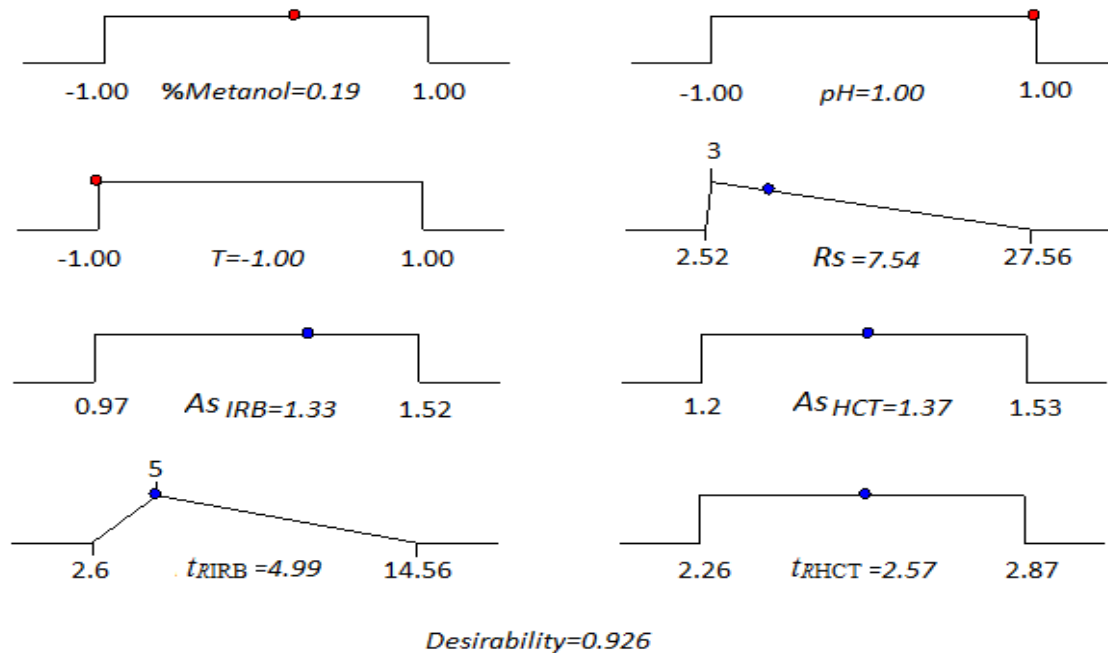
$w_i$  – weight

Vrijednost  $p_n$  predstavlja relativan značaj svake od individualnih funkcija poželjnih odgovora,  $d_i$ , tj. relativnu težinu. U većini kompjuterskih programa ova vrijednost se označava kao *importance*. Vrijednost  $p_i$  dodjeljuje istraživač i ona se kreće od 0,1 (najmanje značajno) do 10 (najznačajnije). Vrijednost D bliska jedinici znači da je kombinacija različitih kriterijuma optimalna, dok vrijednost D jednaka 0 ukazuje na krajnje nepoželjne odgovore. Ako se bilo koji od posmatranih odgovora ili varijabli nađe izvan opsega poželjnosti, globalna funkcija dobija vrijednost 0. Ciljevi optimizacije za svaki od posmatranih odgovora su prikazani u Tabeli 23.

**Tabela 23.** Kriteriji za multivarijantnu optimizaciju pojedinih odgovora

	Cilj	Donja granica	Gornja granica	Težina	Značaj
%metanola	U rasponu	-1	1	1	3
pH	U rasponu	-1	1	1	3
T	U rasponu	-1	1	1	3
$R_s$	Cilj=3	2.52	27.56	1	3
$A_{S_{IRB}}$	U rasponu	0.97	1.52	1	1
$A_{S_{HCT}}$	U rasponu	1.2	1.53	1	1
$t_{R_{IRB}}$	Cilj=5	2.605	14.567	1	5
$t_{R_{HCT}}$	U rasponu	2.258	2.867	1	5

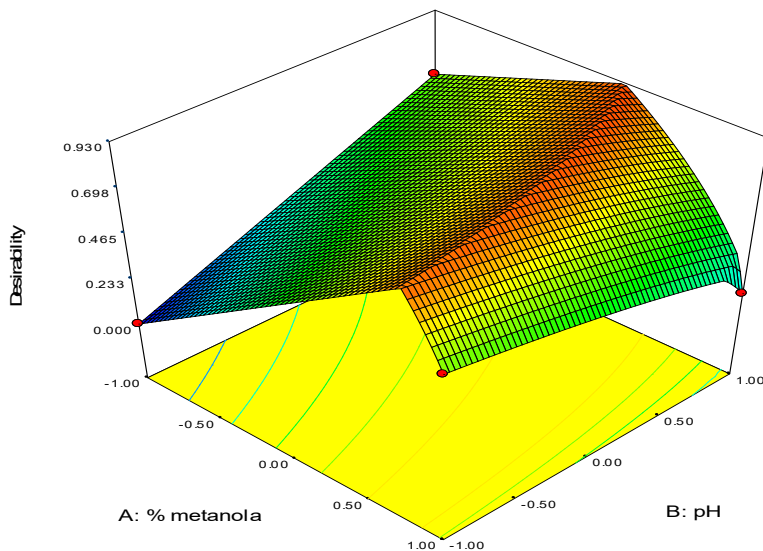
Izračunavanje funkcije poželjnih odgovora je izvedeno primjenom programa *Design-Expert® 7.0.*, a dobiveni rezultati su grafički prikazani (Slika 48). Na Slici 48 je prikazan linearan oblik svake od pojedinih funkcija, što je u skladu sa odabranim vrijednostima  $w_i = 1$ .



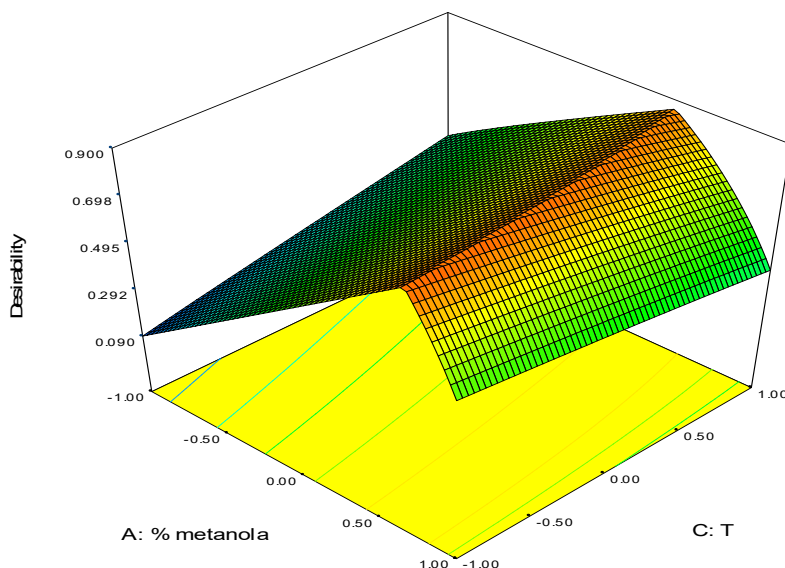
**Slika 48.** Grafički prikaz ograničenja prihvaćenih prilikom izračunavanja globalne funkcije poželjnih odgovora i dobiveni optimalni uslovi.

Vizualizacija zavisnosti posmatranih odgovora od promjene ispitivanih varijabli i brz odabir pravih optimalnih uslova omogućili su konstruisanje 3D dijagrama. Dobiveni 3D

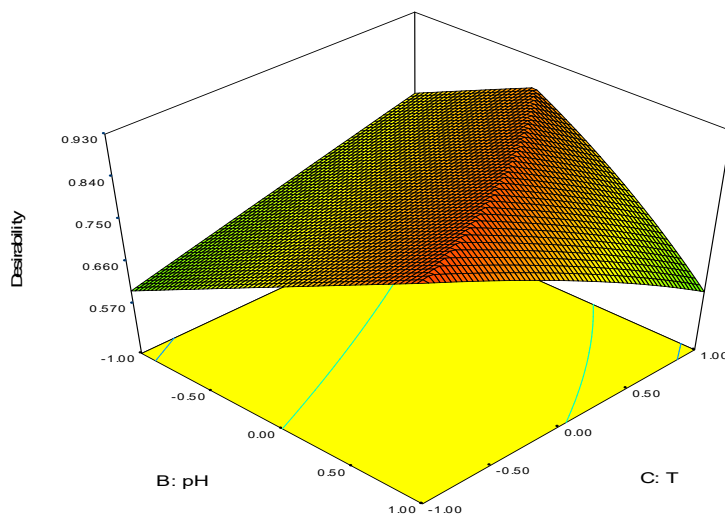
dijagrami prikazani su na Slikama 49, 50 i 51 na kojima se mogu uočiti optimalni hromatografski uslovi, uticaj svake od ispitivanih varijabli kao i njihova interakcija na posmatrane odgovore. Na svakom od dijagrama prikazana je interakcija dvije varijable, dok je za treću varijablu odabrana konstantna, optimalna vrijednost.



**Slika 49.** 3D dijagram globalne funkcije poželjnih odgovora  $D = f(\% \text{ metanola, pH mobilne faze}); T=35^{\circ}\text{C}$

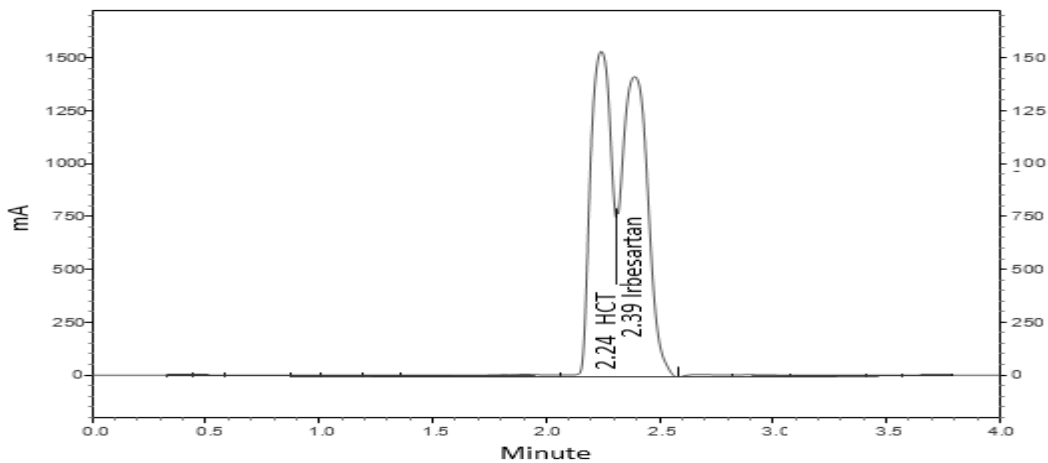


**Slika 50.** 3D dijagram globalne funkcije poželjnih odgovora  $D = f(\% \text{ metanola, temperatura}); \text{pH}=6.0$

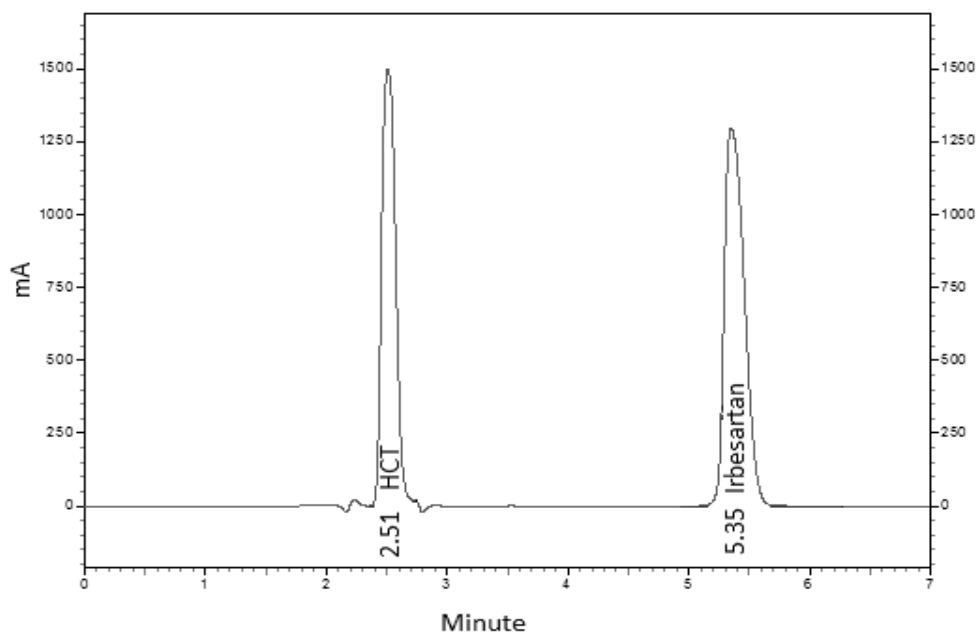


**Slika 51.** 3D dijagram globalne funkcije poželjnih odgovora  $D = f(\text{pH mobilne faze, temperatura})$ ;  $\text{CH}_3\text{OH}=45\%$

Koordinate koje odgovaraju maksimumima prikazanih funkcija su izabrane kao najbolji hromatografski uslovi. Vrijednosti ispitivanih varijabli koje daju najvišu vrijednost globalne funkcije poželjnih odgovora su bile (u kodiranim vrednostima): 0.19 za % metanola u mobilnoj fazi, 1 za pH mobilne faze i -1 za temperaturu kolone. Zamjenom kodiranih vrijednosti dobijaju se vrednosti ispitivanih varijabli koje daju najvišu vrijednost globalne funkcije poželjnih odgovora: 47 % metanola, pH 6.5 i temperatura kolone 25 °C. Na Slici 52 prikazan je hromatogram ispitivanih jedinjenja prije optimizacije.



**Slika 52.** Hromatogram prije optimizacije metode razdvajanja iribesartana i hidrohlorotiazida



**Slika 53.** Hromatogram poslije optimizacije metode razdvajanja

Na Slici 53 prikazan je hromatogram dobiven pod optimalnim, prethodno definisanim hromatogramskim uslovima.

#### 4.2.4. Validacija HPLC metode za određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida

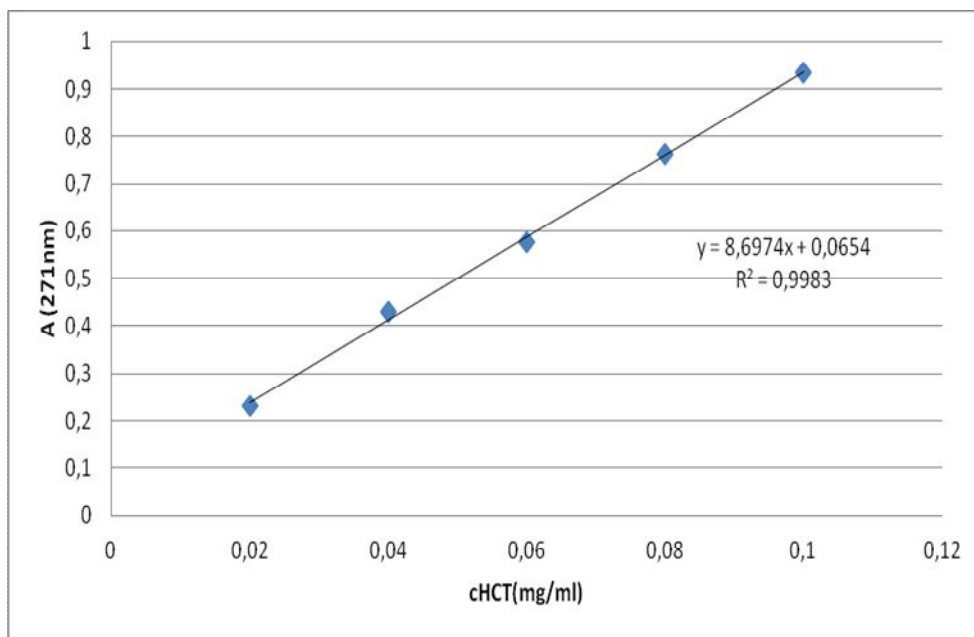
Nakon optimizacije, HPLC metoda je validirana pod optimalnim uslovima u skladu sa važećim ICH smjernicama [168], te je ispitana njena primjenjivost na ispitivanje sadržaja irbesartana i hidrohlorotiazida u tabletama. Tokom validacije analitičke metode ispitani su osnovni validacijski parametri: tačnost, preciznost, selektivnost, linearnost, robusnost, limiti kvantifikacije (LOQ), te limiti detekcije (LOD).

Metoda je precizna, tačna, selektivna i linearna u rasponu koncentracija 0.08 - 0.4 mg/mL za irbesartan i 0.02 - 0.1 mg/mL za hidrohlorotiazid, te se može primijeniti za istovremeno određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida u tabletama.

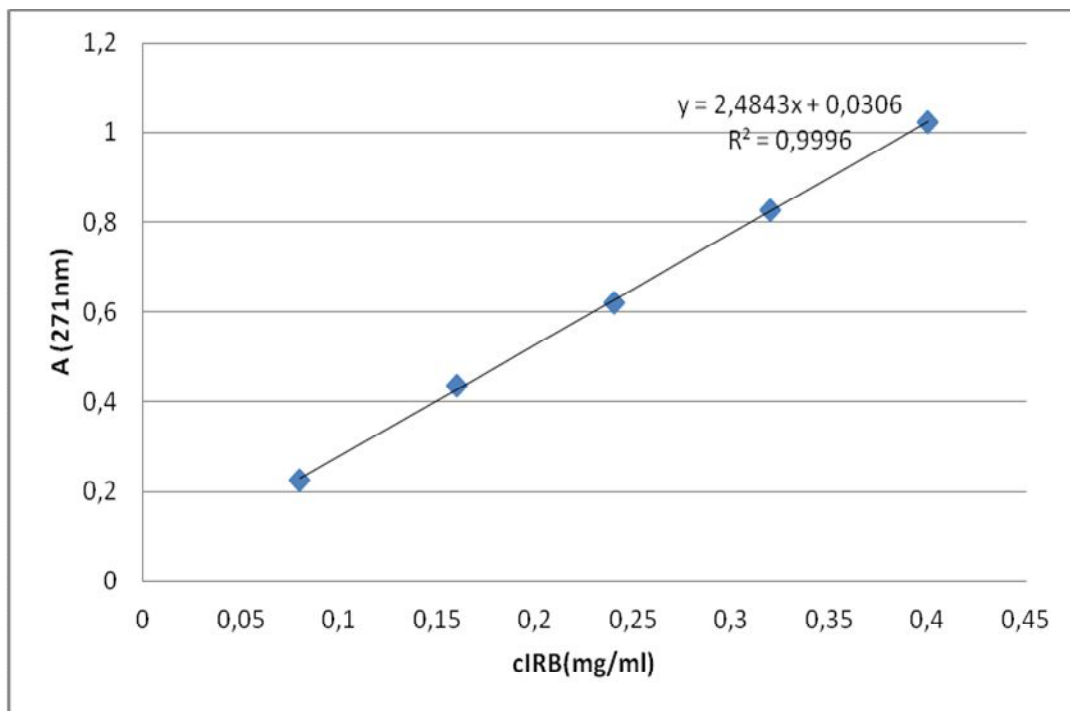
Hromatografski uslovi u toku validacije su bili jednaki pri ispitivanju svih parametara. Odnos sastava mobilne faze je bio: pufer : metanol : THF = 43 : 47 : 10, temperatura kolone 25°C, pH = 6.5, brzina protoka 0.75 mL/min.

#### 4.2.4.1. Linearnost

Određivanjem linearnosti metode definisan je opseg koncentracija za koje važi Lambert-Beer-ov zakon, odnosno, područje gdje su rezultati proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Izračunata je jednačina prave, koeficijent regresije, nagib i odsječak prave.



Slika 54. Kalibraciona kriva za određivanje hidrohlorotiazida



Slika 55. Kalibraciona kriva za određivanje irbesartana

**Tabela 24.** Statistički parametri za kalibracione krive irbesartana i hidrohlorotiazida

Parametar	Irbesartan	Hidrohlorotiazid
Koncentracijski opseg (mg/mL)	0.08-0.4	0.02-0.1
Koeficijent pravca	2.448	8.609
Odsječak	0.035	0.0732
R <sup>2</sup>	0.9976	0.9954
t*	1.872	1.256
LOD	0.02	0.006
LOQ	0.06	0.018

\*  $t_{\text{tab}} = 2.447$  ( $p = 0.05$ ,  $f = 6$ )

#### 4.2.4.2. Preciznost metode

Priprema rastvora za određivanje preciznosti metode opisana je u eksperimentalnom dijelu. Preciznost metode je određena od strane dva analitičara pri čemu je svaki analitičar izveo po šest eksperimenata za svaku ispitivanu supstancu. Na osnovu dobivenih rezultata izračunate su vrijednosti *Recovery*, SD, % RSD i nivo pouzdanosti određivanja irbesartana i hidrohlorotiazida.

**Tabela 25.** Određivanje preciznosti metode (analitičar A-hidrohlorotiazid)

Test	Odgovor	Odvaga (mg)	Koncentracija (mg/mL)	Određena koncentracija (mg/mL)	<i>Recovery</i> (%)
1	4312832	1.01	0.04042	0.04157	102.86
2	4318976	1.00	0.04019	0.04164	103.61
3	4309326	1.00	0.04	0.04153	103.83
4	4315915	1.01	0.04048	0.04161	102.79
5	4312951	1.00	0.04029	0.04158	103.2
6	4325224	1.01	0.04038	0.04172	103.3
Srednja vrijednost ( <i>Recovery</i> )					103.27
SD					0.41
RSD					0.4
Nivo pouzdanosti					103.27±0.8



**Tabela 26.** Određivanje preciznosti metode (analitičar B-hidrohlorotiazid)

Test	Odgovor	Odvaga (mg)	Koncentracija (mg/mL)	Određena koncentracija (mg/mL)	Recovery (%)
1	4319887	1.01	0.04048	0.04166	102.9
2	4319432	1.00	0.04022	0.04165	103.54
3	4313756	1.00	0.04029	0.04158	103.22
4	4319459	1.01	0.04058	0.04165	102.65
5	4325450	1.01	0.04045	0.04171	103.12
6	4307197	1.01	0.04061	0.04151	102.22
Srednja vrijednost ( <i>Recovery</i> )					102.94
SD					0.47
RSD					0.45
Nivo pouzdanosti					102.94±0.9

**Tabela 27.** Određivanje preciznosti metode (analitičar A-irbesartan)

Test	Odgovor	Odvaga (mg)	Koncentracija (mg/mL)	Određena koncentracija (mg/mL)	Recovery (%)
1	4379998	4.03	0.16109	0.16452	102.13
2	4380434	4.02	0.16067	0.16453	102.4
3	4373408	4.01	0.16048	0.16425	102.35
4	4375552	4.03	0.16106	0.16434	102.04
5	4373377	4.02	0.16061	0.16425	102.27
6	4384451	4.02	0.16083	0.1647	102.4
Srednja vrijednost ( <i>Recovery</i> )					102.26
SD					0.15
RSD					0.14
Nivo pouzdanosti					102.26±0.30

**Tabela 28.** Određivanje preciznosti metode (analitičar B-irbesartan)

Test	Odgovor	Odvaga (mg)	Koncentracija (mg/mL)	Određena koncentracija (mg/mL)	Recovery (%)
1	4385910	4.02	0.16083	0.16476	102.44
2	4381452	4.01	0.16058	0.16458	102.49
3	4372056	4.01	0.16054	0.16419	102.27
4	4380837	4.03	0.16125	0.16455	102.05
5	4377901	4.02	0.16067	0.16443	102.34
6	4366337	4.09	0.16396	0.16396	101.88
Srednja vrijednost ( <i>Recovery</i> )					102.25
SD					0.24
RSD					0.23
Nivo pouzdanosti					102.25±0.5

## 4.2.4.3. Tačnost metode

*Tačnost metode* je ispitana kao stepen podudaranja između stvarne vrijednosti i vrijednosti dobivene primjenom analitičkog postupka i rezultat je izražen kao postotak iskorištenja (*Recovery*).

Za ispitivanje tačnosti korištena su tri rastvora različite koncentracije hidrohlorotiazida i irbesartana: 0.032 mg/mL i 0.128 mg/mL; 0.04 mg/mL i 0.16 mg/mL; 0.048 mg/mL i 0.192 mg/mL. Otopine su filtrirane kroz najlon filter 0.45 µm i korištene kao uzorci.

**Tabela 29.** Rezultati određivanja tačnosti HPLC metode za određivanje hidrohlorotiazida

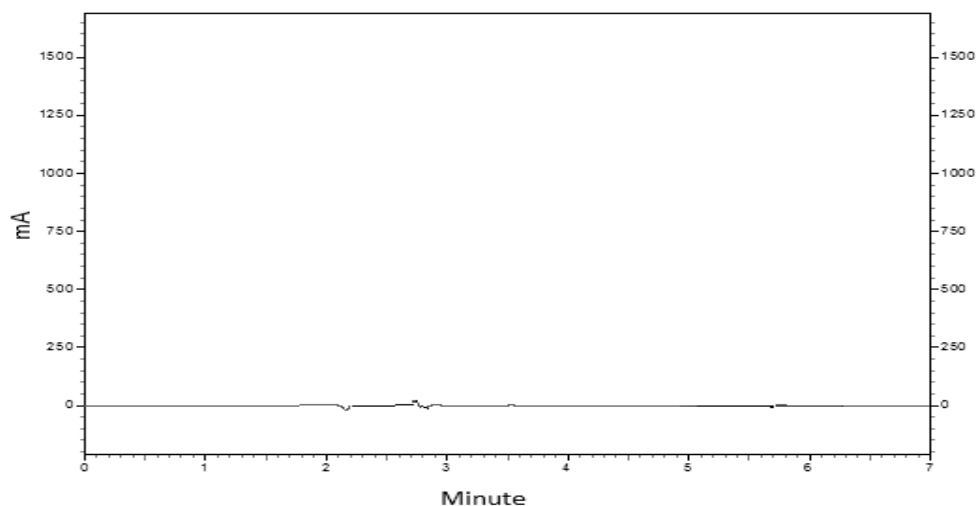
Test	Odvaga (mg)	Odgovor	Koncentracija (mg/mL)	Određena Koncentracija (mg/mL)	Recovery (%)
1	0.809	3553277	0.0323	0.03283	101.38
2	0.802	3561306	0.0321	0.03292	102.58
3	0.808	3553096	0.0323	0.03283	101.48
4	1.010	4312832	0.0404	0.04157	102.86
5	1.004	4318976	0.0401	0.04164	103.61
6	1.000	4309326	0.0400	0.04153	103.83
7	1.216	4922559	0.0486	0.04859	99.9
8	1.208	4913346	0.0483	0.04849	100.28
9	1.207	4925476	0.0482	0.04863	100.7

**Tabela 30.** Rezultati određivanja tačnosti HPLC metode za određivanje irbesartana

Test	Odvaga (mg)	Odgovor	Koncentracija (mg/mL)	Određena Koncentracija (mg/mL)	Recovery (%)
1	3.208	3542408	0.1283	0.13039	101.59
2	3.204	3550770	0.1281	0.13073	101.98
3	3.220	3546630	0.1288	0.13056	101.37
4	4.022	4379998	0.1609	0.16452	102.25
5	4.016	4380434	0.1606	0.16453	102.4
6	4.007	4373408	0.1602	0.16425	102.47
7	4.815	5098326	0.1926	0.19379	100.61
8	4.826	5093713	0.1930	0.19360	100.28
9	4.811	5102597	0.1924	0.19396	100.79

#### 4.2.4.4. Selektivnost metode

Selektivnost metode je potvrđena snimanjem spektara rastvora placebo uzorka i standarda. Na Slici 56 prikazan je hromatogram placebo, dok su hromatogrami sa rastvorima aktivnih supstanci prikazani na Slici 52 i 53.



Slika 56. Hromatogram rastvora placebo

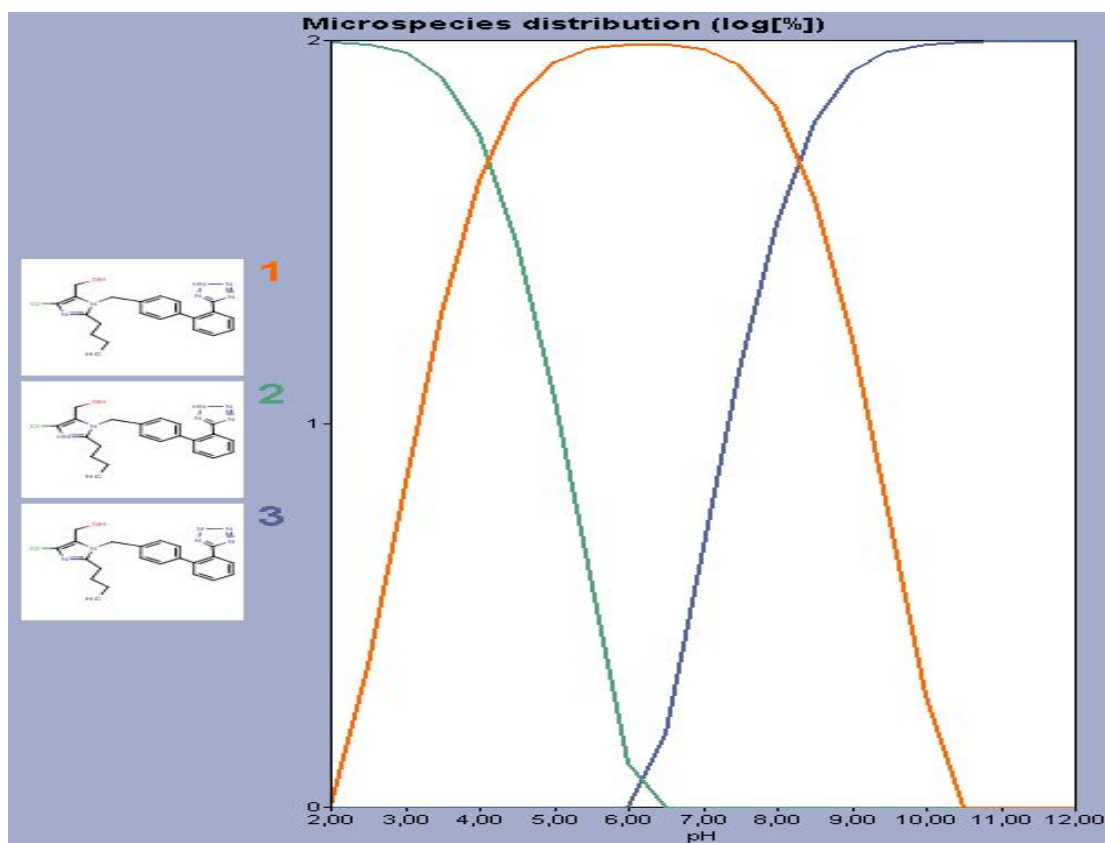
#### 4.2.4.5. Robusnost metode

Ispitivanjem robusnosti metode ispitana je otpornost analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Kod ispitivanja robusnosti metode namjerno su mijenjani radni parametri unutar realnih granica i praćena je kvantitativna promjena rezultata. Kod postavljene RP-HPLC metode ispitan je uticaj variranja pH vrijednosti mobilne faze, variranje sastava mobilne faze, te rad pri različitim temperaturama.

### 4.3. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE LOSARTANA I HIDROHLOROTIAZIDA

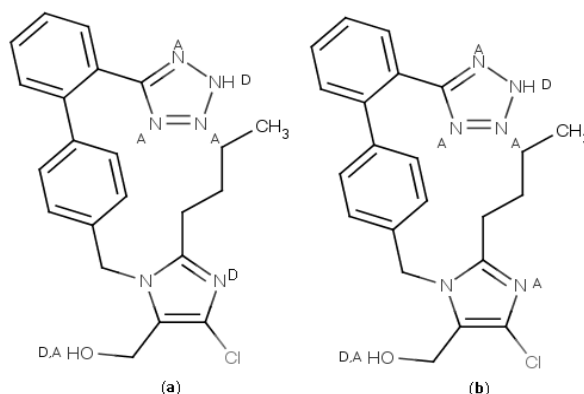
#### 4.3.1. Analiza strukture molekula i primjena eksperimentalnog dizajna

Prisustvo funkcionalnih grupa tetrazola, imidazola i bifenila u strukturi losartana (LOS) (Slika 58), čini reverzno faznu HPLC metodu sa SPDA detektorom pogodnu za određivanje ovog jedinjenja u smjesi sa hidrohlorotiazidom. U cilju evaluacije retencionog ponašanja i separacije molekula određen je jonizacioni profil losartana i hidrohlorotiazida. Distribucija jonizacionih oblika losartana u zavisnosti od pH je urađena u programu *MarvinSketch*, a rezultati prikazani na Slici 57. Jonizacioni profil hidrohlorotiazida je prikazan u radu u prethodnom poglavlju (Slika 33).

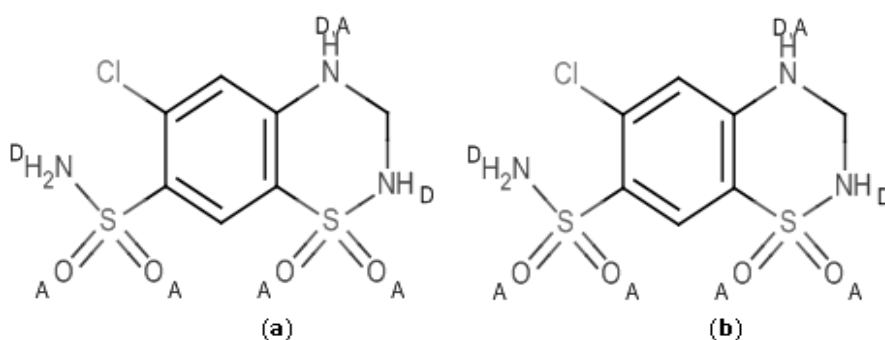


Slika 57. Jonizacioni oblici losartana u zavisnosti od pH

U istom programu određen je broj grupa donora i akceptora protona (vodika) za losartan i hidrohlorotiazid (Slika 58 i 59).



**Slika 58.** Akceptori protona (A) i donori protona (D) losartana pri pH 4 (a) i pH 6 (b)



**Slika 59.** Akceptori protona (A) i donori (D) hidrohlorotiazida pri pH 4 (a) i pH 6 (b)

Literaturni podaci pokazuju da losartan ima dvije  $pK_a$  vrijednosti (4.12, imidazolni azot; 8.30, tetrazolni azot), a na pH 4 prisutan je kao mješavina molekularnog oblika (43.01%) i monoprotorskog oblika (56.97%). Hidrohlorotiazid ima tri  $pK_a$  vrijednosti (9.09, sulfonamid; 9.83 ciklični sulfonamid; 11.31, sekundarni amin).

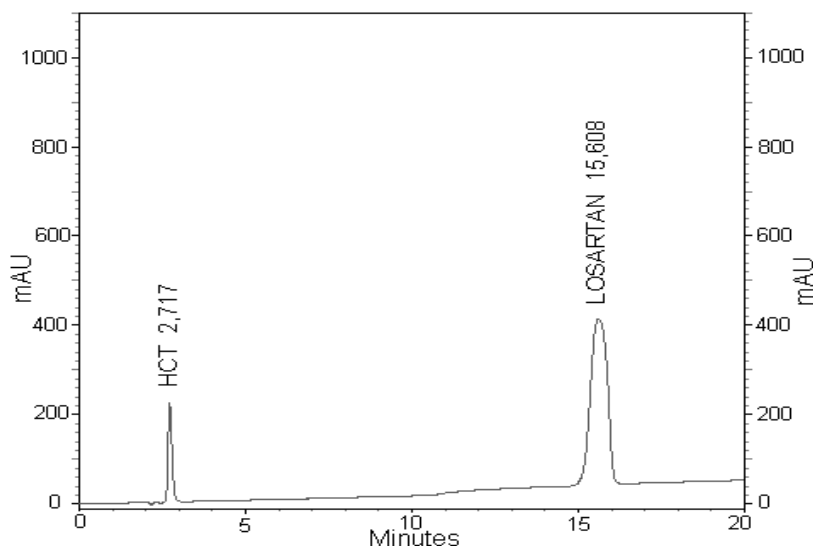
Na većim pH vrijednostima hidrohlorotiazid je prisutan kao ravnotežni oblik različitih deprotoniranih oblika. Kada se uzmu u obzir kiselinsko-bazne osobine losartana i hidrohlorotiazida, može se zaključiti da je interval pH vrijednosti mobilne faze od 4.0 do 6.0 najpogodniji za buduće istraživanje. U ovom intervalu, losartan je djelimično jonizovan, dok je hidrohlorotiazid potpuno nejoničan, pa bi pod ovim uslovima očekivani red retencije bio: hidrohlorotiazid, a nakon njega losartan.

Retencija supstance je funkcija volumnog udjela organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Uzimajući u obzir varijaciju retencionih faktora molekula u zavisnosti od polarosti mobilne faze, za dalji eksperiment odabran je opseg od 25% - 45% koncentracije metanola.

### 4.3.2. Određivanje faktora optimizacije HPLC metode

Za dizajn eksperimenta odabrana su tri faktora: udio metanola u mobilnoj fazi (A), pH mobilne faze (B) i protok mobilne faze (C), koja su varirana na dva nivoa. Pošto je dobra separacija karakterizirana dobrom rezolucijom između kritičnog para supstanci, a vrijeme trajanje jedne analize vrlo značajno, pet odgovora su odabrani kao zavisne varijable: retenciono vrijeme hidrohlorotiazida ( $t_{RHCT}$ ), retenciono vrijeme losartana ( $t_{RLOS}$ ), simetrija pika hidrohlorotiazida ( $A_{SHCT}$ ), simetrija pika losartana ( $A_{SLOS}$ ) i faktor rezolucije ( $R_s$ ).

Preliminarna analiza losartana i hidrohlorotiazida je urađena na nepolarnoj stacionarnoj fazi (Zorbax C<sub>8</sub>kolona, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm) sa mobilnom fazom koja se sastoji od metanola – acetonitrila - acetatnog pufera (pH mobilne faze podešen je na 5.0 sa acetatnom kiselinom). Temperatura kolone je podešena na 25 °C, a protok na 0.75 mL/min. Postignuta je prihvatljiva separacija pri ovim uslovima, ali je bilo potrebno unaprijediti oblik i simetriju pika, baznu liniju, te skratiti vrijeme analize (Slika 60).



**Slika 60.** Hromatogram hidrohlorotiazida i losartana prije optimizacije

Da bi se odredilo koji faktor ima najveći uticaj na retencione karakteristike molekula, odabran je 2<sup>3</sup> puni faktorski dizajn (FFD) sa šest ponavljajućih analiza u centralnoj tački eksperimenta. Eksperimentalni podaci su kodirani da bi se dobila signifikantnost faktora

na jednostavniji način. Faktori i njihove „donje” (-1), „gornje” (+1) i “nulte” (0) vrijednosti su prikazane u Tabeli 31.

**Tabela 31.** Faktori i nivoi

Faktori		Novi faktora		
		(-1)	(+1)	(0)
A	CH <sub>3</sub> OH (%)	25	45	35
B	pH mobilne faze	4.0	6.0	5.0
C	protok (mL/min)	0.7	1.3	1.0

A-udio metanola u mobilnoj fazi; B-pH mobilne faze; C-protok mobilne faze

Za analize definisane dvofaktorskim dizajnom i šest ponavljajućih analiza u centralnoj tački (Tabela 32 i 33) bilo je potrebno četrnaest analiza da bi se kompletirao puni faktorski dizajn.

Kao zavisne varijable, odabrano je pet odgovora: retenciono vrijeme hidrohlorotiazida ( $t_{RHCT}$ ), retenciono vrijeme losartana ( $t_{RLOS}$ ), simetrija pika hidrohlorotiazida ( $A_{SHCT}$ ), simetrija pika losartana ( $A_{SLOS}$ ) i faktor rezolucije ( $R_s$ ). Matrica eksperimenata i rezultati su prikazani u Tabeli 32.

**Tabela 32.** Matrica faktorskog dizajna i eksperimentalno dobiveni rezultati ( $2^3$  FFD)

Faktori			Rezultati				
A	B	C	$t_{RHCT}$	$t_{RLOS}$	$A_{SHCT}$	$A_{SLOS}$	$R_s$
-1	-1	-1	2.60	15.6	1.28	0.95	23.94
1	-1	-1	2.70	7.60	1.32	1.11	16.79
-1	1	-1	2.83	15.0	1.41	1.30	22.96
1	1	-1	2.90	6.80	1.34	1.16	13.76
-1	-1	1	1.47	8.60	1.43	0.90	24.06
1	-1	1	1.30	2.70	1.46	1.12	8.975
-1	1	1	1.50	8.35	1.26	1.21	21.90
1	1	1	1.25	2.60	1.40	1.10	7.980

**Tabela 33.** Matrica i eksperimentalno dobiveni rezultati za šest ponavljajućih analiza u centralnoj tački

Faktori			Rezultati				
A	B	C	$t_{RHCT}$	$t_{RLoS}$	$AS_{HCT}$	$AS_{LoS}$	$Rs$
0	0	0	1.60	3.80	1.38	1.05	12.50
0	0	0	1.60	3.79	1.35	1.07	12.30
0	0	0	1.66	4.02	1.43	1.10	12.90
0	0	0	1.60	3.78	1.35	1.10	12.24
0	0	0	1.60	3.79	1.36	1.10	12.24
0	0	0	1.60	3.79	1.36	1.04	12.33

Površina odgovora je dobivena primjenom programa *Design-Expert 7.0*. Model interakcije drugog reda je predložen kao model koji definiše odnos između ulaznih i izlaznih podataka i može se prikazati opštom jednačinom:

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC$$

gdje je  $b_0$  odsječak na  $y$  osi,  $b_i$  ( $b_1, b_2, b_3$ ),  $b_{ij}$  ( $b_{12}, b_{13}, b_{23}$ ) i  $b_{ijk}$  predstavljaju regresione koeficijente i  $A, B, C$  predstavljaju nezavisne varijable. Izračunati koeficijenti i modeli polinomijalne regresije prikazani su u Tabeli 34.

**Tabela 34.** Model koeficijenata

	$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_{12}$	$b_{13}$	$b_{23}$	$b_{123}$
$t_{RHCT}$	2.07	-0.031	0.051	-0.69	-0.014	-0.074	-0.056	-
$t_{RLOS}$	8.41	-3.48	-0.22	-2.84	-	0.57	0.13	-
$AS_{HCT}$	1.36	0.016	-0.12	0.026	-	0.025	-0.048	0.027
$AS_{LOS}$	1.11	0.016	0.086	-0.025	-0.079	0.013	-0.012	-
$Rs$	17.55	-5.67	-0.90	-1.82	-	-1.58	-	0.40



### 4.3.3. Uticaj faktora na retencione osobine molekula

Ponavljanje u centralnoj tački eksperimenta doprinijelo je preciznom dobijanju grešaka eksperimenta i mjere adekvatnosti modela (*lack of fit*). Rezultati su analizirani primjenom ANOVA testa i prikazani su u Tabeli 35.

**Tabela 35.** Statistički parametri modela dobiveni uz pomoć ANOVA

	$SS_{models}$	$SS_{models/df}$	$F$	$P$	$R^2$	$R^2_{adj}$
$t_{RHCT}$	3.89	0.65	1175.60	0.0001	0.9992	0.9983
$t_{RLOS}$	164.76	32.95	11328.47	0.0001	0.9996	0.9987
$A_{SHCT}$	0.04	0.006	8.13	0.0111	0.8904	0.7808
$A_{SLOS}$	0.12	0.02	30.03	0.0003	0.9678	0.9355
$R_s$	311.27	62.25	848.87	0.0001	0.9984	0.9972

SS-suma kvadrata; SS model/df-odnos sume kvadrata i broja stepeni slobode.

Pouzdanost modela je određena izvođenjem Fischer-F testa. Velika vrijednost  $F$  sa vrlo malom vjerovatnoćom (samo modeli sa odgovarajućom  $p$ -vrijednosti manjom od 0.05 su signifikantni sa 95% nivoom pouzdanosti) implicira da ne postoje dokazi za slabu pouzdanost modela, te da model može biti prihvaćen kao adekvatan prezentator podataka. Dodatno, vrijednosti  $R^2$  i  $R^2_{adj}$ , zajedno sa stepenima slobode pokazuju da regresioni model dobro opisuje vezu između podataka. Izuzetak je model koji se odnosi na simetriju pika hidrohlorotiazida.

Podaci dobiveni iz izvedenog FFD dizajna vode do sljedećih zaključaka: protok mobilne faze, udio metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze imaju uticaj na retenciono vrijeme hidrohlorotiazida ( $t_{RHCT}$ ), retenciono vrijeme losartana ( $t_{RLOS}$ ), simetrija pika hidrohlorotiazida ( $A_{SHCT}$ ), simetrija pika losartana ( $A_{SLOS}$ ) i faktor rezolucije ( $R_s$ ) (Tabela 35). Pošto odabrani odgovori ne reaguju isto na faktore, potrebna je dodatna optimizacija.

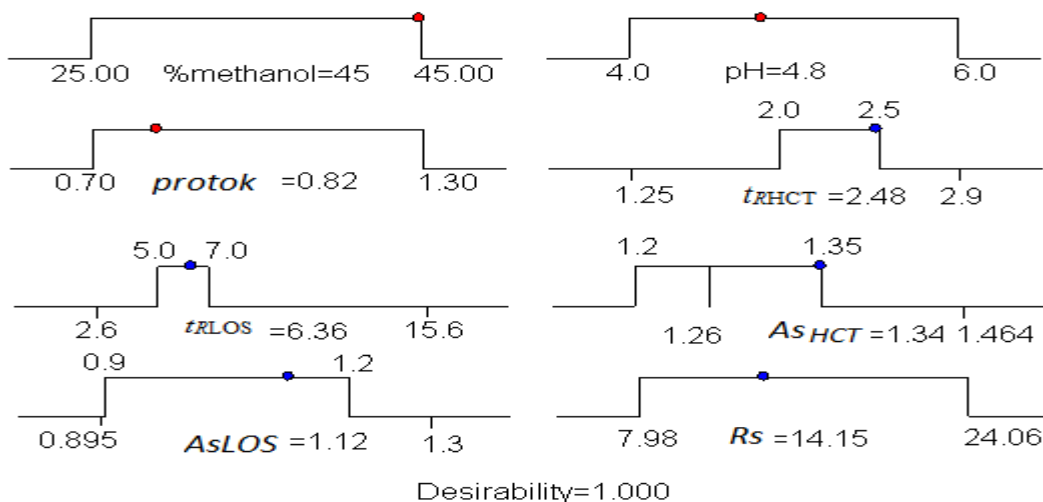
#### 4.3.4. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode

Da bi se dobili najbolji hromatografski uslovi, primijenjena je multikriterijska metodologija sa Derringerovom funkcijom poželjnosti. Funkcija je konstruirana na osnovu poželjnih rangova za svaki odgovor (pojedinačna funkcija poželjnosti,  $d_i$ ) i uspostavljanja ukupne funkcije poželjnosti (Deringerova funkcija poželjnosti). Ciljevi multikriterijske optimizacije za svaki odgovor prikazani su u Tabeli 36.

**Tabela 36.** Kriteriji multivarijantne optimizacije pojedinačnih odgovora

	Cilj	Donja granica	Gornja granica	Nivo	Važnost
Metanol (%)	U opsegu	-1	1	1	3
pH	U opsegu	-1	1	1	3
Protok	U opsegu	-1	1	1	3
$t_{RHCT}$	U opsegu	2	2.5	1	3
$t_{RLOS}$	U opsegu	5	7	1	3
$A_{SHCT}$	U opsegu	1.2	1.35	1	3
$A_{SLOS}$	U opsegu	0.9	1.2	1	3
$R_s$	U opsegu	7.98	24.06	1	3

Računanje funkcije poželjnosti izvedeno je koristeći *Design-Expert*<sup>®</sup> 7.0. Dobiveni rezultati su grafički prikazani na Slici 61.



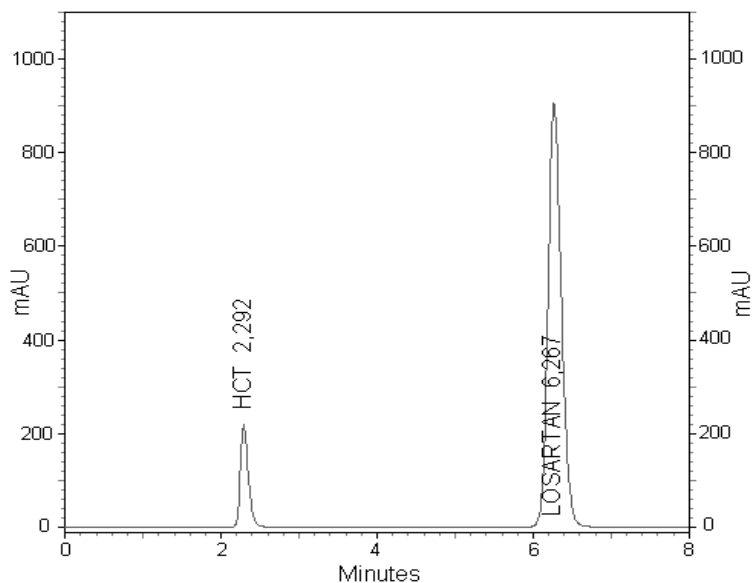
**Slika 61.** Grafički prikaz ograničenja prihvaćenih prilikom izračunavanja globalne funkcije poželjnih odgovora i dobiveni optimalni uslovi

Eksperimentalno dobivene vrijednosti jednake su vrijednostima dobivenim predviđanjem, uz optimizaciju punog faktorskog dizajna (Tabela 37). Optimalni uslovi za izvođenje hromatografskog određivanja postignuti su sa vrijednostima: % metanol=45, pH mobilne faze 4.8 i protok mobilne faze 0.82 mL/min (pri temperaturi kolone od 25 °C).

**Tabela 37.** Rezultati nakon optimizacije

Dobiveni optimalni uslovi			Rezultati					
Metanol (%)	pH	Protok (mL/min)		$t_{RHCT}$	$t_{RLOS}$	$AS_{HCT}$	$AS_{LOS}$	$Rs$
45	4.8	0.82	Predviđeni	2.48	6.36	1.34	1.12	14.2
Poželjnost (D)=1.00			Eksperimentalni	2.29	6.27	1.31	1.10	15.8

Reprezentativni hromatogram dobiven pod optimalnim uslovima prikazan je na Slici 62.



**Slika 62.** Hromatogram hidrohlorotiazida i losartana nakon optimizacije uslova hromatografskog određivanja

#### 4.3.5. Validacija HPLC metode za određivanje hidrohlorotiazida i losartana

Nakon definisanja optimalnih uslova, analitička metoda je validirana [168]. Na retencionim vremenima losartana i hidrohlorotiazida nisu detektovani interferentni pikovi, što dokazuje dobru selektivnost metode. Eksperimentalno je određena linearna

zavisnost površina ispod pikova i koncentracije losartana i hidrohlorotiazida. Parametri jednačine linearne regresije izračunati su i prikazani u Tabeli 38. Statistička signifikantnost odsječka na y osi testirana je primjenom Student t-testa. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) su izračunati prema jednačini  $LOD = 3\sigma/S$  i  $LOQ = 10\sigma/S$ , gdje je  $\sigma$  standardna devijacija odgovora i S je odsječak određen iz jednačine odgovarajuće kalibracione krive.

**Tabela 38.** Statistički parametri za pojedinačne kalibracione krive

Parametar	HCT	LOS
Koncentracija(mg/mL)	0.025-0.125	0.01 - 0.5
Nagib	0.1277	0.2035
Odsječak	0.032	0.0251
R <sup>2</sup>	0.9966	0.9952
LOD	0.02	0.08
LOQ	0.06	0.24

Preciznost metode je određena analizom devet rastvora poznatih koncentracija ispitivanih supstanci (Tabela 39). Niske vrijednosti relativne standardne devijacije za ponovljivost,  $RSD < 2.5\%$ , i visoka *Recovery* vrijednost potvrđuju dobru preciznost predložene metode.

**Tabela 39.** Preciznost HPLC metode

Uzorak	Injektovano(mg/mL)	Određeno(mg/mL)	RSD (%)
Losartan	0.80	0.8108	0.45
	1.00	1.0142	0.54
	1.20	1.2162	0.70
Hidrohlorotiazid	0.20	0.2025	1.01
	0.25	0.2528	1.18
	0.30	0.3058	1.28

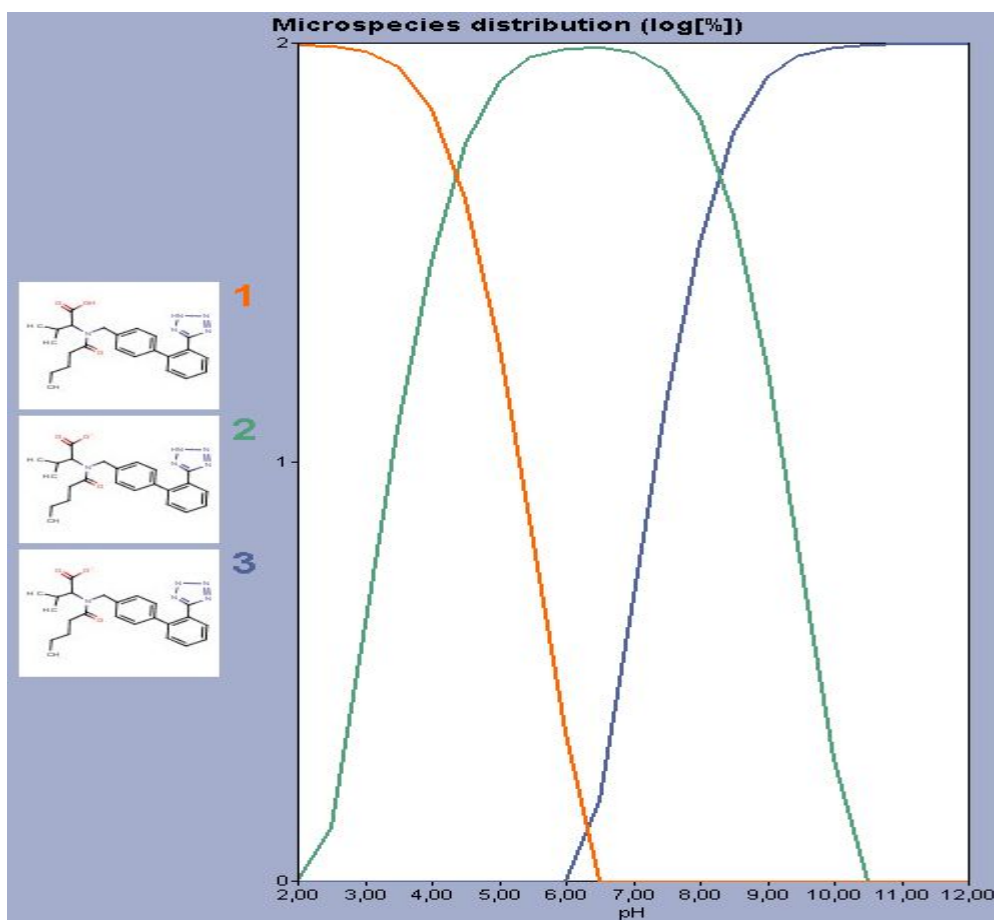
Primjenljivost ove metode je dokazana analizom komercijalno dostupnih tableta koje sadrže kombinaciju losartana i hidrohlorotiazida.

#### 4.4. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE VALSARTANA, HIDROHLOROTIAZIDA I AMLODIPINA

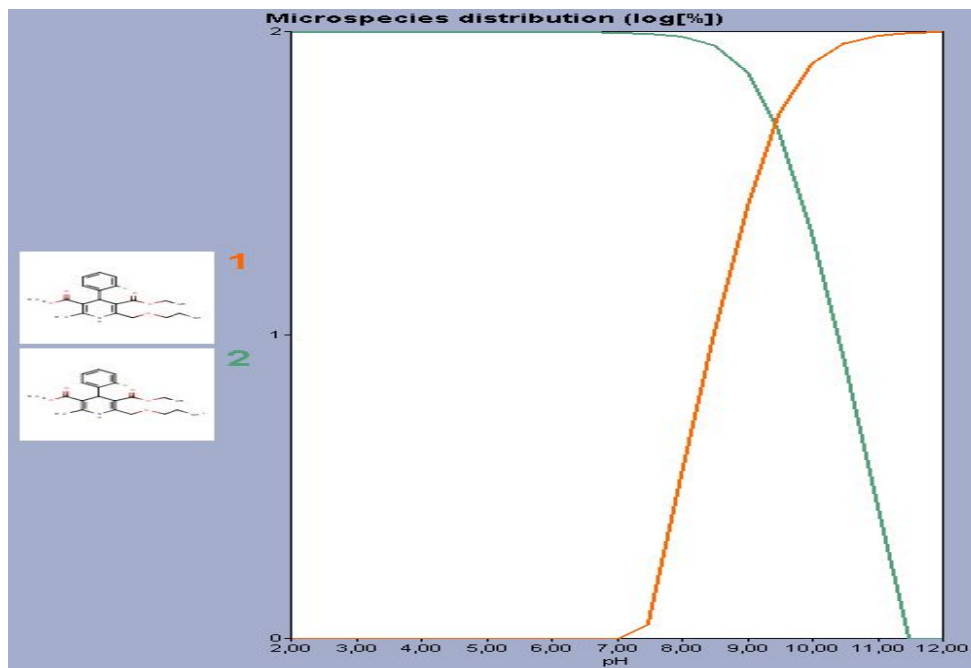
##### 4.4.1. Analiza strukture i jonizaciona stanja molekula

Kombinacija valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida pokazala se kao efikasna i sigurna u snižavanju krvnog pritiska kod različitih tipova pacijenata sa hipertenzijom. Terapija kombinovanim molekulama sa različitim antihipertenzivnim mehanizmima smanjuje neželjene efekte pojedinačnih molekula, a poboljšava njihovo djelovanje. Nivo kontrole krvnog pritiska postiže se puno brže, te se na taj način poboljšava i komplijansa.

Distribucija jonizacionih oblika valsartana i amlodipina u zavisnosti od pH je urađena u programu *MarvinSketch*, a rezultati su prikazani na Slici 63 i 64.

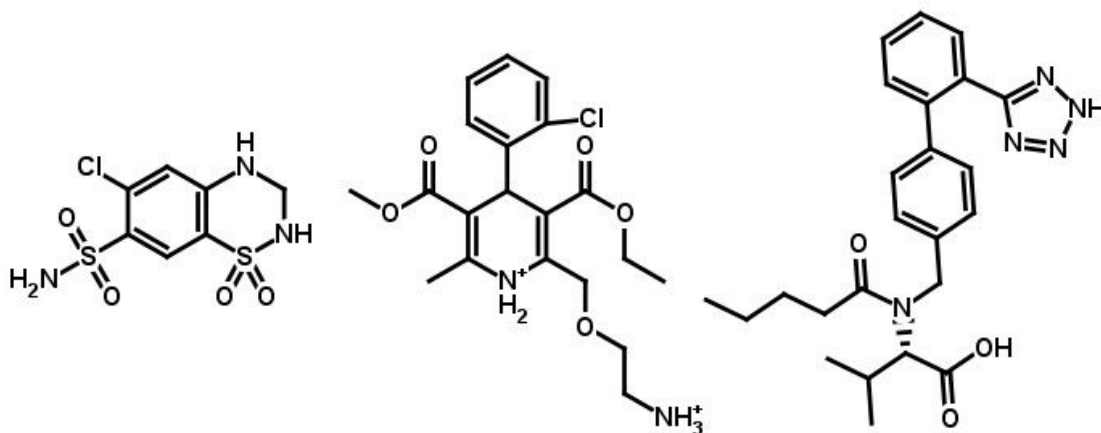


Slika 63. Jonizacioni profil valsartana u funkciji pH sredine



Slika 64. Jonizacioni profil amlodipina u funkciji pH sredine

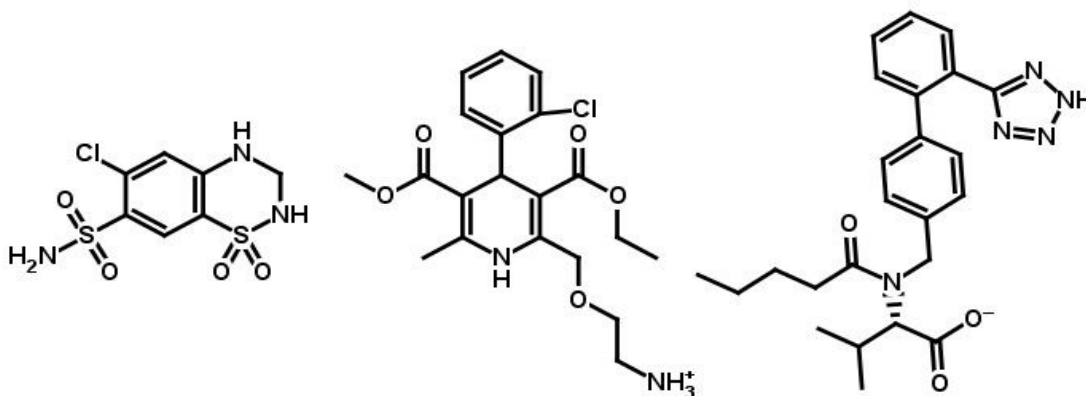
U radu je već navedeno da hidrohlorotiazid ima tri  $pK_a$  vrijednosti (9.09, sulfonamidna grupa; 9.83 ciklični sulfonamid; 11.31, sekundarni amin). Podaci dobiveni primjenom *MarvinSketcha* pokazuju da amlodipin ima  $pK_a$  vrijednost 9.45 koja odgovara azotu alkilamina dok valsartan ima dvije  $pK_a$  vrijednosti (4.37, karboksilna grupa; 8,30, tetrazolni azot). Ako se uzmu u obzir hemijske strukture i  $pK_a$  vrijednosti, moguće je pretpostaviti dominantne jonizujuće oblike hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana u odabranoj mobilnoj fazi.



Slika 65. Dominantne molekulske vrste hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana pri pH 2.5

Na osnovu kiselinsko baznih osobina hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana, pH interval od 2.5 to 4.5 odabran je za dalju analizu. Na pH vrijednosti 2.5 dominantni oblik hidrohlorotiazida i valsartana su nejonzovani oblici, dok je u ovom opsegu pH vrijednosti azot amlodipina jonizovan (Slika 65).

Na maksimalnoj vrijednosti pH od 4.5 hidrohlorotiazid je još uvijek u nejonzovanom obliku, amlodipin ima protonizirani aminski azot, a karboksilna grupa valsartana je ok 57 % jonizovana (Slika 66).



**Slika 66.** Dominantne molekulske vrste hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana pri pH 4.5.

Zbog značaja particionog koeficijenta kao parametra koji definiše fizičko-hemijske osobine i raspodjelu među fazama (a time i retenciju jedinjenja na koloni), analizirana je i logP vrijednost ispitivanih jedinjenja. Utvrđene vrijednosti su: za hidrohlorotiazid ( $\log P = -0.58$ ), amlodipin ( $\log P = 1.64$ ) i valsartan ( $\log P = 5.27$ ).

#### 4.4.2. Optimizacija HPLC uslova

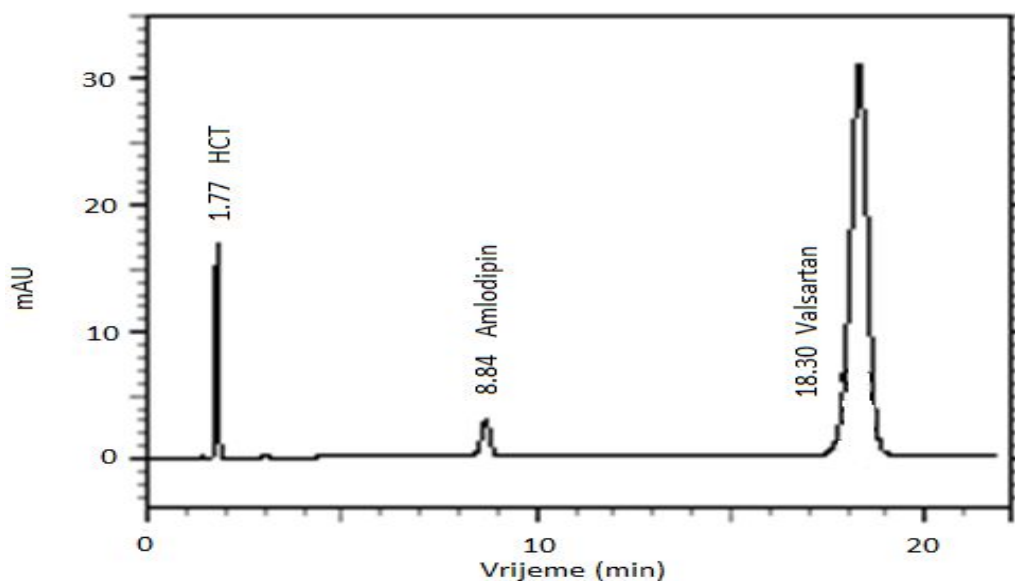
U postupku optimizacije hromatografskih uslova za određivanje hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana tokom preliminarne studije definisane su nezavisne varijable. Nezavisne varijable koje su odabrane kao faktori čiji uticaj će se ispitivati su: sadržaj metanola, pH mobilne faze i temperatura kolone.

Kao zavisne varijable praćeno je osam odgovora sistema: retenciono vrijeme hidrohlorotiazida ( $t_{RHCT}$ ), retenciono vrijeme amlodipina ( $t_{RAML}$ ), retenciono vrijeme valsartana ( $t_{RVAL}$ ), simetrija pika hidrohlorotiazida ( $As_{HCT}$ ), simetrija pika amlodipina ( $As_{AML}$ ), simetrija pika valsartana ( $As_{VAL}$ ) i rezolucija ( $Rs_{AML}$  i  $Rs_{VAL}$ ).

Preliminarna analiza hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana izvedena je na nepolarnoj stacionarnoj fazi (Zorbax C8 kolona, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm) sa mobilnom fazom koja se sastoji od metanol-acetonitril-acetatni pufer (30:20:50 v/v/v). pH mobilne faze podešen je na 4.0 sa acetatnom kiselinom. Temperatura kolone je podešena na 25 °C, a protok mobilne faze na 1 mL/min.

Na bazi struktura i fizičko-hemijskih karakteristika ispitivanih jedinjenja kao i sastava mobilne faze moguće je predvidjeti redoslijed eluiranja. U uslovima izvođenja RP-HPLC očekivano je da redoslijed eluiranja bude: hidrohlorotiazid, amlodipin, valsartan.

Separacija postignuta pod navedenim uslovima je bila prihvatljiva (Slika 67), ali je bilo potrebno optimizovati oblik pika i smanjiti vrijeme trajanja analize. Kako retencija supstanci zavisi od udjela volumena organskog rastvarača u mobilnoj fazi za dalju optimizaciju odabran je opseg koncentracije metanola od 30% do 50%.



Slika 67. Hromatogram hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana prije optimizacije



#### 4.4.3. Određivanje faktora i njihov uticaj na retencione karakteristike

Optimalni hromatografski uslovi su procijenjeni *face centered* centralnim kompozitnim dizajnom i primjenom Derringer-ove funkcije poželjnih odgovora. Ovaj tip dizajna je izabran, jer je fleksibilan i visoko efikasan. Ukupan broj eksperimenata kod *face centered* centralnog kompozicionog dizajna je definisan jednačinom  $2^k + 2k + n$ , gdje je  $k$  broj praćenih varijabli (izabrano  $k = 3$ ), a  $n$  je broj ponavljanja centralne tačke (izabrano  $n = 6$ ). Centralna tačka je ponovljena 6 puta u cilju procjene eksperimentalne greške. Ispitivani faktori su prikazani u Tabeli 40.

**Tabela 40.** Ispitivani faktori i faktorski nivoi u stvarnim i kodiranim vrijednostima

Ispitivani faktor	Donji nivo (-1)	Nominalni nivo (0)	Gornji nivo (+1)
Udio metanola (%)	50	40	30
pH mobilne faze	2.5	3.5	4.5
Temperatura kolone (°C)	30	40	50

Eksperimenti su izvođeni prema planu ka centru orijentisanom centralnog kompozicionog dizajna (eng. *face centered central composite design*) sa 6 replikacija u centralnoj tački. Prvih 8 eksperimenata pripada punom faktorskom dizajnu za 3 faktora ( $2^n = 8$ ). Sljedećih 6 eksperimenata pripada zvijezda dizajnu ( $2n = 6$ ), pri čemu dužina kraka zvijezde  $\alpha$  iznosi 1. Posljednjih 6 eksperimenata predstavljaju ponavljanja u centralnoj tački. Ukupan broj eksperimenata dizajna pri praćenju uticaja 3 faktora i izvođenju 6 ponavljanja u centralnoj tački iznosi 20. Eksperimenti su izvođeni nasumično, kako bi se uticaj nekontrolisanih faktora sveo na minimum i na taj način spriječilo nepredviđeno ponašanje sistema.

Pošto je u okviru preliminarnih istraživanja utvrđeno da je faktor rezolucije amlodipina i valsartana veći od 2.0 ovaj faktor je isključen iz daljeg procesa optimizacije (sve analize zadovoljavaju kriterij za rezoluciju pika:  $R_s > 1.5$ ). Kao odgovori sistema praćena su retenciona vremena i faktori simetrije pikova hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana (Tabela 41).

Tabela 41. Plan eksperimenata i dobiveni rezultati

Faktori		A	B	C			Rezultati		
Analiza	%Metanol	pH	T (°C)	$t_{RHCT}$	$t_{RAML}$	$t_{RVAL}$	$As_{HCT}$	$As_{AML}$	$As_{VAL}$
1	30	2.5	30	1.71	5.05	14.6	1.30	1.05	0.91
2	50	2.5	30	1.56	1.89	3.11	1.55	1.27	1.11
3	30	4.5	30	1.78	8.69	18.3	1.25	0.97	0.93
4	50	4.5	30	1.56	2.52	2.40	1.44	1.15	1.15
5	30	2.5	50	1.63	3.75	9.87	1.25	1.01	0.82
6	50	2.5	50	1.57	1.69	5.68	1.40	1.30	1.10
7	30	4.5	50	1.67	5.98	11.8	1.31	0.87	0.84
8	50	4.5	50	1.52	2.20	2.45	1.34	1.18	1.08
9	30	3.5	40	1.73	3.79	15.3	1.19	1.19	1.17
10	50	3.5	40	1.56	1.83	4.21	1.40	1.26	1.22
11	40	2.5	40	1.60	3.13	6.80	1.31	1.16	0.90
12	40	4.5	40	1.57	3.60	3.46	1.40	1.16	1.19
13	40	3.5	30	1.65	4.16	6.96	1.23	1.09	1.24
14	40	3.5	50	1.59	3.23	4.72	1.25	1.07	1.14
15	40	3.5	40	1.62	3.16	6.02	1.27	1.07	1.39
16	40	3.5	40	1.62	3.75	5.58	1.24	1.06	1.21
17	40	3.5	40	1.61	3.14	6.93	1.24	1.02	1.37
18	40	3.5	40	1.62	2.84	6.02	1.24	1.12	1.36
19	40	3.5	40	1.62	3.75	6.92	1.14	1.13	1.23
20	40	3.5	40	1.59	3.23	6.02	1.25	1.11	1.19

Matematički model koji definiše korelaciju ispitivanih varijabli i praćenih odgovora dobiven je korištenjem *Design-Expert* 8.0.7.1 softvera (Stat-Ease Inc. Minneapolis, MN, USA). Kvadratni model je preporučen za odnos između ulaznih faktora i izlaznih odgovora.

Preporučeni matematički model prikazan je jednačinom:

$$y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{11}A^2 + b_{22}B^2 + b_{33}C^2$$

gdje je  $b_0$  odsječak na  $y$  osi,  $b_i$  ( $b_1, b_2, b_3$ ),  $b_{ij}$  ( $b_{12}, b_{13}, b_{23}$ ) i  $b_{ijk}$  predstavljaju regresione koeficijente, a  $A$ ,  $B$ , i  $C$  predstavljaju nezavisne varijable. Izračunate kvadratne matematičke korelacije između ispitivanih faktora i odabranih odgovora sistema prikazane su u Tabeli 42 i 43.

**Tabela 42.** Koeficijenti kvadratnih modela za retenciona vremena i njihova statistička značajnost

	$t_{RHCT}$		$t_{RAML}$		$t_{RVAL}$	
	Koeficijent	$p$ -vrijednost	Koeficijent	$p$ -vrijednost	Koeficijent	$p$ -vrijednost
$b_0$	1.610	-	3.210	-	6.210	-
$b_1$	-0.075	< 0.0001*	-1.710	< 0.0001*	-5.210	< 0.0001*
$b_2$	0.003	0.5019	0.750	0.0017*	-0.160	0.5806
$b_3$	-0.028	< 0.0001*	-0.550	0.0114*	-1.080	0.0030*
$b_{12}$	-0.020	0.0020*	-0.590	0.0135*	-1.200	0.0030*
$b_{13}$	0.020	0.0020*	0.440	0.0517	1.720	0.0002*
$b_{23}$	-0.001	0.0645	-0.190	0.3557	-0.530	0.1190
$b_{11}$	0.032	0.0028*	-0.240	0.4957	3.620	< 0.0001*
$b_{22}$	-0.028	0.0070*	0.320	0.3691	-1.010	0.0845
$b_{33}$	0.007	0.3966	0.650	0.0838	-0.300	0.5816

**Tabela 43.** Koeficijenti kvadratnih modela za faktore simetrije pikova i njihova statistička značajnost

	$AS_{HCT}$		$AS_{AML}$		$AS_{VAL}$	
	Koeficijent	$p$ -vrijednost	Koeficijent	$p$ -vrijednost	Koeficijent	$p$ -vrijednost
$b_0$	1.240	-	1.110	-	1.270	-
$b_1$	0.083	0.0003*	0.110	0.0005*	0.099	0.0094*
$b_2$	-0.007	0.6599	-0.046	0.0536	0.035	0.2837
$b_3$	-0.022	0.1846	-0.010	0.6447	-0.036	0.2709
$b_{12}$	-0.022	0.2216	-0.003	0.9174	-0.003	0.9437
$b_{13}$	-0.032	0.0891	0.025	0.3127	0.013	0.7250
$b_{23}$	0.020	0.2735	-0.008	0.7563	0.008	0.8325
$b_{11}$	0.038	0.2289	0.069	0.1157	-0.044	0.4759
$b_{22}$	0.098	0.0078*	0.004	0.9208	-0.190	0.0082*
$b_{33}$	-0.017	0.5704	-0.076	0.0877	-0.049	0.4283

#### 4.4.3.1. Statistička obrada rezultata

Procjena efekata izabranih faktora vršena je analizom koeficijenata polinoma, koji su defnisani za kodirane vrijednosti faktora. Koeficijenti  $b_1$ ,  $b_2$  i  $b_3$  pokazuju uticaj pojedinačnih faktora na odgovore sistema, dok koeficijenti  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  i  $b_{23}$  ukazuju na uticaj interakcija ispitivanih faktora. Faktor čiji koeficijent ima najveću apsolutnu vrijednost pokazuje najveći uticaj na odgovor sistema koji se prati. Predznak koeficijenta pokazuje uticaj na odgovor – ukoliko je pozitivan, faktor dovodi do

povećanja odgovora sistema, ukoliko je negativan, faktor dovodi do smanjenja odgovora sistema. Statističkom obradom podataka izračunate su  $p$ -vrijednosti na osnovu kojih su donijeti zaključci o statističkoj značajnosti uticaja ispitivanih faktora. Statistička analiza urađena je za nivo značajnosti  $\alpha = 0.05$  i nivo pouzdanosti 95 %. Ukoliko je  $p$ -vrijednost za koeficijent faktora manja od 0.05 faktor ima statistički značajan uticaj na odgovor sistema. Dobiveni rezultati prikazani su u Tabelama 42 i 43, pri čemu su zvjezdicom označeni oni faktori za koje je dobivena  $p$ -vrijednost manja od 0.05.

Pokazalo se da sva tri faktora imaju uticaj na analizirani sistem i praćene odgovore sistema, a uočeno je i da uticaj pojedinih faktorskih interakcija nije zanemarljiv. Sadržaj metanola u mobilnoj fazi ima najveći uticaj na retenciono vrijeme valsartana ( $t_{RVAL}$ ) i amlodipina ( $t_{RAML}$ ). Ovaj efekat ima negativan predznak, što znači da povećanje koncentracije metanola vodi do smanjenja retencionog vremena. Uticaj metanola na simetriju pikova ima pozitivan znak, što implicira da povećanje sadržaja metanola dovodi do povećanja simetrije pika.

Na retenciono vrijeme hidrohlorotiazida najveći uticaj ima udio metanola u mobilnoj fazi i temperatura kolone, kao i njihova međusobna interakcija i interakcija udjela metanola u mobilnoj fazi i pH vrijednosti vodene faze. Na retenciono vrijeme amlodipina imaju uticaj sva tri ispitivana faktora, pri čemu je uticaj udjela metanola u mobilnoj fazi najveći. Također, značajan je i uticaj interakcije udjela metanola u mobilnoj fazi i pH vrijednosti vodene faze.

Rezultati pokazuju da promjena pH ne utiče značajno na retenciono vrijeme i simetriju pika hidrohlorotiazida, dok na retenciono vrijeme i simetriju amlodipina i valsartana ima različit uticaj (pozitivan uticaj na  $t_{RAML}$  i  $As_{VAL}$ , a negativan uticaj na  $t_{RVAL}$  i  $t_{RAML}$ ). Efekat temperature je prisutan sa negativnim predznakom, što znači da povećanje temperature skraćuje retenciono vrijeme valsartana i amlodipina i smanjuje simetriju pikova. Na faktore simetrije pikova sva tri ispitivana analita utiče samo udio metanola u mobilnoj fazi.

Najpouzdanija metoda za procjenu adekvatnosti modela je primjena analize varijanse (ANOVA test). ANOVA poredi variranja nastala usljed promjena u kombinaciji nivoa

faktora sa variranjem nastalim usljed nasumične greške tokom izvođenja eksperimenata. Dobivene vrijednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) su veoma blizu maksimalne vrijednosti 1, odnosno za sve modele veće su od 0.80 pa je zaključeno da modeli na odgovarajući način opisuju ponašanje sistema. U Tabeli 44 prikazane su vrijednosti koeficijenta determinacije prilagođene za odgovarajući broj stepeni slobode, odnosno vrijednosti prilagođene imajući u vidu ukupan broj izvedenih eksperimenata ( $adj. R^2$ ). Rezultati su prikazani u Tabeli 44.

**Tabela 44.** Statistički parametri modela dobiveni uz pomoć ANOVA

<i>Odgovor</i>	$SS_{models}$	$SS_{models/df}$	$F$	$P$	<i>Lack-of-fit</i>	$R^2$	$R^2_{adj}$
$t_{RHCT}$	0.076	0.0084	45.25	0.0001	0.3263	0.976	0.9545
$t_{RAML}$	45.26	5.0289	16.12	0.0001	0.0893	0.9355	0.8775
$t_{RVAL}$	365.55	40.62	53.05	0.0001	0.0758	0.9795	0.9610
$AS_{HCT}$	0.15	0.017	7.2	0.0024	0.3928	0.8662	0.7459
$AS_{AML}$	0.14	0.047	10.28	0.0005	0.1081	0.6585	0.5945
$AS_{VAL}$	0.45	0.05	5.28	0.0079	0.3865	0.8262	0.6698

SS-suma kvadrata; SS model/df-odnos sume kvadrata i broja stepeni slobode.

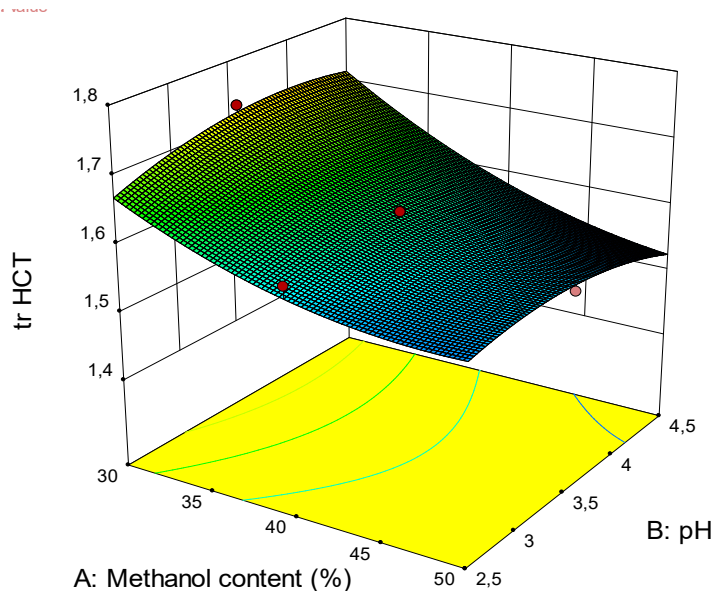
Vrijednosti *Lack of fit* testa nisu bile statistički značajne za nivo značajnosti  $\alpha = 0.05$  i nivo pouzdanosti 95 % budući da su za sve modele imale vrijednost veću od 0.05. Ovo dokazuje da ne postoji neslaganje između eksperimentalno dobivenih rezultata i vrijednosti koje se predviđaju modelom, odnosno potvrđuje da modeli na odgovarajući način opisuju ponašanje sistema.

Dodatno, vrijednosti  $R^2$  i  $R^2_{adj}$ , zajedno sa stepenima slobode pokazuju da regresioni model dobro definiše vezu između podataka. Izuzetak je model koji se odnosi na simetriju pika amdlodipina.

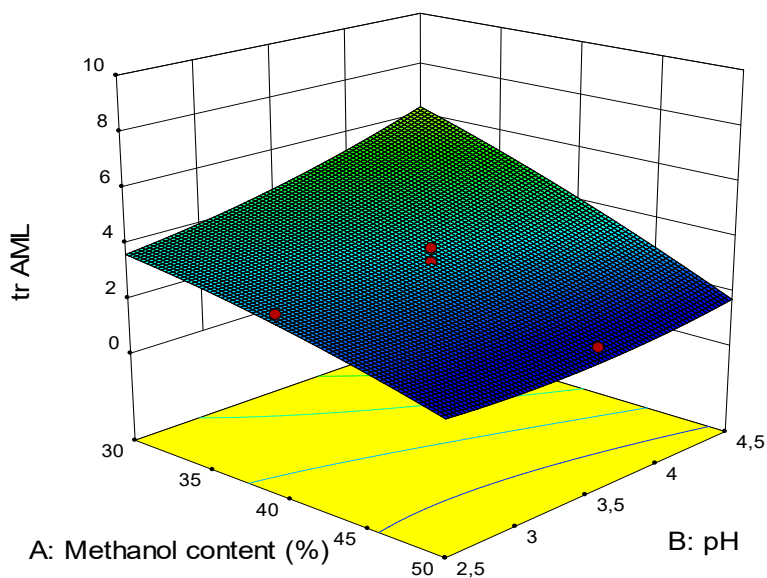
#### 4.4.3.2. Grafička obrada rezultata

Uz pomoć softvera, konstruisani su 3D grafikoni površine odgovora koji predstavljaju vizualizaciju u 3D prostoru promjene praćenog odgovora sistema u zavisnosti od uticaja promjene ispitivanih faktora u paru. 3D grafikoni omogućavaju lakšu procjenu uticaja

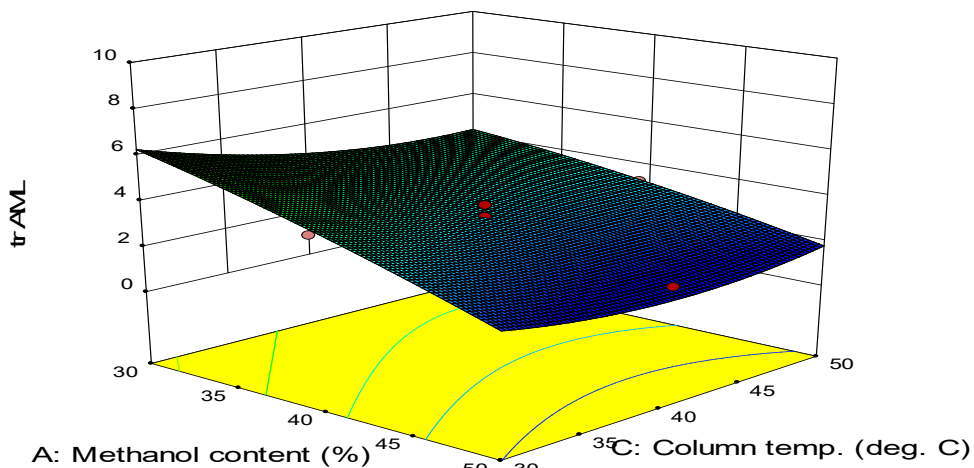
faktora i faktorskih interakcija na praćene odgovore sistema. Što je površina odgovora sistema više zakrivljena (strmiji nagib), to je veći uticaj faktora na odgovor koji se prati. Što je više izraženo talasanje površine odgovora sistema, to je veći uticaj faktorskih interakcija na odgovor koji se prati.



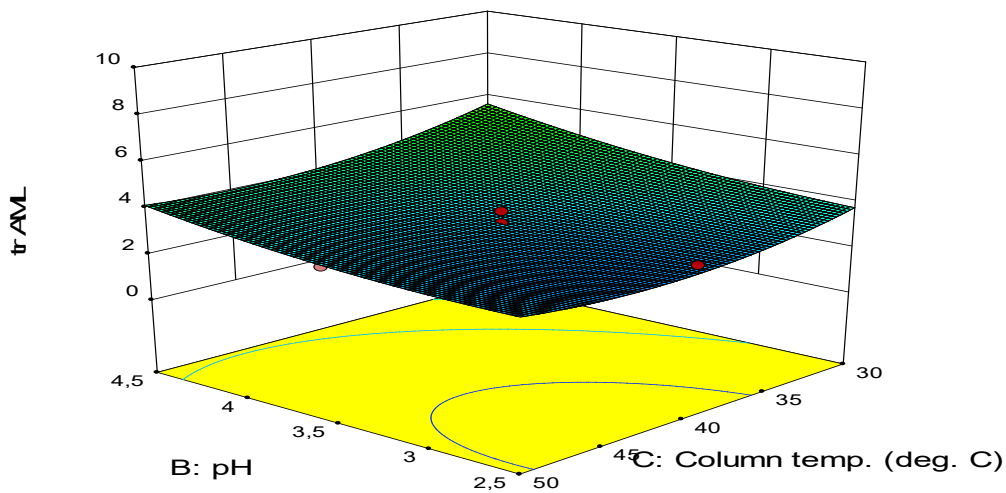
**Slika 68.** 3D prikaz utjecaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene pH vrijednosti vodene faze na retenciono vrijeme hidrohlorotiazida



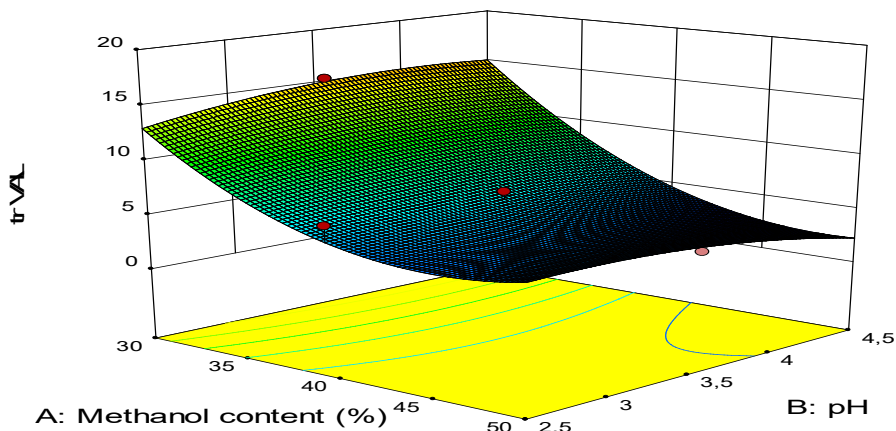
**Slika 69.** 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene pH vrijednosti vodene faze na retenciono vrijeme amlodipina



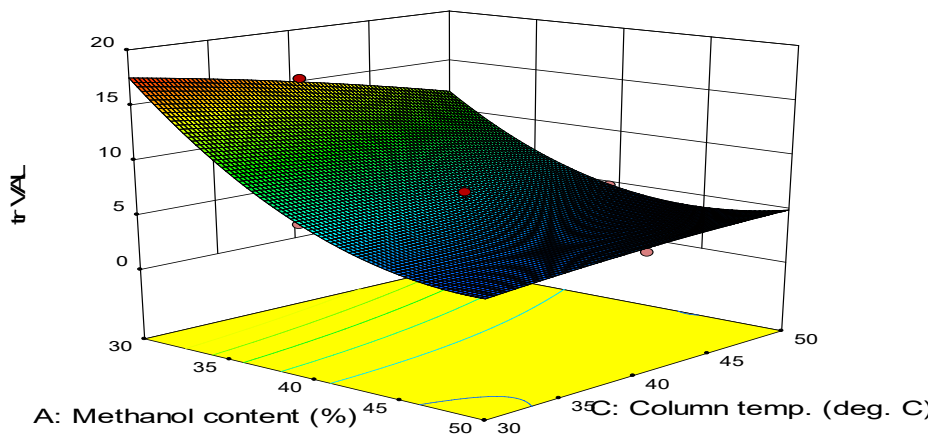
Slika 70. 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola i promjene temperature kolone na retenciono vrijeme amlodipina



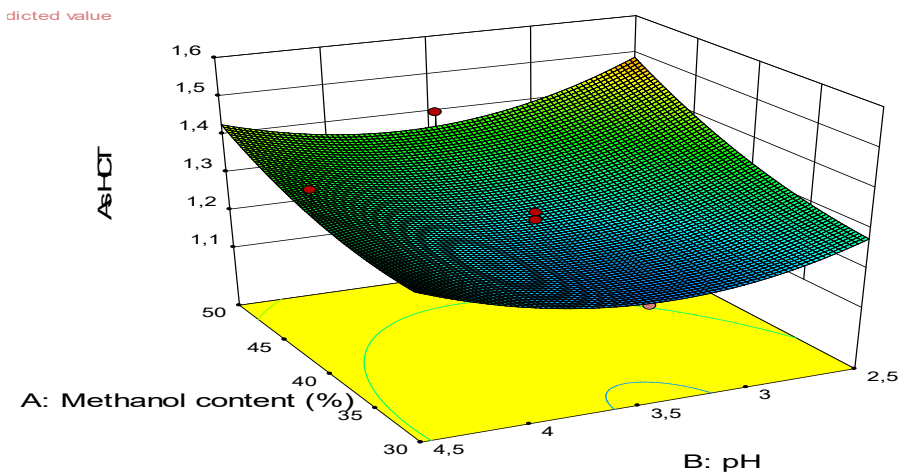
Slika 71. 3D prikaz uticaja promjene pH vrijednosti vodene faze i promjene temperature kolone na retenciono vrijeme amlodipina



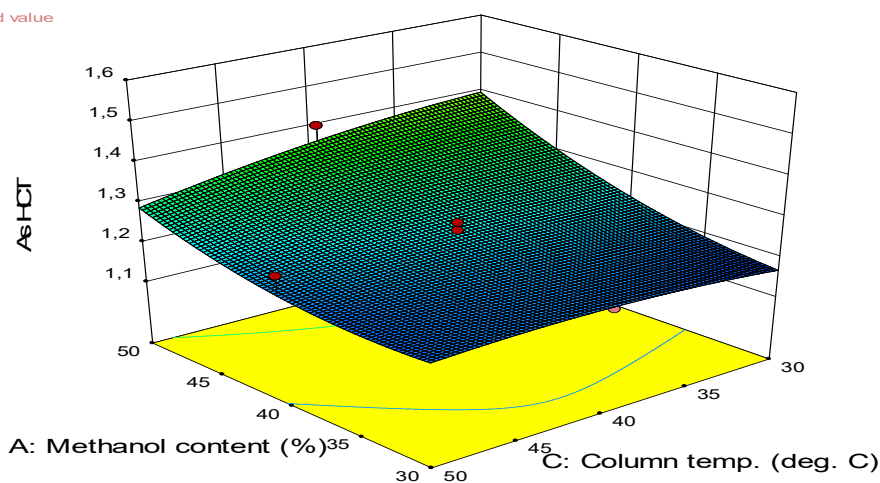
Slika 72. 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene pH vrijednosti vodene faze na retenciono vrijeme valsartana



**Slika 73.** 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene temperature kolone (B) na retenciono vrijeme valsartana

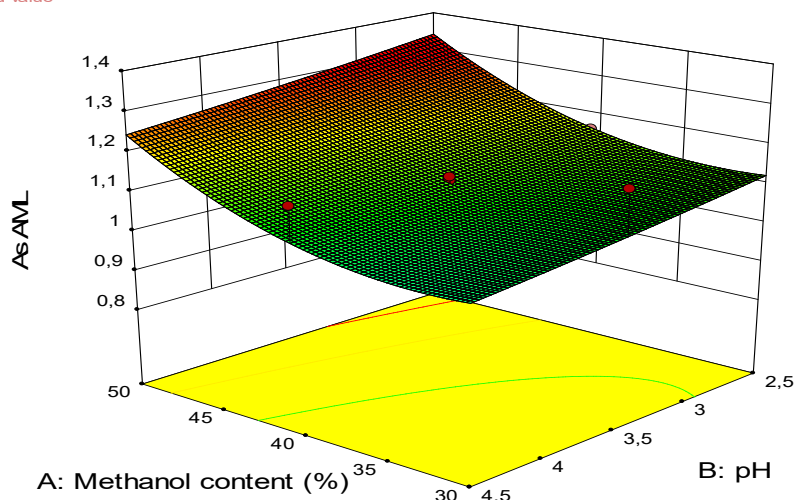


**Slika 74.** 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene pH vrijednosti vodene faze na faktor simetrije pika hidrohlorotiazida

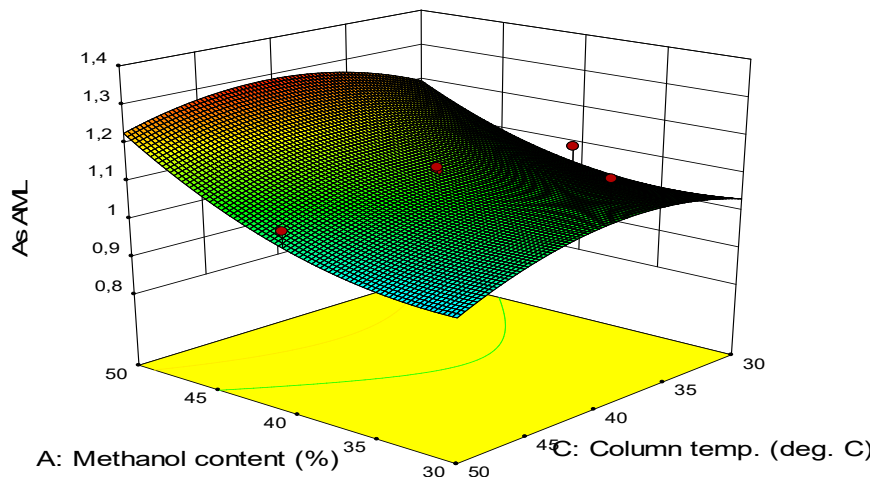


**Slika 75.** 3D prikaz uticaj promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene temperature kolone na faktor simetrije pika hidrohlorotiazida

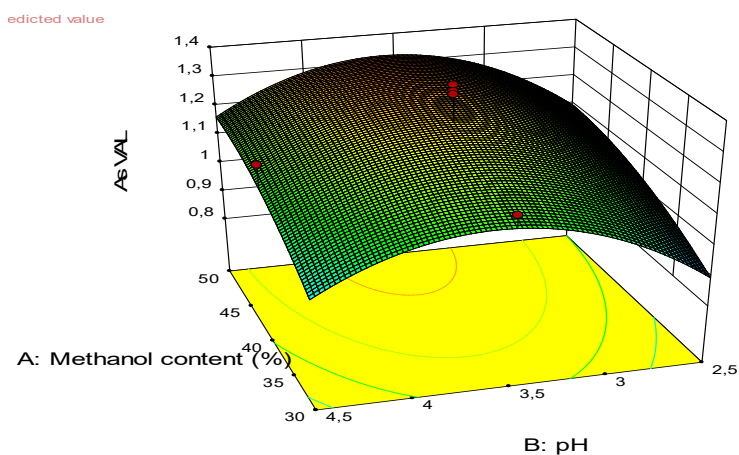




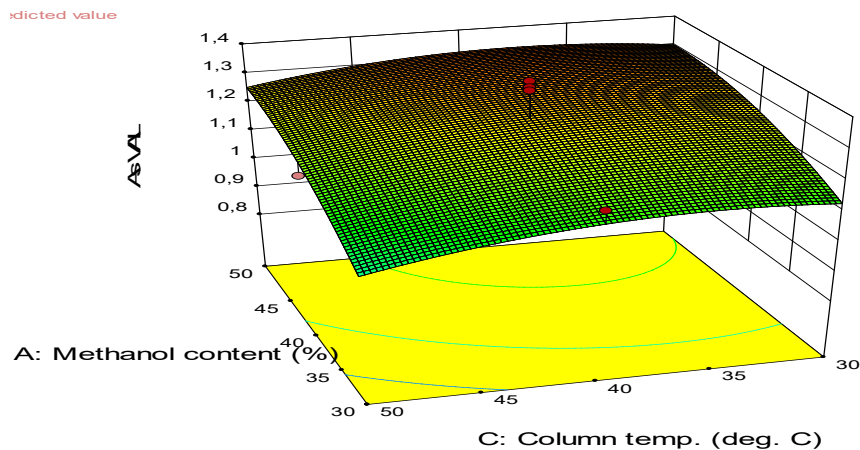
**Slika 76.** 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene temperature kolone na faktor simetrije pika amlodipina



**Slika 77.** 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene pH vrijednosti vodene faze na faktor simetrije pika amlodipina



**Slika 78.** 3D prikaz uticaja promjene udjela metanola u mobilnoj fazi i promjene pH vrijednosti vodene faze na faktor simetrije pika valsartana



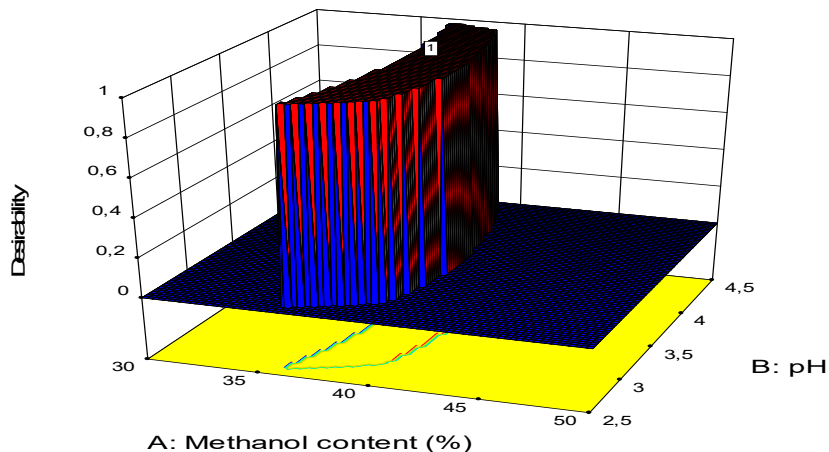
Slika 79. 3D prikaz uticaj promjene sadržaja metanola u mobilnoj fazi i promjene temperature kolone na faktor simetrije pika valsartana

#### 4.4.4. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode

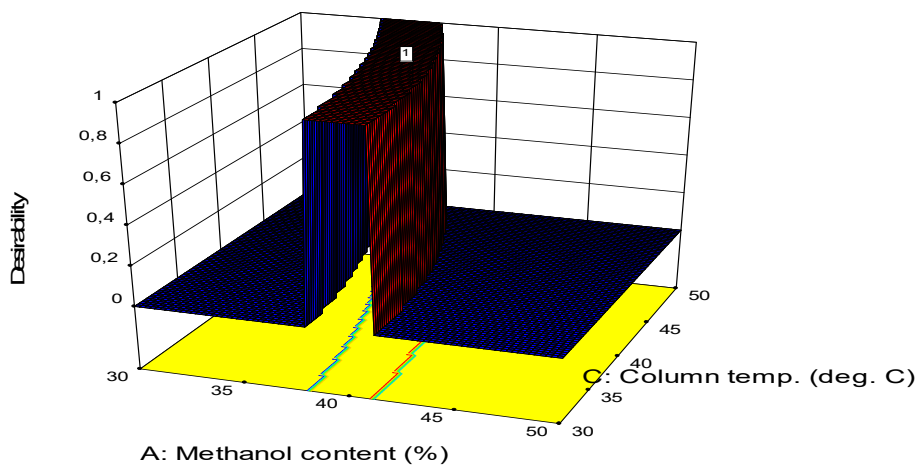
Kako ispitivani faktori nisu na isti način uticali na posmatrane odgovore sistema, izvršena je višekriterijumska optimizacija hromatografskih uslova za analizu smjese hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana izračunavanjem *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora. Najprije su definisani ciljevi za svaki od posmatranih odgovora sistema. Za sve ispitivane faktore izabran je isti težinski faktor (*weight* = 1) i isti nivo značajnosti da se zadovolje postavljeni ciljevi optimizacije (*importance* = 3). Izračunate su pojedinačne funkcije poželjnih odgovora *di* za svaki posmatrani odgovor sistema pojedinačno, a zatim je izračunata globalna *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora sistema *D*. Softver je ukazao na kombinacije nivoa faktora koje su dovodile do maksimalne vrednosti funkcije  $D = 1$ .

Tabela 45. Kriteriji za multivarijantnu optimizaciju individualnih odgovora

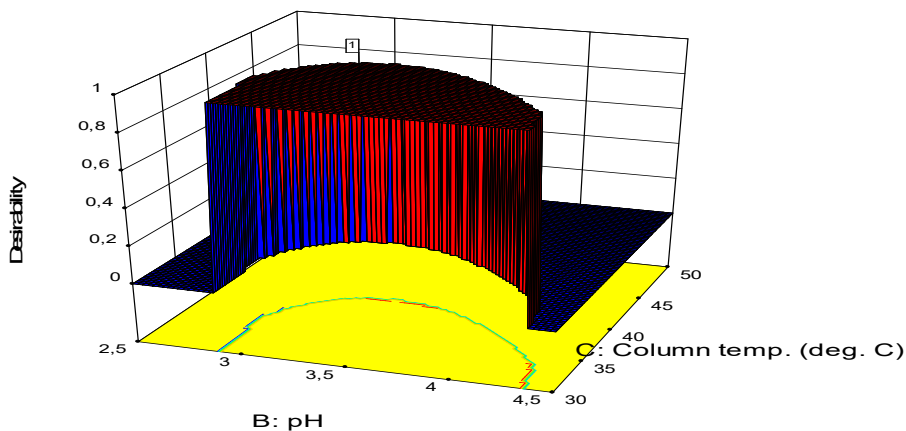
	Cilj	Donja granica	Gornja granica	Važnost	Weight
	%Metanol	30	50	3	1
	pH	2.5	4.5	3	1
	$T(C)$	30	50	3	1
	$t_{RHCT}$	1.60	1.78	3	1
	$t_{RAML}$	2.50	5.00	3	1
	$t_{RVAL}$	6.00	8.00	3	1
	$AS_{HCT}$	1.14	1.30	3	1
	$AS_{AML}$	0.90	1.30	3	1
	$AS_{VAL}$	0.90	1.30	3	1



Slika 80. 3D grafikon zavisnosti globalne funkcije poželjnih odgovora od promjene ispitivanih faktora:  $D = f(\% \text{ Met, pH})$



Slika 81. 3D grafikon zavisnosti globalne funkcije poželjnih odgovora od promjene ispitivanih faktora:  $D = f(\% \text{ Met, temp})$

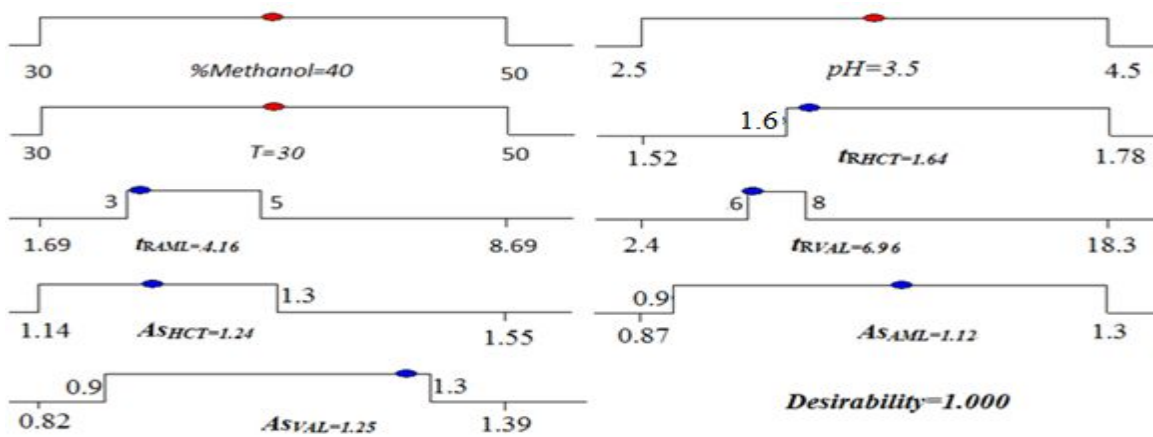


Slika 82. 3D grafikon zavisnosti globalne funkcije poželjnih odgovora od promjene ispitivanih faktora:  $D = f(\% \text{ Met, temp})$

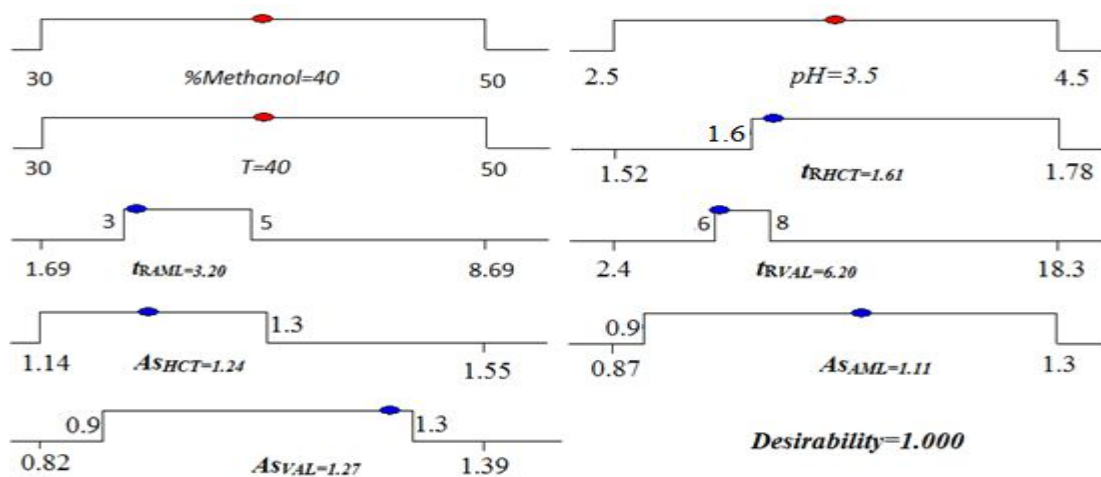
Softver je ponudio 42 rješenja koja ispunjavaju kriterije poželjnosti ( $D=1.000$ ). Pregledom svih rješenja, uočeno je da dva rješenja od 42 predstavljaju već postojeće tačke analize (Tabela 46, Slika 83 i 84).

**Tabela 46.** Dva rješenja koja ispunjavaju kriterije analize

Rješenje	%Metanol	pH	T (°C)	$t_{RHCT}$	$t_{RAML}$	$t_{RVAL}$	$AS_{HCT}$	$AS_{AML}$	$AS_{VAL}$
Rješenje 1	40	3.5	30	1.64	4.16	6.96	1.24	1.12	1.25
Rješenje 6	40	3.5	40	1.61	3.20	6.20	1.24	1.12	1.27

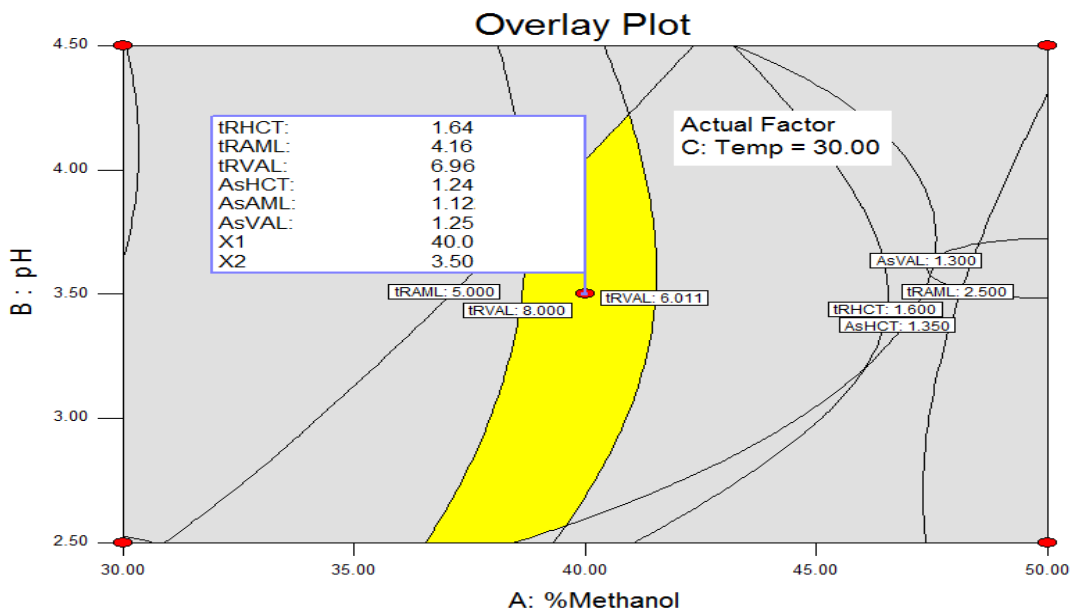


**Slika 83.** Uslovi prihvatljivi za ukupnu poželjnost i dobiveni optimalni uslovi (Rješenje 1).

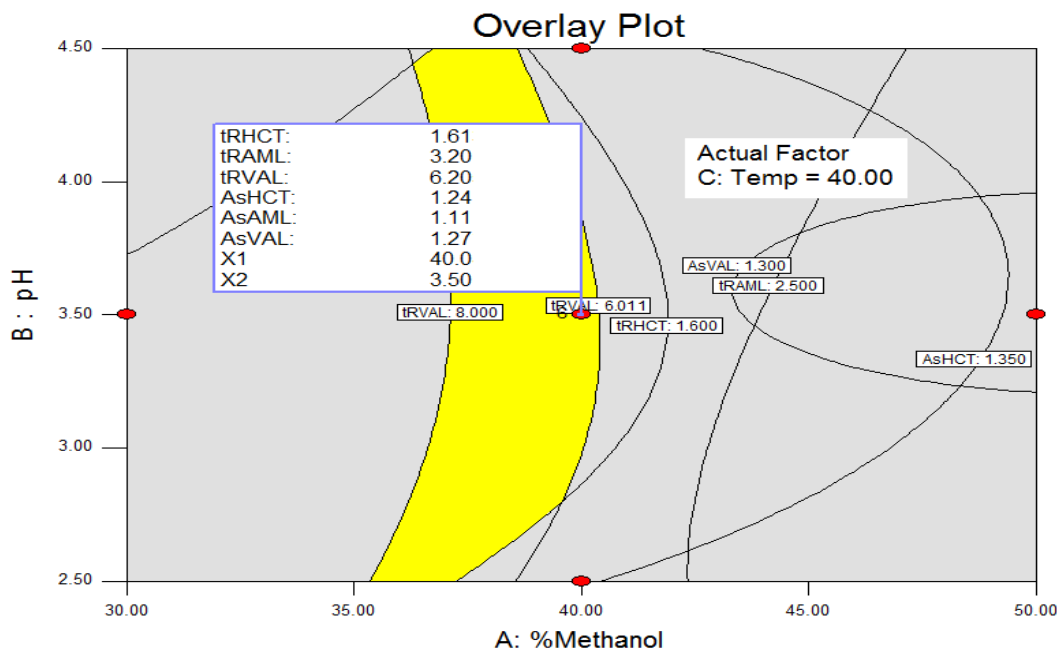


**Slika 84.** Uslovi prihvatljivi za ukupnu poželjnost i dobiveni optimalni uslovi (Rješenje 6).

Predložena rješenja su odabrana kao osnov za validaciju modela koja će služiti za analizu uzoraka.



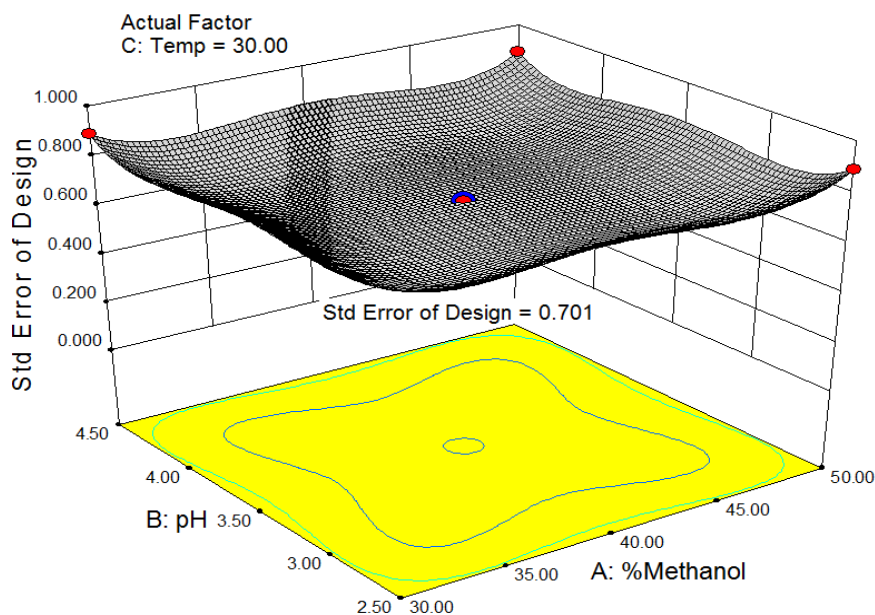
Slika 85. Plot obojen u žuto pokazuje rješenja dobivena optimizacijom;(temperatura 30 °C)



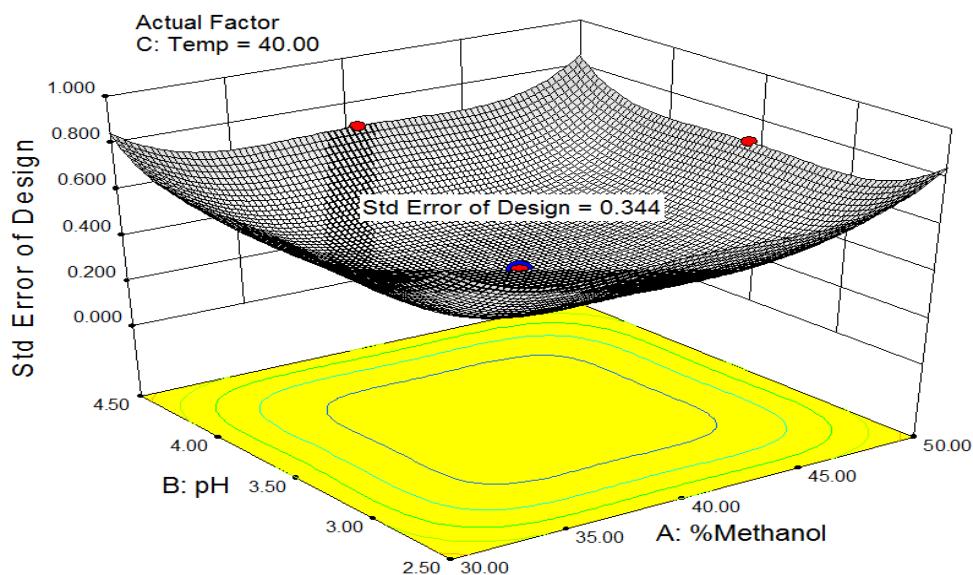
Slika 86. Plot obojen u žuto pokazuje rješenja dobivena optimizacijom;(temperatura 40 °C)

Slika 85 pokazuje plot pronađenih rješenja (obojen žuto), pri konstantnoj temperaturi 30 °C, dok se udio metanola u mobilnoj fazi i pH mobilne faze mogu varirati, u opsegu

područja obilježenog žutom bojom. Optimalno rešenje je prikazano u obliku obilježene crvene tačke, sa istaknutim vrijednostima ispitivanih odgovora. Slika 86 pokazuje plot pronađenih rješenja (obojen u žuto), pri konstantnoj temperaturi 40 °C. Optimalno rješenje se nalazi u opsegu područja obojenog žutom bojom, i prikazano je u obliku obilježene crvene tačke, sa istaknutim vrijednostima ispitivanih odgovora.



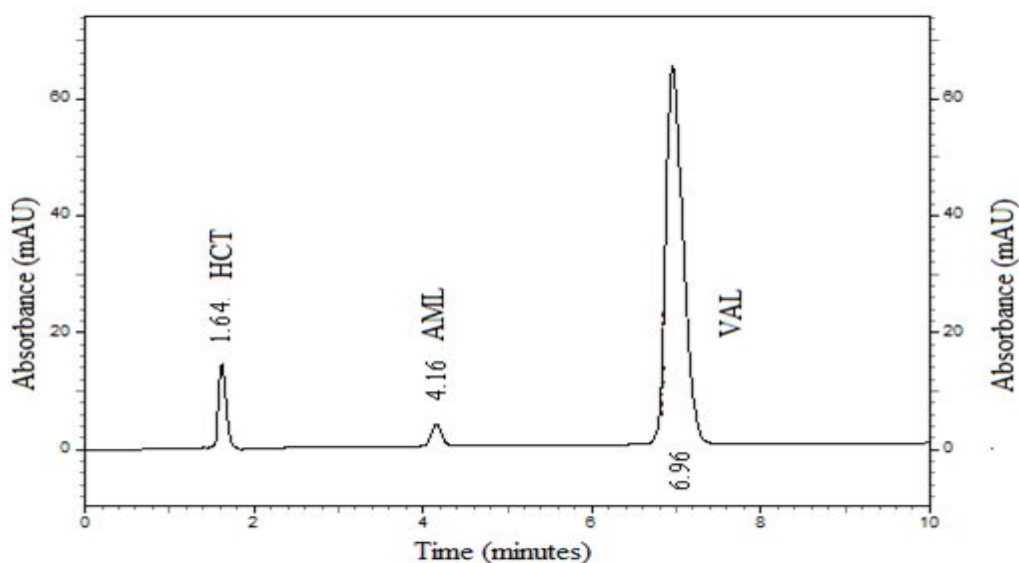
Slika 87. 3D prikaz odnosa standardne greške dizajna modela u funkciji % metanola u mobilnoj fazi i pH; (temperatura 30 °C)



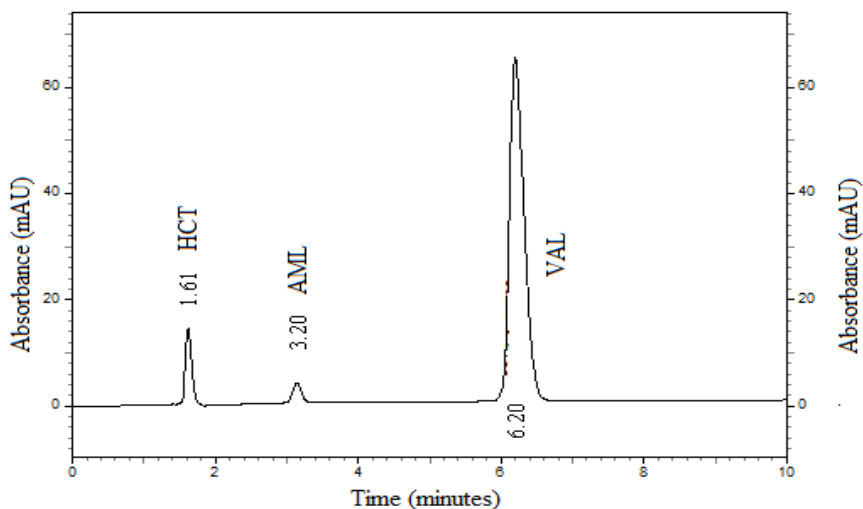
Slika 88. 3D prikaz odnosa standardne greške dizajna modela u funkciji % metanola u mobilnoj fazi i pH; (temperatura 40 °C).

Slika 87 i 88 prikazuju grafičku i brojčanu zavisnost standardnih grešaka dizajna, u odnosu na pH mobilne faze i sadržaj metanola. Poredeći brojčane vrijednosti standardne greške dizajna (0.344 i 0.701) može se zaključiti da je standardna greška modela manja kada se eksperimenti izvode na temperaturi od 40 °C. Hromatogram dobiven pod navedenim uslovima je prikazan na Slici 90.

Odabrano je rješenje za koje je uočeno najkraće retenciono vrijeme posljednjeg pika koji se eluira sa hromatografske kolone, valsartana, odnosno rješenje koje omogućava najkraće ukupno trajanje analize.



**Slika 89.** Hromatogram nakon optimizacije RP-HPLC metode (% metanola= 40, pH=3.5, T= 30 °C).



**Slika 90.** Hromatogram nakon optimizacije RP-HPLC metode (% metanola= 40, pH=3.5, T=40 °C).

#### 4.4.5. Validacija HPLC metode za određivanje hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana

Nakon podešavanja optimalnih uslova, analitička metoda je validirana. Interferentni pikovi nisu detektovani na retencionim vremenima hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana, što dokazuje dobru selektivnost metode. Linearna zavisnost površina ispod pikova i koncentracije određena je u predloženim opsezima. Parametri jednačine linearne regresije izračunati su i prikazani u Tabeli 47.

**Tabela 47.** Statistički parametri za individualne kalibracione krive

Parametar	HCT	AML	VAL
Konc.(mg/mL)	0.0125-0.125	0.005 - 0.05	0.08-0.8
Nagib	0.285	0.036	0.347
Odsječak	0.014	0.002	0.028
$R^2$	0.9926	0.9944	0.9977
<i>LOD</i>	0.0035	0.0019	0.0086
<i>LOQ</i>	0.0117	0.0066	0.0287

Statistička signifikantnost odsječka na y osi testirana je koristeći Student t-test. Limit detekcije (*LOD*) i limit kvantifikacije (*LOQ*) su izračunati na način da  $LOD = 3\sigma/S$  i  $LOQ = 10\sigma/S$ , gdje je  $\sigma$  standardna devijacija odgovora i  $S$  je prekid određen od odgovarajuće kalibracione krive.

**Tabela 48.** Preciznost RP-HPLC metode

Uzorak	Injektovano (mg/mL)	Pronađeno (mg/mL)	RSD (%)
Hidrohlorotiazid	0.025	0.0253	0.83
	0.05	0.0521	0.93
	0.075	0.0767	0.92
Amlodipin	0.01	0.0104	1.68
	0.02	0.0214	0.97
	0.03	0.0314	0.68
Valsartan	0.08	0.0821	0.86
	0.16	0.1641	0.91
	0.24	0.2452	0.96



Preciznost metode je dobivena analizom devet rastvora koji imaju poznate količine ispitivanih supstanci (Tabela 48). Niske vrijednosti relativne standardne devijacije za ponovljivost,  $RSD < 2.5\%$ , i visoka vrijednost  $R^2$  (Tabela 47) dokazuju veoma dobru preciznost predložene metode.

Primjenjivost ove metode je ispitana na komercijalno dostupnim tabletama koje sadrže kombinaciju hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Primijenjena je *3D-QSAR* studija u postavljanju matematičke zavisnosti koja definiše kvantitativni odnos hemijske strukture AT<sub>1</sub> blokatora i njihove aktivnosti. *3D-QSAR* analiza je izvedena sa setom od 49 AT<sub>1</sub> blokatora, od kojih je 32 služilo kao trening set, a 17 kao test set. PLS regresiona metoda je korištena za formiranje *3D-QSAR* modela. *3D-QSAR* studija blokatora AT<sub>1</sub> receptora je ukazala na tri značajna svojstva strukture za aktivnost: prisustvo karboksilatnog anjona (ili bioizostera) AT<sub>1</sub> blokatora (koji odgovora položaju karboksilata u strukturi angiotenzina II), imidazolni prsten (i njegovi bioizosteri) AT<sub>1</sub> blokatora (koji odgovora položaju imidazolu *His*<sup>6</sup> rezidue) i *n-butyl* grupa AT<sub>1</sub> blokatora (koja odgovora položaju ugljovodoničnog lanca *Ile*<sup>5</sup> rezidue).
2. Frakcioni faktorski dizajn (FFD) je upotrebljen za izbor najvažnijih varijabli sa ciljem da se kreira *3D-QSAR* model sa optimalnim statističkim parametrima koji najbolje opisuje ispitivane AT<sub>1</sub> blokatore. Na osnovu dobivenih vrijednosti statističkih parametara trening seta ( $RMSEE=0.239$ ;  $R^2=0.978$ ;  $Q^2=0.956$ ) i test seta ( $RMSEP=0.288$ ;  $R^2_{\text{Obs. vs. Pred.}}=0.918$ ; i  $Q^2_{\text{test}}=0.843$ ) izabran je optimalan trokomponentni *3D-QSAR* model za dalju studiju farmakofora i dizajn novih AT<sub>1</sub> blokatora. Test set se koristio za eksternu validaciju dobivenog *3D-QSAR* modela. Dobiveni statistički parametri su potvrdili dobru pouzdanost *3D-QSAR* modela za predviđanje aktivnosti AT<sub>1</sub> blokatora.
3. Analizom formiranog *3D-QSAR* modela izabrano je 10 najvažnijih varijabli koje utiču na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora. Varijable sa najsnažnijim pozitivnim uticajem na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora su: V732 (O-TIP), V739 (O-TIP), V763 (O-TIP), V37 (DRY-DRY), V597 (DRY-TIP), V300 (TIP-TIP) i V307 (TIP-TIP). Varijable sa najizraženijim negativnim uticajem na aktivnost AT<sub>1</sub> blokatora su: V868 (N1-TIP), V46 (DRY-DRY) i V224 (N1-N1).
4. Na osnovu formiranog *3D-QSAR* modela, definisane 3D-strukture farmakofore i struktura polaznih jedinjenja izvedeno je modeliranje i dizajniranje 30 AT<sub>1</sub> blokatora. *3D-QSAR* model je korišten za predviđanje *pKi* vrijednosti 30 dizajniranih jedinjenja. Na osnovu dobivenih rezultata izdvojeno je pet molekula ChEMBL (1513-7, 1513-15, 92950-7, 92950-8, 92950-9) kao potencijalno najsnažnijih blokatora AT<sub>1</sub>

receptora. Zaključeno je da aktivnost molekule raste ako je ciklopropil grupa vezana za ugljik pozicioniran između dva azota u imidazolnom prstenu (R1). Vezivanje alkilnog lanca sa karbonilnom grupom za isto mjesto pozitivno doprinosi aktivnosti molekule (ChEMBL 1513). Sa druge strane, ciklopropilna grupa kod ChEMBL 92950 na poziciji R2 smanjuje aktivnost molekule. Molekula sa najvećom aktivnosti ima dvije jednostavne alkilne grupe kao supstituente.

5. Prisutnost nekoliko funkcionalnih grupa u molekularnoj strukturi ispitivanih blokatora angiotenzinskih receptora, kao što su bifenilna i imidazol, čini RP-HPLC metodu pogodnom za određivanje njihovog sadržaja u farmaceutskim oblicima. Za razvoj i optimizaciju HPLC metode primijenjen je hemometrijski pristup i metodologija eksperimentalnog dizajna. U radu su korišteni puni faktorski dizajn i metoda površine odgovora. Faktorskim dizajnom određeni su faktori koji imaju najznačajniji efekat na posmatrane odgovore sistema dok je metodologija površine odgovora korištena da bi se pronašao opseg u kome se javljaju optimalni rezultati ispitivanja. Na temelju preliminarnih istraživanja odabrana su tri faktora, nezavisne varijable, čiji je uticaj ispitivan: sadržaj metanola u mobilnoj fazi-faktor, pH mobilne faze i temperatura kolone (kod analize irbesartana i hidrohlorotiazida i kod analize smjese valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida) dok su za dizajn eksperimenta analize losartana i hidrohlorotiazida odabrani udio metanola u mobilnoj fazi, pH mobilne faze i protok mobine faze. Ispitivani faktori su varirani na dva nivoa.
6. Kao zavisne varijable koje su praćene tokom eksperimenta izabrani su hromatografski parametri koji karakterišu dobru rezoluciju ispitivanih jedinjenja i koji određuju dužinu trajanja analitičkog postupka što je važno sa praktične tačke gledišta. Izabrane zavisne varijable su: faktor rezolucije binarnih smješa (irbesartana i hidrohlorotiazida; losartana i hidrohlorotiazida), simetrija pika i retencija irbesartana, losartana i hidrohlorotiazida. Kao zavisne varijable kod analize valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida praćeno je osam odgovora sistema: retenciono vrijeme hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana, simetrija pika hidrohlorotiazida, amlodipina i valsartana i rezolucija amlodipina i valsartan. Razvijeni modeli eksperimentalnog dizajna su analizirani primjenom ANOVA i Fischer testa.

7. Za optimizaciju HPLC metode razdvajanja irbesartana i hidrohlorotiazida, te losartana i hidrohlorotiazida korišten je puni faktorski dizajn, dok je za optimizaciju HPLC metode za razdvajanje valsartana, hidrohlorotiazida i amlodipina korišten centralni kompozitni dizajn. Za istovremenu optimizaciju više nezavisno promjenljivih veličina prema većem broju posmatranih odgovora korištena je Derringer-ova funkcija poželjnih odgovora koja transformiše različite karakteristike sistema u jedan jedinstveni cilj. Nakon definisanja ukupnog cilja poželjnosti u skladu sa postojećim eksperimentalnim uslovima, postignuti su optimalni hromatografski uslovi za razdvajanje supstanci. Zamjenom kodiranih vrijednosti dobivene su vrijednosti ispitivanih varijabli koje daju najvišu vrijednost globalne funkcije poželjnih odgovora. Optimalni uslovi analize smjese irbesartana i hidrohlorotiazida su: 47 % metanola, pH mobilne faze 6.5 i temperatura kolone 25 °C. Najbolji eksperimentalni uslovi hromatografskog određivanja losartana i hidrohlorotiazida su postignuti korištenjem mobilne faze pH 4.8 koja sadrži 45 % metanola, pri protoku od 0.82 mL/min i temperaturi kolone od 25 °C. Optimalni uslovi za izvođenje hromatografskog određivanja valsartana, amlodipina i hidrohlorotiazida postignuti su sa mobilnom fazom pH 3.5 koja sadrži 40 % metanola i pri temperaturi kolone od 40 °C. Za svaku od izvedenih metoda model optimizacije je pokazao dobru predvidljivost, jer vrijednosti predviđene modelom pri zadatim uslovima odgovaraju eksperimentalno dobivenim vrijednostima, bez statistički značajne razlike.
8. Predložene RP-HPLC metode su validirane čime je dokazano da su specifične, tačne, precizne i ponovljive. Izvođenje metoda ne zahtjeva složene postupke ekstrakcije, brze su i jednostavne za izvođenje i mogu biti korištene za rutinsku kvantitativnu analizu ispitivanih supstanci u mješavini ili za njihovo pojedinačno određivanje u farmaceutskim doziranim oblicima.
9. Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije mogu se sprovesti dalja istraživanja, usmjerena ka studijama odnosa strukture i farmakokinetičkih i farmakodinamičkih karakteristika jedinjenja koja su pokazala najveću aktivnost.

## 6. REFERENCE

1. Kearney P.M., Whelton M., Reynolds K., et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005, 365, 217–23.
2. Chobanian A.V., Bakris G.L., Black H.R., et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003, 42, 1206–52.
3. Vujić Z. Antihipertenzivni lekovi. Predavanja, 2014.
4. Mancia G., De Backer G., Dominiczak A., et al. Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart. J.* 2007, 28, 1462–536.
5. Whitworth J.A., World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens.* 2003, 21, 1983–92.
6. Mimran A., Ruilope L., Kerwin L., et al. A randomised, double-blind comparison of the angiotensin II receptor antagonist, irbesartan, with the full dose range of enalapril for the treatment of mild-to-moderate hypertension. *J Hum Hypertens.* 1998, 12, 203–8.
7. [https://sr.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotenzin\\_sistem](https://sr.wikipedia.org/wiki/Renin-angiotenzin_sistem)
8. Howard A. D. et al. Orphan G protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001, 22, 132–140.
9. Spiegel A. M. Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. *Annu. Rev. Physiol.* 1996, 58, 143–170.
10. Rana B. K., Shiina T., Insel, P. A. Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011, 41, 593–624.
11. Bailey W. J. et al. Patent status of therapeutically important G protein-coupled receptors. *Expert Opin. Ther. Patents* 2011, 11, 1861–1887.
12. Bockaert J., Pin J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999, 18, 1723–1729.

13. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 2000, 21, 90–113.
14. Heldin C. H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995, 80, 213–223.
15. George S.R., O'Dowd B.F., Lee S.P. G-protein coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002, 1, 808-820.
16. Whitebread S., Mele M., Kamber B., De Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989, 163, 284-291.
17. Chiu A.T., Herblin W.F., McDall D.E., Ardecky R.J., Carini D.J., Duncia J.V., Pease L.J., Wong P.C., Wexler R.R., Johnson A.L., Timmermans PBMWM. Identification of angiotensin receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989, 165, 196-203.
18. Bumpus F.M., Catt K.J., Chiu A.T., De Gasparo M. Goodfriend T, Husain A, Peach M.J., Taylor Jr D.G., Timmermans PBMWM. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of Nomenclature Committee of Conucil for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 1991, 17, 720-721.
19. Lin C., Stone R.A., Wax M.B. Angiotensin binding sites in rabbit anterior uvea and human ciliary epithelial cells. *Investigate ophthalmology and Visual Science* 1990, 31 (1).
20. De Wire S.M., Violin J.D. Biased Ligands for better cardiovascular drugs: Dissecting G-Protein-Coupled Receptor Pharmacology. *American Heart Association* 2011, 109, 205-216.
21. De Gasparo M., Catt K.J., Ingami T., Wright J.W., Unger T.H. The Angiotensin II receptors. *International Union of Pharmacology XXIII. Pharmacolog Reviews* 2000, 52, 415-472.
22. Peach M.J. Renin-angiotensin system. *Biochemistry and mechanism of action. Physiological Reviews* 1977, 57 (2), 313-370.



23. Reudelhuber T.L. The Continuing Saga of the AT<sub>2</sub> Receptor A Case of the Good, the Bad, and the Innocuous. *Hypertension* 2005, 46, 1261-1262.
24. Smith D.H.G., Comparison of Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists in the Treatment of Essential Hypertension. *Drugs* 2008, 68 (9), 1207-1225.
25. Lewis E.J. Renoprotective effect of the Angiotensin-receptor antagonist Irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2001, 345 (12), 861-869.
26. The Gale Encyclopedia of Medicine, 3rd ed., Gale Group, 2006, 315-316.
27. Lullmann H. et al. Color atlas of pharmacology, 2nd ed., Thieme, 2000, 125.
28. Ritter M. J. et al. A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 5th ed., Hodden Ed., 2008, 188-189.
29. Laffer L., Elijovich F., A critical appraisal of the clinical effectiveness of a fixed combination of valsartan, amlodipine, and hydrochlorothiazide in achieving blood pressure goals. *Integr Blood Press Control* 2011, 4, 1.
30. Lacourcière Y., Crikelair N., Glazer R.D., Yen J., Calhoun D.A.J. 24-Hour ambulatory blood pressure control with triple-therapy amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide in patients with moderate to severe hypertension. *J Hum Hypertens* 2011, 25, 615.
31. Lemke T., Williams D., Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th ed., Lippincott, 2008, 752-755.
32. Burnier M., Brunner H.R. Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet* 2000, 355: 637–645.
33. Weber M. Angiotensin II Receptor Blockers. *Hypertension Medicine*, Humana Press 2000, 342-346
34. Bennet L., Clinical Pharmacology, 9th ed., Livingstone, 2003: 485
35. Dvorak M.M., et al. Thiazide Diuretics Directly Induce Osteoblast Differentiation and Mineralized Nodule Formation by Interacting with a Sodium Chloride Co-Transporter in Bone. *J Am Soc Nephrol* 2007, 18, 2509–2516.

36. Lemke T., Williams D. Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th ed., Lippincott, 2008: 722-730.
37. Bodzioch K., Durand A., Kaliszan R., Bączek T., Vander Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta* 2010, 81, 1711-1718.
38. Kunal R.K., Roy P.P. Comparative chemometric modeling of cytochrome 3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds using stepwise MLR, FA-MLR, PLS, GFA, G/PLS and ANN techniques. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 2913-2922.
39. Aschi M., D'Archivio A.A., Maggi M.A., Mazzeo P., Ruggieri F. Quantitative structure retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 2007, 582, 235–242.
40. Put R., Perrin C., Questier F., Coomans D., Massart D.L., Vander Heyden Y. Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure–retention relationship studies. *J. Chromatogr. A* 2003, 988, 261–276.
41. Pentacle, Version 1.0.6., Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italy 2009. [http://www.moldiscovery.com/soft\\_pentacle.php](http://www.moldiscovery.com/soft_pentacle.php)
42. Pastor M., Cruciani G., McLay I., Pickett S., Clementi S. Grid-Independent descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *J Med Chem* 2000, 43, 3223-3243
43. Wold S., Sjöström M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* 2001, 58, 109-130.
44. Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikstrom C., Wold S.(Eds.). *Multi- and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I*, 2nd ed., Umetrics Academy, Umeå 2001, 39-103.
45. Golbraikh A., Tropsha A. Beware of q<sup>2</sup>! *J.Mol. Graph. Model.* 2002, 20, 269-276.
46. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inf.* 2010, 29, 476-488.
47. Šober M., Nikolin B., *Analitika lijekova*. Sarajevo Publishing, 2003, 228-237.

- 
48. Dodge Y. *The Concise Encyclopedia of Statistics*. Springer, 2008, 10-13
  49. Foster J. et al. *Understanding and using Advanced Statistics*. Sage, 2006, 70-89
  50. Ryan T. *Modern Engineering Statistics*, Wiley, 2007, 397-400
  51. Montgomery D. *Applied Statistics and Probability for Engineers*, 3rd ed., Wiley, 2003, 505-549.
  52. Onjia A., Vasiljević T., Čokeša Đ., Laušević M., Validacija hromatografske analize. *Hem. Ind.* 2002, 56 (2), 76-79.
  53. Garcia–Alvarez–Coque M. C., Torres–Lapasio J. R., Baeza–Baeza J. J. Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed–phase liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 2006, 579, 125–145.
  54. Cela R., Ordonez E. Y., Quintana J. B., Rodil R. Chemometric–assisted method development in reversed–phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013, 1287, 2–22.
  55. Brereton R.G. *Chemometrics - data analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 2003.
  56. Ferreira S.L.C., Bruns R.E., da Silva E.G.P., dos Santos W.N.L., Quintella C.M., David J.M., de Andrade J.B., Breitkreitz M.C., Jardim I.C.S.F., Neto B.B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A*. 2007, 1158, 2–14.
  57. Mutihac L., Mutihac R. Mining in chemometrics. *Anal Chim Acta* 2008, 612, 1–18.
  58. Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nystrom A., Pettersen J., Bergman R. Experimental design and optimization. *Chemom Intell Lab Syst* 1998, 42, 3–40.
  59. Nowak M., Seubert A. Application of experimental design for the characterisation of a novel elution system for high-capacity anion chromatography with suppressed conductivity detection. *J Chromatogr A* 1999, 855, 91–109.

60. Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escaleira L.A. Responsesurface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 2008, 76, 965–977.
61. Armstrong N.A. *Pharmaceutical experimental design and interpretation*, 2nd Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006.
62. Singh G., Pai R.S., Devi V.K. Optimization of pellets containing solid dispersion prepared by extrusion/spheronization using central composite design and desirability function. *J Young Pharm.* 2012, 4, 46.
63. Gotti R., Furlanetto S., Andrisano V., Cavrini V., Pinzauti S. Design of experiments for capillary electrophoretic enantioresolution of salbutamol using dermatan sulfate. *J Chromatogr.* 2000, 875, 411.
64. Singh G., Pai R.S., Devi V.K. Response surface methodology and process optimization of sustained release pellets using Taguchi orthogonal array design and central composite design. *J Adv Pharm Technol Res.* 2012, 3, 30.
65. Jovanović M. *Teorijska i hemometrijska analiza retencionih mehanizama odabranih lekova u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija*, doktorska disertacija, Beograd, 2015.
66. Zecevic M., Jovic B., Zivanovic Lj., Protic A. Application of Multicriteria Methodology in the Development of Improved RP-LC-DAD for Determination of Rizatriptan and Its Degradation Products. *Chromatographia* 2008, 68, 911–918.
67. Candiotti L.V., Robles J.C., Mantovani V.E., Goicoechea H.C. Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis. *Talanta* 2006, 69, 140–147.
68. Safa F., Hadjmohammadi M.R. Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin aminoacids using Derringer's desirability function. *J Chromatogr A* 2005, 1078, 42–50.
69. Ortiz M.C., Herrero A., Sanllorente S., Reguera C. Methodology of multicriteria optimization in chemical analysis: some applications in stripping voltammetry. *Talanta* 2005, 65, 246–254.

70. Zivanovic Lj., Protic A., Zecevic M., Jovic B., Kostic M. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2009, 50, 640–648.
71. Candiotti L.V., Olivieri A.C., Goicoechea H.C. Simultaneous multiresponse optimization applied to epinastine determination in human serum by using capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta.* 2007, 595, 310–318.
72. Berellini G., Cruciani G., Mannhold R. Pharmacophore, Drug metabolism, and Pharmacokinetics Models on Non-Peptide AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, and AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> Angiotensin II receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005, 48, 4389-4399.
73. Clement M., Martin S.S., Beaulieu M.E., Chamberland C., Lavigne P., Leduc R., Guillemette G., Escher E. Determining the Environment of the Ligand Binding Pocket of the Human Angiotensin II Type (hAT<sub>1</sub>) Receptor Using the methionine Proximity Assay. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280 (29), 27121-27129.
74. Ji H., Leung M., Zhang J., Catt K.J., Sandberg K. Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT<sub>1</sub> angiotensin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1994, 269 (24), 16533-16536.
75. Bosnyak S., Jones E.S., Christophulos A., Aguilar M.I., Thomas W.S., Widdop R.E. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Clinical Science* 2011, 121, 297-303.
76. Aplin M., Bonde M.M., Hansen J.L. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor function selectivity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009, 46, 15-24.
77. Sharma M.C. A structure-activity relationship study of imidazole-5-carboxylic acids derivatives as angiotensin II receptor antagonists combining 2D and 3D-QSAR methods. *Interdisciplinary sciences: computational life sciences* 2014, 1913-2751.

78. Vyas V.K., Gupta N., Ghate M., Patel S. Design, synthesis, pharmacological evaluation and in silico ADMET prediction of novel substituted benzimidazole derivatives as angiotensin II-AT1 receptor antagonists based on predictive 3D-QSAR models. *SAR and QSAR in Environmental Research* 2014, 25(2), 117-46.
79. Sharma MC. Molecular modelling studies for the discovery of new substituted pyridines derivatives with angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Interdisciplinary sciences: life computational sciences* 2014, 6(3), 197-207.
80. Miura S., Saku K. Do all angiotensin II type 1 receptor blockers have the same beneficial effects? *British Journal of Pharmacology* 2007, 151(7), 912–913.
81. Le M.T., Liefde I.V., Pugsley M.K., Vauquelin G. Molecular characterization of the interactions between olmesartan and telmisartan and the human angiotensin II AT1 receptor *British Journal of Pharmacology* 2007, 151 (7), 952–962.
82. Arakawa K. Significance of suppressing angiotensin by ARB. *Prog Med* 2004, 24, 1757–1762.
83. Smith D.H., Dubiel R., Jones M. Use of 24-hour ambulatory blood pressure monitoring to assess antihypertensive efficacy: a comparison of olmesartan medoxomil, losartan potassium, valsartan, and irbesartan. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 2005, 5, 41–50.
84. Bhuiyan M.A., Ishiguro M., Hossain M., Nakamura T., Ozaki M., Miura S., Nagatomo T. Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. *Life sciences* 2009, 85(3-4), 136-40.
85. Rosangluaia, Shanmugasundaram P., Malarkodi V. Validated HPTLC method for simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorthiazide in a tablet dosage form. *Der Pharm. Chem.* 2011, 3, 310–317.
86. Shah N.J., Suhagia B.N., Shah R.R., Patel N.M. Development and validation of a HPTLC method for the simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorotiazide in tablet dosage form. *Indian J. Pharm. Sci.* 2007, 69, 240–243.

87. Amol S.K., Laxman V.P., Mrinalini C.D., Kailash G.B. A validated stability indicating HPTLC method for simultaneous estimation of irbesartan and hydrochlorotiazide. *Pharm. Methods* 2010,1, 39–43.
88. Mehta B.H., Morge S.B. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorotiazide by HPTLC method. *Indian Drugs* 2010, 47, 71–74.
89. Patel K.R., Patel S.A., Darji V.C., Sonpal R.N. Simultaneous spectrophotometric determination of irbesartan and hydrochlorotiazide in tablets. *Int. Res. J. Pharm.* 2011, 2, 202–207.
90. Farouk M., Abd ELAziz O., Hemdan A., Shehata M. Spectrofluorimetric methods for determination of some anti-hypertensive drugs. *J. Am. Sci.* 2011, 7, 300–312.
91. Ramzia I.E.-B., Hanaa M.H., Waleed A.E. Spectrofluorometric, spectrophotometric and LC determination of irbesartan. *J. Chem. Pharm. Res.* 2011, 3, 722–733.
92. Burçin B., Burcu D.T., Bengi U., Sibel A.Ö., Hassan Y.A.-E. Quantitative analysis of irbesartan in pharmaceuticals and human biological fluids by voltammetry. *Anal. Lett.* 2009, 42, 2322–2338.
93. Hillaert S., van den Bossche W. Simultaneous determination of hydrochlorotiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 31, 329–339.
94. Farouk M., Abd ELAziz O., Hemdan A., Shehata M. Novel validated chromatographic method for determination of some anti-hypertensive drugs. *J. Am. Sci.* 2010, 6, 476–486.
95. Gonzalez L., Lopez J.A., Alonso R.M., Jimenez R.M. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* 2002, 949, 49–60.
96. Ganesan M., Nanjundan S., Gomathi M., Muralidharan S. Method development and validation of Irbesartan using LCMS/MS: Application to pharmacokinetic studies. *J. Chem. Pharm. Res.* 2010, 2, 740–746.

97. Tutunji L.F., Tutunji M.F., Alzoubi M.I., Khabbas M.H., Arida A.I. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorotiazide in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectroscopy, application to bioequivalence study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 51, 985–990.
98. Hillaert S., Van den Bossche W. Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the analysis of several angiotensin-II-receptor antagonists. *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 323–333.
99. Hillaert S., de Beer T.R.M., de Beer J.O., van den Bossche W. Optimization and validation of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of several angiotensin-II-receptor antagonists. *J. Chromatogr. A.* 2003, 984, 135–146.
100. Ferreirós N., Iriarte G., Alonso R.M., Jiménez R.M. MultiSimplex and experimental design as chemometric tools to optimize a SPE-HPLC-UV method for the determination of eprosartan in human plasma samples. *Talanta* 2006, 69, 747–756.
101. Torrealdaya N., González L., Alonso R.M., Jiménez R.M., Ortiz Lastra E. Experimental design approach for the optimisation of a HPLC-fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 847–857.
102. Gotardo M.A., Pezza L., Pezza H.R. Determination of hydrochlorotiazide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. *Elect. Quim.* 2005, 30, 17–24.
103. Silva Sangoi M., Wrasse-Sangoi M., Renato de Oliveira P., Todeschini Clarice V., Bueno Rolim M. Rapid simultaneous determination of aliskiren and hydrochlorotiazide from their pharmaceutical formulations by monolithic silica HPLC column employing experimental design. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2011, 34, 1976–1996.
104. Demiralaya E.C., Cubuka B., Ozkan S.A., Alsancak G. Combined effect of polarity and pH on the chromatographic behavior of some angiotensin II receptor



- antagonists and optimization of their determination in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53, 475–482.
105. Jocić B., Zecević M., Zivanović L.J., Protić A., Jadranin M., Vajs V. Study of forced degradation behavior of eletriptan hydrobromide by LC and LC-MS and development of stability-indicating method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 46, 622–629.
106. Erk N. Comparison of spectrophotometric and an LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2001, 26: 43-52.
107. Ahmed S.S., Karajgi S.R., Simpi C.C., Sonawane S., Kalyane N.V. Visible spectrophotometric methods for the estimation of losartan potassium and omeprazole in single component pharmaceutical formulations, *International Journal Of Pharmtech Research* 2009, 11247-1250.
108. Lande N.R., Shektar B.M., Kadam S.S., Dhaneshwar S.R. Simultaneous spectrophotometric estimation of Losartan potassium and Hydrochlorotiazide in tablet dosage form. *Indian drugs* 2000, 37, 577-81.
109. Lastra O.C., Lemus I.G., Sanchez H.J., Perez R.F. Development and validation of an UV derivative spectrophotometric determination of Losartan potassium in tablets. *J Pharm Biomed Anal* 2003, 33, 175-80.
110. Ensafi A.A., Hajian R. Determination of Losartan and Triamterene in Pharmaceutical Compounds and Urine Using Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetry, *Anal Sci* 2008, 24 (11), 1449-54.
111. Williams R.C., Alasandro M.S., Fasone V.L., Boucher R.J., Edwards J.F. Comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis and super-critical fluid chromatography in the determination of Losartan Potassium drug substance in Cozaar® tablets. *J Pharma Biomed Anal.* 1996, 14 (11), 1539-1546.
112. Ulu S.T., Saglik S. Comparison of UV and Second derivative spectrophotometric and HPLC methods for the determination of Losartan in tablets. *Turk J Pharm Sci* 2004, 1, 165-75.

113. Sivakumar T., Venkatesan P., Manavalan R., Valliappan K. Development of a HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium and Atenolol in tablets, *Indian J Pharm Sci* 2007, 69, 154-57.
114. McCarthy K.E., Qingxi W., Tsai E.W., Gilbert R.E., Brooks M.A. Determination of losartan and its degradates in COZAAR® tablets by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 1998, 17, 671–677.
115. Lu C.Y., Chang Y.M., Tseng W.L., Feng C.H., Lu C.Y. Analysis of Angiotensin II Receptor Antagonist and Protein Markers at Microliter Level Plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2009, 49(1), 123-8.
116. Polinko M., Riffel K., Song H., Lo M. Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharma and Biomed Anal* 2003, 33, 73- 84.
117. Suhagia B.N., Shah R.R., Patel D.M. Development of RP-HPLC method for evaluating losartan potassium and hydrochlorotiazide tablets. *Indian J Pharma Sci.* 2005, 67, 37–42.
118. Quaglia M.G., Donati E., Carlucci G., Mazzeo P., Fanali S. Determination of losartan and hydrochlorotiazide in tablets by CE and CEC. *J Pharm Biomed Anal.* 2002, 29 (6), 981-7.
119. Deanne L.H., Jennifer F. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorotiazide, and their degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 2002, 30, 747-760.
120. Naidu K.R., Kale U.N., Shingare M.S. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product. *J Pharm Biomed Anal.* 2005, 39, 147.
121. Patel D.B., Mehta F.A., Bhat K.K. Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate and Indapamide in a Pharmaceutical Formulation by a High Performance Liquid Chromatographic (RP-HPLC) Method. *Sci Pharm.* 2012, 80, 581.

122. Darwish H.W., Backeit A.H. Multivariate versus classical univariate calibration methods for spectrofluorimetric data: application to simultaneous determination of olmesartan medoxamil and amlodipine besylate in their combined dosage form. *J Fluoresc.* 2013, 23 (1): 79-91.
123. Habib I.H., Weshahy S.A., Toubar S.S., el-Amim M.M. Stripping voltammetric determination of valsartan in bulk and pharmaceutical products. *Pharmazie.* 2008, 63, 337.
124. Piao Z.Z., Lee E.S., Tran H.T., Lee B.J. Improved analytical validation and pharmacokinetics of valsartan using HPLC with UV detection. *Arch. Pharm Res.* 2008, 31, 1055.
125. Kokil S.U., Bhatia M.S. Simultaneous Estimation of Nebivolol Hydrochloride and Valsartan using RP HPLC. *Indian J Pharm Sci.* 2009, 71, 111.
126. Czerwinska K., Mazurek A.P. Identification and determination of selected angiotensin II receptor antagonist group drugs by HPLC method. *Acta Pol Pharm.* 2011, 68, 831.
127. Li Z., Chen F., Wang X. Ionic liquids dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of irbesartan and valsartan in human urine. *C Biomed Chromatogr.* 2013, 27, 254.
128. N.G. Mohamed. Simultaneous determination of amlodipine and valsartan. *Anal Chem Insights.* 2011, 6, 53.
129. Alnajjar A.O. Validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of amlodipine besylate and valsartan in pharmaceuticals and human plasma. *J AOAC Int.* 2011, 94, 498.
130. Wankhede S.B., Raka K.C., Wadkar S.B., Citlange S.S. Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of amlodipine besilate, losartan potassium and hydrochlorotiazide in tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2010, 72, 136.
131. Santhana Lakshmi K., S. Lakshmi. Simultaneous Analysis of Losartan Potassium, Amlodipine Besylate, and Hydrochlorotiazide in Bulk and in Tablets by High-Performance Thin Layer Chromatography with UV-Absorption Densitometry. *J Anal Methods Chem.* 2012, 2012, 108281.

132. Galande V.R., Baheti K.G., Indraksha S., Dehghan M.H. Estimation of Amlodipine Besylate, Valsartan and Hydrochlorotiazide in Bulk Mixture and Tablet by UV Spectrophotometry. *Indian J Pharm Sci.* 2012, 74, 18.
133. Sharma R.N., Pancholi S.S. Simple RP-HPLC method for determination of triple drug combination of valsartan, amlodipine and hydrochlorotiazide in human plasma *Acta Pharm.* 2012, 62, 45.
134. Asakawa N., Kobayashi S., Goto J., Hirayama N. An Automated *3D-QSAR* Method Based on Pharmacophore Alignment and Grid Potential Analysis. *International Journal of Medicinal Chemistry.* 2012, 2012, 498931, 9.
135. The European Bioinformatics Institute. EMBL-EBI, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK. <https://www.ebi.ac.uk/>
136. Kiyama R., Honma T., Hayashi K., Ogawa M., Hara M., Fujimoto M., Fujishita T. Novel angiotensin II receptor antagonists. Design, synthesis, and in vitro evaluation of dibenzo[a,d]cycloheptene and dibenzo[b,f]oxepin derivatives. Searching for bioisosteres of biphenyltetrazole using a three-dimensional search technique. *Journal of Medicinal Chemistry* 1995, 38, 2728-2741.
137. Wexler R.R., Greenlee W.J., Irvin J.D., Goldberg M.R., Prendergast K., Smith R.D., Timmermans P.B. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: the next generation in antihypertensive therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* 1996, 39, 625-656.
138. Le Bourdonnec B., Meulon E., Yous S., Goossens J.F., Houssin R., Henichart J.P. Synthesis and pharmacological evaluation of new pyrazolidine-3, 5-diones as AT(1) angiotensin II receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000, 43, 2685-2697.
139. Le Bourdonnec B., Cauvin C., Meulon E., Yous S., Goossens J.F., Durant F., Houssin R., Henichart J.P. Comparison of 3D structures and AT(1) binding properties of pyrazolidine-3,5-diones and tetrahydropyridazine-3,6-diones with parent antihypertensive drug irbesartan. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002, 45, 4794-4798.

140. Murugesan N., Tellew J.E., Gu Z., Kunst B.L., Fadnis L., Cornelius L.A., Baska R.A., Yang Y., Beyer S.M., Monshizadegan H., Dickinson K.E., Panchal B., Valentine M.T., Chong S., Morrison R.A., Carlson K.E., Powell J.R., Moreland S., Barrish J.C., Kowala M.C., Macor J.E. Discovery of N-isoxazolyl biphenylsulfonamides as potent dual angiotensin II and endothelin A receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002, 45, 3829-3835.
141. Liu H., Altenbach R.J., Carr T.L., Chandran P., Hsieh G.C., Lewis L.G., Manelli A.M., Milicic I., Marsh K.C., Miller T.R., Strakhova M.I., Vortherms T.A., Wakefield B.D., Wetter J.M., Witte D.G., Honore P., Esbenshade T.A., Brioni J.D., Cowart M.D. cis-4-(Piperazin-1-yl)-5,6,7a,8,9,10,11,11a- octahydro benzofuro[2,3-h] quinazolin-2-amine (A-987306), a new histamine H4R antagonist that blocks pain responses against carrageenan-induced hyperalgesia. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008, 51, 7094-7098.
142. Morphy R., Rankovic Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005, 48, 6523-6543.
143. Li H., Anderes K.L., Kraynov E.A., Luthin D.R., Do Q.Q., Hong Y., Tompkins E., Sun E.T., Rajapakse R., Pathak V.P., Christie L.C., Feng J., Vazir H., Castillo R., Gregory M.L., Castro M., Nared-Hood K., Paderes G., Anderson M.B. Discovery of a novel, orally active, small molecule gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006, 49, 3362-3367.
144. Lukaszuk A., Demaegdt H., Feytens D., Vanderheyden P., Vauquelin G., Tourwe D. The replacement of His(4) in angiotensin IV by conformationally constrained residues provides highly potent and selective analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009, 52, 5612-5618.
145. Fillion D., Lemieux G., Basambombo L.L., Lavigne P., Guillemette G., Leduc R., Escher E. The amino-terminus of angiotensin II contacts several ectodomains of the angiotensin II receptor AT1. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010, 53, 2063-2075.
146. Mahalingam A.K., Wan Y., Murugaiah A.M., Wallinder C., Wu X., Plouffe B., Botros M., Nyberg F., Hallberg A., Gallo-Payet N., Alterman M. Selective

- angiotensin II AT(2) receptor agonists with reduced CYP 450 inhibition. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2010, 18, 4570-4590.
147. Naik P., Murumkar P., Giridhar R., Yadav MR. Angiotensin II receptor type 1 (AT1) selective nonpeptidic antagonists--a perspective. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2010, 18, 8418-8456.
148. Casimiro-Garcia A., Filzen G.F., Flynn D., Bigge C.F., Chen J., Davis J.A., Dudley D.A., Edmunds J.J., Esmail N., Geyer A., Heemstra R.J., Jalaie M., Ohren J.F., Ostroski R., Ellis T., Schaum R.P., Stoner C. Discovery of a series of imidazo[4,5-b]pyridines with dual activity at angiotensin II type 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011, 54, 4219-4233.
149. Bai R., Wei Z., Liu J., Xie W., Yao H., Wu X., Jiang J., Wang Q., Xu J. Synthesis and biological evaluation of 4'-[(benzimidazole-1-yl)methyl]biphenyl-2-sulfonamide derivatives as dual angiotensin II/endothelin A receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2012, 20, 4661-4667.
150. Pease J., Horuk R. Chemokine receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012, 55, 9363-9392.
151. Cappelli A., Manini M., Valenti S., Castriconi F., Giuliani G., Anzini M., Brogi S., Butini S., Gemma S., Campiani G., Giorgi G., Mennuni L., Lanza M., Giordani A., Caselli G., Letari O., Makovec F. Synthesis and structure-activity relationship studies in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists based on fused pyrrolidone scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 63, 85-94.
152. Brudeli B., Andressen K.W., Moltzau L.R., Nilsen N.O., Levy F.O., Klaveness J. Acidic biphenyl derivatives: synthesis and biological activity of a new series of potent 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2013, 21, 7134-7145.
153. Veron J.B., Joshi A., Wallinder C., Larhed M., Odell L.R. Synthesis and evaluation of isoleucine derived angiotensin II AT(2) receptor ligands. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2014, 24, 476-479

- 
154. ChemAxon MarvinSketch 5.5.1.0 program, Budapest, Hungary 2011, [www.chemaxon.com/products.html](http://www.chemaxon.com/products.html)
  155. Froese Fischer C.F. The Hartree-Fock Method for Atoms: A Numerical Approach. John Wiley and Sons, New York, 1977.
  156. Gaussian 98 (Revision A.7), Frisch MJ et al, Gaussian, Inc. 1998, Pittsburgh PA.
  157. Filipic S., Nikolic K., Vovk I., Krizman M., Agbaba D. Quantitative structure-mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in CDs-mediated CE. *Electrophoresis* 2013, 34, 471–82.
  158. Nikolic K., Ivković B., Bešović Ž., Marković S., Agbaba D. A validated enantiospecific method for determination and purity assay of clopidogrel. *Chirality* 2009, 21, 878-885.
  159. Remko M., Swart M., Bickelhaupt M. Theoretical Study of Structure, pKa, Lipophilicity, Solubility, Absorption and Polar Surface Area of some Centrally Acting Antihypertensives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2006, 14, 1715-28.
  160. Nikolic K., Filipic S., Agbaba D. QSAR study of imidazoline antihypertensive drugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2008, 16, 7134–40.
  161. Nikolic K, Filipic S, Agbaba D. QSAR study of selective I1-imidazoline receptor ligands. *SAR and QSAR in Environmental Research* 2008, 20, 133–44.
  162. Pentacle, Version 1.0.6., Molecular Discovery Ltd, Perugia, Italy 2009. [http://www.moldiscovery.com/soft\\_pentacle.php](http://www.moldiscovery.com/soft_pentacle.php)
  163. Filipić S. Kvantitativni odnosi strukture, aktivnosti i retencionih osobina liganada imidazolinskih i alfa<sub>2</sub> adrenergičkih receptora, doktorska disertacija, Beograd, 2013.
  164. Allen D.M. The relationship between variable selection and data augmentation and a method for prediction. *Technometrics* 1974,16: 125-27.
  165. Wold S., Johansson E., Cocchi M.. *3D-QSAR* in drug design, theory, methods, and applications. H. Kubinyi Ed., ESCOM Science Publishers 1993. Leiden 523–50.

166. Zhang H., Unal H., Gati C., Han G.W., Liu W., Zatsopin N.A., James D., Wang D., Nelson G., Weierstall U., Sawaya M.R., Xu Q., Messerschmidt M., Williams G.J., Boutet S., Yefanov O.M., White T.A., Wang C., Ishchenko A., Tirupula K.C., Desnoyer R., Coe J., Conrad C.E., Fromme P., Stevens R.C., Katritch V., Karnik S.S., Cherezov V., Structure of the Angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography, *Cell*. 2015 May 7, 161(4), 833-44. Epub 2015.
167. Vujić Z., Mulavić N., Smajić M., Brborić J., Stanković P. Simultaneous Analysis of Irbesartan and Hydrochlorotiazide: An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocol. *Molecules* 2012, 17, 3461–3474
168. ICH, Q2B. (1993) Validation of analytical procedures methodology, In Proceedings of The International Conference on Harmonization, Geneva.



## 7. PRILOZI

---

**PRILOG 1: Spisak publikovanih radova i saopštenja****Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima:**

1. **Miralem Smajić**, Katarina Nikolić, Zorica Vujić, Lejla Ahmetović and Vesna Kuntić, *3D-QSAR studies and pharmacophore identification of AT1 receptor antagonists*, Medicinal Chemistry Research (2016) 25 (1), 51-61 **M22**
2. **Miralem Smajić**, Zorica Vujić, Nedžad Mulavdić, Jasmina Brborić; *An Improved HPLC Method for Simultaneous Analysis of Losartan Potassium and Hydrochlorotiazide with the Aid of a Chemometric Protocol*, Chromatographia, April 2013, Volume 76, Issue 7, pp 419-425 **M23**
3. Zorica Vujić, Nedžad Mulavdić, **Miralem Smajić**, Jasmina Brborić, Predrag Stanković; *Simultaneous Analysis of Irbesartan and Hydrochlorotiazide: An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocol*; Molecules 2012, 17(3)**M22**

**Radovi u časopisima koji nisu na SCI listi:**

1. Zorica Vujić, **Miralem Smajić**, Nedžad Mulavdić; *Uticaj akarboze na oksidativni stres i postprandijalne pojave kod osoba sa dijabetes mellitusom*; Vaša Apoteka 16 ISSN 1840-4537; septembar 2011.

**Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u celini:**

1. **Miralem Smajić**, Nedžad Mulavdić, Zorica Vujić; *Primjena faktorskog dizajna u optimizaciji izokratske HPLC metode za određivanje irbesartana i hidrohlorotiazida*; Drugi kongres farmaceuta BiH sa međunarodnim učešćem, Novembar 17-20, 2011, Banja Luka, BIH.
2. **M. Smajić**, K. Nikolić, Z. Vujić, *Determination of Pharmacophore and 3D-QSAR Studies of AT1 Receptor Antagonists*; VI Sebian Congress of Pharmacy; october 2014.

**Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u cjelini:**

1. **Miralem Smajić**, Nedžad Mulavdić, Lejla Ahmetović; Samomedikacija i složenost samomedikacije; IX simpozij magistara farmacije FBiH; Sarajevo, Juni 2012 godine.
2. Lejla Ahmetović, Nedžad Mulavdić, **Miralem Smajić**; Savjetovanja u apoteci o nuspojavama i reakcijama preosjetljivosti na lijekove; IX simpozij magistara farmacije FBiH; Sarajevo, Juni 2012 godine.
3. Aida Smajić, Eldina Rizvić, **Miralem Smajić**, Dario Mlinarić; Uloga farmaceuta u samomedikaciji hiperholestrinemije i hipertrigliceridemije; IX simpozij magistara farmacije FBiH; Sarajevo, Juni 2012 godine.
4. Sabina Mujkić, **Miralem Smajić**, Dario Mlinarić; Interakcije statina i oralnih antidijabetika; VII simpozij magistara farmacije FBiH, Zenica, Decembar 2010.

## 8. BIOGRAFIJA

Miralem Smajić je rođen 30.12.1985. godine u Tuzli, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu je završio u Bašigovcima, Živinice, Bosna i Hercegovina. Tokom osnovnog školovanja ostvario je prosječnu ocjenu 5.0. Za vrijeme osnovnog školovanja postigao je zapažene rezultate na takmičenjima iz hemije, fizike i matematike. 2000. godine je kao dio reprezentacije opštine Živinice, na državnom (BiH) takmičenju osvojio prvo mjesto iz fizike, biologije i geografije. Gimnaziju (opšti smjer) je završio u Živinicama 2004. godine sa prosječnom ocjenom 5.0. Farmaceutski fakultet na Univerzitetu u Tuzli je upisao školske 2004/2005. godine, a diplomirao je 2009. godine sa prosječnom ocjenom 8.82. Za vrijeme trajanja školske 2008/2009 godine obavljao je posao demonstratora na predmetu Farmaceutska hemija I i II. Školske 2008/2009. godine dobio je priznanje i nagradu od Ministarstva obrazovanja Federacije BiH, kao jedan od 80 najboljih studenata Federacije BiH. Od 2009-2014. obavljao je poslove asistenta na užoj naučnoj oblasti Farmaceutska hemija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Tuzli, bez zasnivanja radnog odnosa. Nakon završenog fakulteta odradio je pripravnički staž i položio stručni ispit, te obavljao više vrsta rukovodećih poslova u privatnim zdravstvenim ustanovama. Trenutno je uposlenik Ministarstva zdravstva Tuzlanskog kantona (BiH) na poziciji stručnog savjetnika za oblast farmacije. Doktorski studij upisuje školske 2010/2011. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Doktorsku disertaciju pod nazivom **“Određivanje strukture farmakofore antagonista angiotenzinskih AT<sub>1</sub> receptora i hemometrijski pristup optimizaciji HPLC metode za određivanje losartana, valsartana i irbesartana”** uradio je pod rukovodstvom prof. dr Zorice Vujić. Autor je i koautor 3 rada štampana u časopisima od međunarodnog značaja od kojih 3 rada čine dio doktorske teze, 1 rada štampanog u časopisu nacionalnog značaja koji nije na SCI listi, 2 rada saopštena na skupovima međunarodnog značaja štampani u cjelini, 4 rada saopštena na skupovima nacionalnog značaja štampani u cjelini.

## Изјава о ауторству

Потписани Миралем Смајић

број индекса 16/10

### Изјављујем

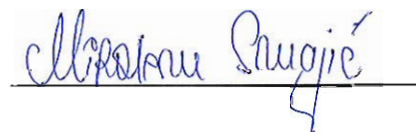
да је докторска дисертација под насловом

„Одређивање структуре фармакофоре антагониста ангиотензинских AT<sub>1</sub> рецептора и хеометријски приступ оптимизацији HPLC методе за одређивање лосартана, валсартана и ирбесартана“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_



## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Миралем Смајић

Број индекса 16/10

Студијски програм: фармацеутска хемија

Наслов рада: „Одређивање структуре фармакофоре антагониста ангиотензинских AT<sub>1</sub> рецептора и хеометријски приступ оптимизацији HPLC методе за одређивање лосартана, валсартана и ирбесартана

Ментор: Проф. др Зорица Вујић, редовни професор“

Потписани Миралем Смајић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Одређивање структуре фармакофоре антагониста ангиотензинских АТ<sub>1</sub> рецептора и хеометријски приступ оптимизацији HPLC методе за одређивање лосартана, валсартана и ирбесартана“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_

