

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Marija M. Mašković

**MULTIKRITERIJUMSKI PRISTUP
OPTIMIZACIJI HROMATOGRFSKIH
METODA ZA FARMACEUTSKU
ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Marija M. Mašković

**MULTI-CRITERIA DECISION-MAKING
APPROACH IN CHROMATOGRAPHIC
METHODS OPTIMISATION USED FOR
PHARMACEUTICAL ANALYSIS OF
PERINDOPRIL *t*-BUTYLAMINE**

Doctorial Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor

Prof. dr Darko Ivanović

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

Doc. dr Biljana Stojanović

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Doc. dr Anđelija Malenović

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Doc. dr Zorica Stanimirović

Univerzitet u Beogradu – Matematički fakultet

Dr sc. Yannis Dotsikas

University of Athens – School of Pharmacy

Datum odbrane

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije i na Katedri za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

ZAHVALJUJEM:

Svom mentoru, *prof. dr Darku Ivanoviću*, koji je rukovodio i pomagao realizaciju ovog istraživanja, na ukazanom poverenju, a posebno na nesebičnoj podršci koju mi je pružao tokom naše dugogodišnje saradnje.

Prof. dr Mirjani Medenici, koja je svojim stručnim savetima usmeravala izradu doktorske disertacije.

Doc. dr Biljani Stojanović i *doc. dr Anđeliji Malenović*, na pruženoj podršci i razumevanju. Svojim savetima, znanjem i iskustvom su u velikoj meri doprinele definisanju mojih istraživačkih interesovanja ali i konačnom oblikovanju ovog rada.

Special thanks belongs to *dr sc. Yannis Dotsikas*, for an unselfish support and help in overcoming the difficulties during the research. His assistance was a big motivation for further progress towards the accomplishment of the goals set.

Doc. dr Zorici Stanimirović, na neposrednom angažovanju i stručnim savetima tokom realizacije disertacije.

Kolegama sa Katedre za analitiku lekova Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i iz *Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije*, na stručnoj i kolegijalnoj pomoći i podršci.

Porodici, prijateljima i svim dragim osobama, koje su na različite načine podržali moje profesionalno usavršavanje.

Naslov disertacije

Multikriterijumski pristup optimizaciji hromatografskih metoda za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina

Rezime

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se korišćenjem savremene metodologije koja uključuje optimizaciju metode multikriterijumskom pristupom i procenu robusnosti metode upotrebom eksperimentalnog dizajna, razviju metode reverzno–fazne i mikroemulzione tečne hromatografije za analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća (perindoprilat, Y31, Y32 i Y33).

U prvom delu doktorske disertacije opisan je razvoj metode reverzno–fazne tečne hromatografije za analizu ispitivanih jedinjenja. Uzimajući u obzir savremeni koncept kojim se obezbeđuje razvoj metode odgovarajućih karakteristika, u fazi optimizacije metode primenjen je centralni kompozicioni dizajn sastavljen iz punog faktorskog dizajna 2^4 , zvezda dizajna sa tačkama $\alpha \pm 0,5$ sa 4 ponavljanja u centralnoj tački, kojim je ispitan uticaj faktora (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH mobilne faze, temperatura kolone i brzina protoka mobilne faze) na odabrane odgovore sistema. Na osnovu dobijenih matematičkih modela izvedeni su zaključci o uticaju faktora ali ne i o globalnom optimumu u ispitivanom eksperimentalnom području. U tom cilju, primenjen je multikriterijumski pristup tj. Deringerova funkcija poželjnih odgovora. Rezultati su omogućili definisanje globalnog optimuma a subjektivni parametri ispitani su primenom analize osetljivosti čime je potvrđen adekvatan izbor optimalnih uslova. Nakon toga, procenjena je robusnost postavljenog optimuma primenom pristupa koji uključuje primenu eksperimentalnog dizajna. Robusnost metode reverzno–fazne tečne hromatografije procenjena je primenom *Plackett–Burman* dizajna kojim je kroz 12 eksperimenata ispitano 7 pravih faktora a u cilju kompletiranja matrice eksperimenata dodata su 4 veštačka faktora (*dummies*). Analiza rezultata primenom statističkih i grafičkih metoda potvrdila je odgovarajuću robusnost optimuma a na osnovu rezultata su određeni i intervali neznačajnosti za značajne faktore, kao i parametri za procenu pogodnosti sistema razvijene metode reverzno–fazne tečne hromatografije za analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća (perindoprilat, Y31, Y32 i Y33). Na kraju,

ispitani su i ostali parametri validacije i metoda je primenjena za analizu tableta sa perindopril *t*-butilaminom.

U drugom delu doktorske disertacije opisan je razvoj metode mikroemulzione tečne hromatografije za analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća (perindoprilat, Y31, Y32 i Y33). Veća složenost eluenta koji se sastoji iz spoljašnje faze, unutrašnje faze, surfaktana i ko-surfaktanata uslovila je i veći broj faktora definisanih kao značajni. U fazi optimizacije primenjen je centralni kompozicioni dizajn sastavljen iz frakcionog faktorskog dizajna 2^{5-1} , zvezda dizajna sa tačkama $\alpha \pm 0,5$ sa 4 ponavljanja u centralnoj tački, kojim je ispitan uticaj faktora (sadržaj etilacetata i butilacetata u unutrašnjoj fazi, sadržaj natrijum-laurilsulfata, sadržaj *n*-butanola i pH mobilne faze) na odabrane odgovore sistema. Kao i kod reverzno-fazne tečne hromatografije, i u ovoj fazi definisani su matematički modeli i procenjeni intenziteti uticaja faktora a u cilju definisanja optimalnih hromatografskih uslova primenjen je multikriterijumski pristup. Analizom osetljivosti potvrđen je dobar izbor vrednosti parametara koji su pod subjektivnim uticajem. Robusnost postavljenog optimuma procenjena je primenom *Plackett–Burman* dizajna kojim je kroz 12 eksperimenata ispitano 8 pravih faktora a u cilju kompletiranja matrice eksperimenata dodata su 3 veštačka faktora (*dummies*). Kao i kod reverzno-fazne tečne hromatografije, usledila je grafička i statistička analiza uz odgovarajuće izračunavanje intervala neznačajnosti za značajne faktore, kao i računanje parametara pogodnosti sistema. Na kraju, ispitani su i ostali parametri validacije i metoda je primenjena za analizu tableta sa perindopril *t*-butilaminom.

Matematičko–softverski sistem koji je korišćen za analizu podataka generisanih upotrebom navedenih metodologija je Design–Expert® 7.0.0. (Stat–Ease Inc., Minneapolis).

Ključne reči: perindopril *t*-butilamin, hemometrija, multikriterijumski pristup optimizaciji metode, *Plackett–Burman* dizajn.

Naučna oblast: Farmaceutska hemija

Uža naučna oblast: Analitika lekova

Title

*Multi-Criteria Decision-Making approach in chromatographic methods optimisation used for pharmaceutical analysis of perindopril *t*-butylamine*

Abstract

The goal of this doctoral dissertation was the development of reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) as well as microemulsion liquid chromatography (MELC) methods for the analysis of perindopril *t*-butylamine and its impurities (perindoprilate, Y31, Y32 and Y33), by using contemporary approaches such as Multi-criteria decision-making method (MCDM) for methods optimisation and experimental design for methods robustness assessment.

Development of RP-HPLC method for the analysis of the investigated compounds was described in the first part of the doctoral dissertation. Taking into account the modern concept that ensures development of the method with appropriate characteristics, Central Composite Design (CCD) with 2^4 full factorial design, $\alpha \pm 0,5$ star design and 4 replicates in central point, was chosen for the method optimisation. Previously described CCD was applied for examination of factors (acetonitrile content in the mobile phase, pH of the mobile phase, column temperature and flow rate of the mobile phase) effects on chosen system responses. Based on the defined mathematical models, conclusions on factor effects were drawn, but not on the global optimum within the examined experimental domain, as well. In that aim, multicriteria approach, i.e. Derringer's desirability function was applied. Results obtained enabled defining of global optimum. Since desirability function itself includes subjective parameters, Sensitivity Analysis was applied which confirmed adequate selection of optimal conditions. After that, robustness of the optimum set was examined by applying experimental design. Robustness of the RP-HPLC method was assessed by applying Plackett-Burman design for examining seven real factors by 12 experiments. Besides seven real factors, 4 dummy factors were included in order to complete the plan of the experiments. Analysis of the results obtained performed by statistical and graphical methods confirmed appropriate robustness of the optimum. In addition, for effects estimated to be significant, non-significant intervals were calculated as well as parameters for the assessment of system-suitability for the developed RP-HPLC

method for the analysis of perindopril *t*-butylamine and its impurities (perindoprilate, Y31, Y32 and Y33). Finally, method validation parameters were examined, after which the method was applied for the analysis of perindopril *t*-butylamine tablets.

Development of MELC method for the analysis of perindopril *t*-butylamine and its impurities (perindoprilate, Y31, Y32 and Y33) was described in the second part of the doctoral dissertation. Microemulsions, as eluents, representing a complex systems consisted of external phase, internal phase, surfactant and co-surfactant, caused increasing number of factors defined as significant. CCD with 2^{5-1} fractional factorial design, $\alpha \pm 0,5$ star design and 4 replicates in central point, was chosen for the method optimisation. Previously described CCD was applied for examination of factors (content of ethyl acetate and butyl acetate in internal phase, content of SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate* – SDS), n-butanol and pH of the mobile phase) effects on chosen system responses. As for the RP-HPLC method, in this phase mathematical models were defined and factor effects were assessed. For optimal chromatographic conditions defining, multicriteria approach was applied. Sensitivity Analysis confirmed adequate selection for values of subjective parameters. Robustness of the optimum set was assessed by applying Plackett-Burman design. For examining eight real factors and 3 dummy factors, 12 experiments were conducted. As for the RP-HPLC method, statistical and graphical analysis was performed along with the calculation of non-significant intervals for effects estimated to be significant and parameters for the assessment of system-suitability for the developed MELC method. Finally, method validation parameters were examined, after which the method was applied for the analysis of perindopril *t*-butylamine tablets.

Mathematical software program used for the analysis of data generated by the above mentioned methodologies is Design-Expert® 7.0.0. (Stat-Ease Inc., Minneapolis).

Keywords: perindopril *t*-butylamine, chemometrics, Multi-criteria decision-making method, *Plackett-Burman* design.

Scientific field: Pharmaceutical chemistry

Field of research: Drug analytics

SADRŽAJ

	<i>str.</i>
1. OPŠTI DEO	1
1.1. OPTIMIZACIJA METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM	1
1.2. MULTIKRITERIJUMSKA OPTIMIZACIJA HROMATOGRAFSKIH METODA	4
1.2.1. Centralni kompozicioni dizajn	5
1.2.2. Multipla regresiona analiza	8
1.2.3. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode	15
1.2.3.1. Metoda preklapanja grafikona kontura (eng. <i>Overlay of contour plots</i>)	16
1.2.3.2. <i>Pareto optimality</i> metoda	17
1.2.3.3. Deringerova funkcija poželjnih odgovora (eng. <i>Derringer's desirability function</i>)	18
1.2.4. Analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora (eng. <i>Sensitivity analysis</i>)	22
1.2.5. Primena funkcije poželjnih odgovora u tečnoj hromatografiji	23
1.3. PROCENA ROBUSNOSTI METODE PRIMENOM PLACKETT–BURMAN DIZAJNA	24
1.3.1. Identifikacija faktora	25
1.3.2. Definisane nivoa ispitivanih faktora	26
1.3.3. Izbor eksperimentalnog dizajna	27
1.3.4. Protokol izvođenja eksperimenata definisanih eksperimentalnim dizajnom	29
1.3.5. Definisane odgovora koji će se određivati	30
1.3.6. Izračunavanje i procena efekata	31
1.3.6.1. Izračunavanje faktorskih efekata	31
1.3.6.2. Interpretacija faktorskih efekata	31
1.3.6.2.1. <i>Grafička interpretacija faktorskih efekata</i>	31
1.3.6.2.2. <i>Statistička interpretacija faktorskih efekata</i>	32
1.3.7. Procena intervala "neznačajnosti" za značajne faktore	36
1.3.8. Definisane granice testa za proveru pogodnosti sistema	36
1.3.9. Primena <i>Plackett–Burman</i> dizajna u proceni robusnosti metode tečne hromatografije	38
1.4. ANALITIKA PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA	40
1.4.1. Struktura i fizičko–hemijske karakteristike	40
1.4.2. Nečistoće perindopril <i>t</i>-butilamina	42
1.4.3. Farmakološko dejstvo	46
1.4.4. Pregled literature	48

2. <u>CILJ</u>	53
3. <u>EKSPERIMENTALNI DEO</u>	54
3.1. APARATI, REAGENSI I MATEMATIČKO–SOFTVERSKI SISTEM	54
3.2. STANDARDNE SUPSTANCE I FARMACEUTSKI DOZIRANI OBLICI	55
3.2.1. Standardne supstance	55
3.2.2. Farmaceutski dozirani oblik	55
3.2.3. Specifikacijski zahtevi proizvođača	55
3.3. SUPSTANCE ZA PROCENU SELEKTIVNOSTI METODE	56
3.4. OPTIMIZACIJA RP–HPLC METODE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA PRIMENOM MULTIKRITERIJUMSKOG PRISTUPA	56
3.4.1. Priprema rastvora za optimizaciju RP–HPLC metode	56
3.4.2. Hromatografski uslovi	57
3.4.3. Eksperimentalni uslovi za izvođenje centralnog kompozicionog dizajna	57
3.5. PROCENA ROBUSNOSTI RP–HPLC METODE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA PRIMENOM PLACKETT–BURMAN DIZAJNA	59
3.5.1. Priprema rastvora za procenu robusnosti RP–HPLC metode	59
3.5.2. Hromatografski uslovi	59
3.5.3. Eksperimentalni uslovi	59
3.5.4. Plan eksperimenta	60
3.6. VALIDACIJA RP–HPLC METODE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA U DOZIRANIM OBLICIMA	62
3.6.1. Priprema rastvora za procenu selektivnosti metode	62
3.6.2. Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode	62
3.6.2.1. Priprema rastvora standarda perindopril <i>t</i> -butilamina	63
3.6.2.2. Priprema rastvora standarda perindoprilata	63
3.6.2.3. Priprema rastvora standarda nečistoće Y31	63
3.6.2.4. Priprema rastvora standarda nečistoće Y32	63
3.6.2.5. Priprema rastvora standarda nečistoće Y33	64
3.6.3. Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti metode	64
3.6.3.1. Priprema rastvora standarda perindopril <i>t</i> -butilamina	64
3.6.3.2. Priprema rastvora standarda perindoprilata	64
3.6.3.3. Priprema rastvora standarda nečistoće Y31	64
3.6.3.4. Priprema rastvora standarda nečistoće Y32	65
3.6.3.5. Priprema rastvora standarda nečistoće Y33	65

3.6.4. Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode	65
3.6.4.1. Laboratorijska smeša 1 (80 %)	65
3.6.4.2. Laboratorijska smeša 2 (100 %)	65
3.6.4.3. Laboratorijska smeša 3 (120 %)	66
3.6.5. Određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije	66
3.6.5.1. Priprema rastvora za određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije	66
3.6.5.1.1. <i>Perindopril t-butilamin</i>	66
3.6.5.1.2. <i>Perindoprilat</i>	66
3.6.5.1.3. <i>Nečistoća Y31</i>	67
3.6.5.1.4. <i>Nečistoća Y32</i>	67
3.6.5.1.5. <i>Nečistoća Y33</i>	67
3.6.6. Priprema rastvora uzorka tableta	67
3.6.7. Hromatografska analiza	67
3.6.7.1. Hromatografski uslovi	67
3.6.7.2. Postupak	68
3.7. OPTIMIZACIJA METODE MIKROEMULZIONE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA PRIMENOM MULTIKRITERIJUMSKOG PRISTUPA	68
3.7.1. Priprema rastvora za optimizaciju MELC metode	68
3.7.2. Hromatografski uslovi	69
3.7.3. Eksperimentalni uslovi za izvođenje centralnog kompozicionog dizajna	69
3.8. PROCENA ROBUSNOSTI METODE MIKROEMULZIONE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA PRIMENOM <i>PLACKETT-BURMAN</i> DIZAJNA	71
3.8.1. Priprema rastvora za procenu robusnosti MELC metode	71
3.8.2. Hromatografski uslovi	71
3.8.3. Eksperimentalni uslovi	72
3.8.4. Plan eksperimenta	72
3.9. VALIDACIJA METODE MIKROEMULZIONE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA U DOZIRANIM OBLICIMA	73
3.9.1. Priprema rastvora za procenu selektivnosti metode	73
3.9.2. Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode	74
3.9.2.1. Priprema rastvora standarda perindopril <i>t</i> -butilamina	74
3.9.2.2. Priprema rastvora standarda perindoprilata	74
3.9.2.3. Priprema rastvora standarda nečistoće Y31	74
3.9.2.4. Priprema rastvora standarda nečistoće Y32	75
3.9.2.5. Priprema rastvora standarda nečistoće Y33	75
3.9.3. Priprema rastvora za procenu preciznosti metode	75

3.9.4. Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode	75
3.9.4.1. Laboratorijska smeša 1 (80 %)	76
3.9.4.2. Laboratorijska smeša 2 (100 %)	76
3.9.4.3. Laboratorijska smeša 3 (120 %)	76
3.9.5. Određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije	77
3.9.6. Priprema rastvora uzorka tableta	77
3.9.7. Hromatografska analiza	77
3.9.7.1. Hromatografski uslovi	77
3.9.7.2. Postupak	78
4. <u>REZULTATI I DISKUSIJA</u>	79
4.1. RP–HPLC METODA ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA	79
4.1.1. Optimizacija primenom multikriterijumskog pristupa	79
4.1.2. Procena robusnosti primenom <i>Plackett–Burman</i> dizajna	88
4.1.3. Validacija RP–HPLC metode	97
4.2. MIKROEMULZIONA TEČNA HROMATOGRAFIJA ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL <i>t</i>-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA	103
4.2.1. Mikroemulzije	103
4.2.2. Optimizacija metode primenom multikriterijumskog pristupa	107
4.2.3. Procena robusnosti metode primenom <i>Plackett–Burman</i> dizajna	119
4.2.4. Validacija metode mikroemulzione tečne hromatografije	128
5. <u>ZAKLJUČAK</u>	134
6. <u>LITERATURA</u>	138

1. OPŠTI DEO

1.1. OPTIMIZACIJA METODE TEČNE HROMATOGRAFIJE POD VISOKIM PRITISKOM

U postupku razvoja hromatografske metode koja se koristi u farmaceutskoj analizi, a u cilju dobijanja metode zadovoljavajućih karakteristika, poželjno je primeniti neki od savremenih pristupa koji omogućava da se kroz relativno mali broj eksperimenata dobije veliki broj korisnih informacija.

Zbog složenosti celog postupka, procena hromatografskog ponašanja ispitivanih komponenti i postavljanje optimalnih hromatografskih uslova predstavlja osnovni izazov. Za definisanje optimalnih hromatografskih uslova može se koristiti više pristupa, a u literaturi se najčešće sreću *one factor at the time* i multifaktorska optimizacija.

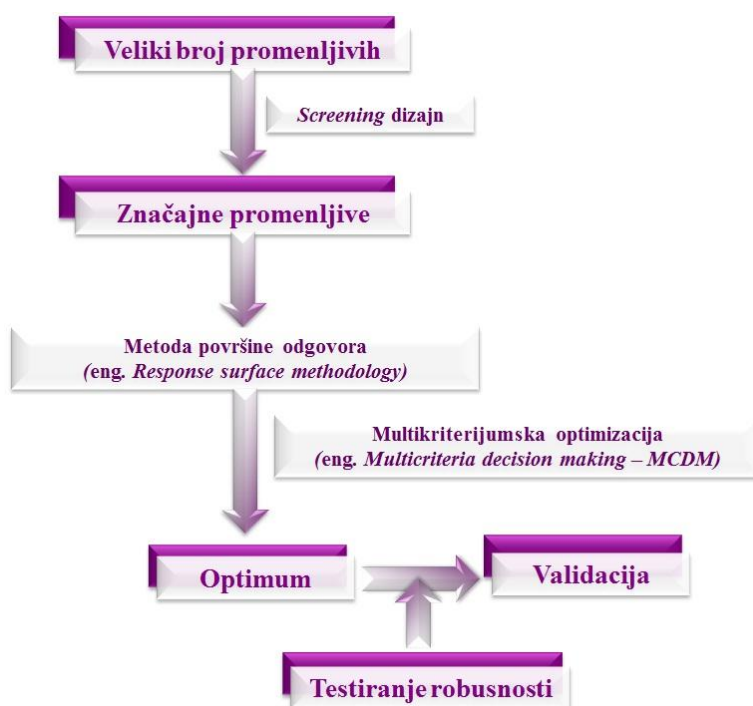
Prvi pristup poznat je kao *one factor at the time* ili postupak u kome se samo jedan faktor menja dok se drugi održavaju na konstantnom nivou. Na taj način se posmatra uticaj samo jednog faktora na posmatrani odgovor sistema. Osnovno ograničenje ovog klasičnog pristupa je činjenica da se ne dobijaju podaci o istovremenom uticaju dva ili više faktora na posmatrani/e odgovor/e sistema, odnosno o faktorskim interakcijama. Pored toga, u ovakvom pristupu broj eksperimenata se drastično povećava ukoliko se povećava broj ispitivanih faktora i, što je najvažnije, optimalni uslovi definisani na ovaj način ne moraju predstavljati optimum, jer mogu varirati u zavisnosti od početnih uslova [1, 2].

Savremeni pristup ovoj problematici podrazumeva istovremeno testiranje više faktora, tzv. multifaktorskim pristupom (eng. *multifactorial approach*), primenom eksperimentalnog dizajna koji obezbeđuje postizanje definisanih ciljeva na najefikasniji i najpouzdaniji način uz smanjenje utroška vremena i resursa tokom eksperimentalnog rada. Za razliku od klasičnog pristupa definisanja optimalnih hromatografskih uslova, obuhvaćeno je i veće eksperimentalno područje (eng. *experimental domain*) [2], a dobijeni rezultati omogućavaju jasno definisanje ponašanja posmatranog sistema. Primenom eksperimentalnog dizajna razvijeni su postupci koji omogućavaju da se izvođenjem relativno malog broja eksperimenata dobije veliki broj podataka koji daju detaljan opis posmatranog sistema i omogućavaju da se donesu ispravne odluke tokom razvoja metode. Savremeni

pristup optimizaciji uključuje dobro isplanirane eksperimente praćene odgovarajućim tumačenjem rezultata, a koji kao krajnji proizvod daju optimalne uslove metode.

Eksperimentalni dizajn je pristup koji omogućava da se kroz seriju eksperimenata definisanih *a priori*, proceni uticaj prethodno definisanih faktora (hromatografski uslovi) na izabrane odgovore (hromatografski parametri), kao i efekte interakcija između pojedinih faktora [3].

Šematski prikaz metodologije za razvoj separacione metode farmaceutске analize, koja se bazira na primeni eksperimentalnog dizajna, prikazan je na slici 1.



Slika 1. Razvoj metode za farmaceutsku analizu primenom eksperimentalnog dizajna

Na početku razvoja metode, ukoliko postoji oskudno ili nepotpuno saznanje o uticajima faktora na odgovore sistema ili se oni ne mogu predvideti, vrši se odabir svih faktora sa potencijalnim uticajem na ponašanje hromatografskog sistema i njihovi efekti procenjuju u fazi selekcije, tzv. skrining fazi (eng. *screening step*) primenom izabranog skrining dizajna (eng. *screening design*) [4, 5]. U ovoj fazi dobijaju se informacije da li je uticaj nekog faktora na odgovor sistema značajan ili ne.

Kada se definišu značajni faktori ili ukoliko su oni *a priori* poznati, pristupa se određivanju njihove optimalne kombinacije koja će rezultirati ili najboljim odgovorom sistema, ili najprihvatljivijim kompromisom za različite odgovore hromatografskog sistema. To se postiže ili geometrijskim pristupom koji predstavlja sekvencionu proceduru (eng. *simplex approach*), ili primenom metode površine odgovora (eng. *Response Surface Methodology* – RSM) [1,5]. Svrha metoda površine odgovora je modelovanje odgovora sistema u cilju nalaženja optimalne kombinacije hromatografskih uslova. Faktori se kod ovih vrsta dizajna ispituju na najmanje tri nivoa zato što se dobijaju modeli koji omogućavaju analizu krive zavisnosti odgovora sistema u funkciji nivoa faktora [6, 7]. Razlika u odnosu na geometrijski pristup određivanja optimalnih hromatografskih uslova je u definisanju modela za ispitivane odgovore sistema i što se podrazumeva da se hromatografski optimum nalazi unutar eksperimentalnog područja kreiranog izborom ekstremnih nivoa za različite faktore. U zavisnosti od toga da li je ispitivana eksperimentalna oblast simetrična ili ne, razlikuju se metode površine odgovora sa simetričnim, odnosno asimetričnim eksperimentalnim dizajnom. Kod simetričnog dizajna raspored eksperimenata u funkciji faktorskih nivoa predstavlja simetričnu figuru, dok kod asimetričnog dizajna to nije slučaj.

U literaturi se mogu naći razni pristupi razvoju metode tečne hromatografije. Oni uključuju primenu različitih vrsta eksperimentalnog dizajna. U Siouffi et al. [8] opisane su različite metode optimizacije tečne hromatografije i kapilarne elektroforeze. U literaturi je opisana primena faktorskog dizajna za skrining i optimizaciju metode tečne hromatografije [9–11]. Pored toga, u literaturi se može naći i primena centralnog kompozicionog dizajna za optimizaciju metoda [12–14]. Takođe, eksperimentalni dizajn se može primeniti u kombinaciji sa veštačkim neuronskim mrežama za optimizaciju separacionih metoda što predstavlja novi trend, jer se pokazalo da je moguće postići bolju tačnost u predviđanju ponašanja hromatografskog sistema u odnosu na matematičke modele [15–19]. Na kraju, procedure zasnovane na primeni kompjuterskih programa, kao što je *DryLab* softver pokazale su se kao pouzdane u postupku optimizacije metoda [20, 21], naročito u slučajevima gde se zahteva izvođenje zaključaka na osnovu malog broja eksperimenata.

Nakon definisanja optimalnih hromatografskih uslova za metode farmaceutske analize potrebno je, pored uobičajenih zahteva koje svaka instrumentalna metoda mora da ispuni, izvršiti i dodatnu procenu kojom se potvrđuje pouzdanost njene primene. To se postiže postupkom validacije metode, a koji, na prvom mestu, podrazumeva procenu robusnosti metode a zatim i procenu ostalih parametara validacije.

U ovom radu je za optimizaciju hromatografske metode primenjen multikriterijumski pristup (eng. *Multi-Criteria Decision-Making Method* – MCDM) koji će ovde i biti detaljno opisan u poglavlju 1.2. Nakon toga, za procenu robusnosti postavljenog optimuma primenjen je pristup koji uključuje eksperimentalni dizajn, a koji je opisan u poglavlju 1.3.

1.2. MULTIKRITERIJUMSKI PRISTUP OPTIMIZACIJI HROMATOGRAFSKIH METODA

Kao što je prethodno rečeno, da bi primena MCDM pristupa u optimizaciji metode bila uspešna potrebno je ceo postupak sprovesti izvođenjem sledećih koraka:

1. Kreiranje plana eksperimenta primenom odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna, a u cilju izvođenja dobro isplaniranih eksperimenata.
2. Definisanje matematičkog modela koji na adekvatan način opisuje posmatrani sistem, kao i procena adekvatnosti modela primenom analize varijanse, tj. ANOVA testa.
3. Procena efekata izabranih faktora.
4. Utvrđivanje optimalnih hromatografskih uslova definisanjem globalnog optimuma istovremenom optimizacijom više odgovora sa različitim ciljevima uz korišćenje Deringerove funkcije poželjnih odgovora (eng. *Derringer's Desirability Function*).

U prvom koraku, koji predstoji nakon preliminarnih eksperimenata kada su izdvojeni faktori koji značajno utiču na sistem i čiji uticaj treba dalje optimizirati, bira se odgovarajući eksperimentalni dizajn. Kreiranje plana eksperimenta primenom eksperimentalnog dizajna omogućava da se kroz određeni broj dobro isplaniranih eksperimenata pokrije što veći deo eksperimentalnog područja. To se postiže pažljivim izborom opsega u kome će se faktori ispitivati. Poželjno je da ti opsezi ne budu previše uski, jer tada nije moguće jasno sagledati ponašanja sistema. S druge strane, da ne budu preširoki, jer se mogu prevideti minimumi ili maksimumi eksperimenta koji mogu biti značajni. U ovom radu je za definisanje plana

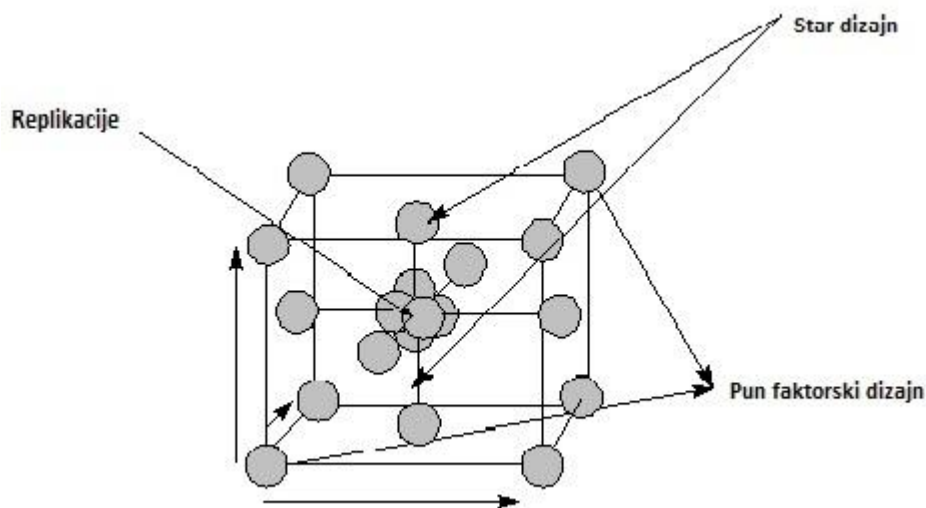
eksperimenta u razvoju metoda tačne hromatografije primenjen centralni kompozicioni dizajn čije će osnovne osobine biti opisane.

1.2.1. Centralni kompozicioni dizajn

Centralni kompozicioni dizajn (eng. *Central Composite Design – CCD*) predstavlja zbir punog faktorskog dizajna (2^n) (ili frakcionog), zvezda (eng. *star*) dizajna ($2n$) i eksperimenata u centralnoj tački (c_p), tako da je ukupan broj faktorskih kombinacija je $2^n + 2n + 1$. Eksperimenti u centralnoj tački izvode se tri do pet puta da bi se dobila veća tačnost rezultata, ali i da bi se proverilo postojanje linearne zavisnosti između niskog (-1) i visokog nivoa ($+1$) i, omogući izračunavanje greške [22].

Pun faktorski dizajn odrazumeva izvođenje eksperimenata na -1 i $+1$ nivoima. Kod zvezda dizajna eksperimenti se izvode na $-\alpha$ i $+\alpha$ nivoima a vrednost α definiše i vrste CCD, što će biti i objašnjeno u daljem tekstu. Na kraju, poslednji element CCD su replikacije koje se izvode u centralnoj tački kojoj odgovaraju nulti nivoi svih faktora.

Kada i pun faktorski dizajn i zvezda dizajn počinju iz iste centralne tačke imamo *centralni kompozicioni dizajn*, a kada počinju iz različitih centralnih tačaka imamo *ne-centralni kompozicioni dizajn* [23]. CCD je uspešan kada se ispituje mali broj faktora, dok se povećanjem broja faktora njegova tačnost smanjuje. Uspešnost faktora (*E-efficiency*) dobija se kao odnos broja parametara u modelu i broja faktorskih kombinacija (za 2 faktora imamo 6 parametara i 9 faktorskih kombinacija, pa je $F=6/9=0,67$, dok je za 10 faktora $F=0,06$ što znači da dizajn obezbeđuje manju uspešnost eksperimenta za 10 faktora) [24]. Na slici 2 prikazan je CCD za 3 faktora.



Slika 2. Elementi CCD

U zavisnosti od vrednosti α razlikuju se dva tipa CCD:

- Ka centru orijentisan CCD (eng. *Face-Centred CCD – FCCD*), gde je $|\alpha| = 1$ i kod koga se svi faktori ispituju na tri nivoa $(-1, 0, +1)$
- Sferni CCD (eng. *Circumscribed CCD – CCCD*), gde je $|\alpha| > 1$ i kod koga se svaki faktor ispituje na pet nivoa $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$. Ukoliko ekstremne vrednosti zvezda dizajna $(-\alpha, +\alpha)$ zadovoljavaju kriterijum $|\alpha| = (2^n)^{1/4}$ govori se o tzv. rotirajućem (eng. *rotatable*) CCCD i tada je $|\alpha| = 1,41$ za slučaj da se ispituju dva faktora, odnosno $|\alpha| = 1,68$ za slučaj da se ispituju tri faktora. U nekim slučajevima α se zbog ograničenja izvođenja eksperimenata ne može postaviti da bude $|\alpha| > 1$, već se tada vrednost za α bira da bude manja od 1 (npr. 0,5).

Primer plana eksperimenta za CCD za tri faktora naveden je u tabeli 1. U navedenom primeru distanca od centralne tačke do negativnog i pozitivnog ekstrema različita je za svaki dizajn (± 1 za pun faktorski dizajn i $\pm 0,5$ za zvezda dizajn). Kada su pozitivne i negativne

distance od centra za oba dizajna iste, tada se on zove ka centru orijentisan CCD i takođe je prikazan u tabeli 1.

Tabela 1. Plan eksperimenta za CCD i za ka centru orijentisan CCD dizajn za tri faktora

Centralni kompozicioni dizajn – CCD			Ka centru orijentisan CCD			
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
Pun faktorski dizajn	-1	-1	-1	-1	-1	-1
	-1	+1	-1	-1	+1	-1
	+1	+1	-1	+1	+1	-1
	+1	-1	-1	+1	-1	-1
	-1	-1	+1	-1	-1	+1
	-1	+1	+1	-1	+1	+1
	+1	+1	+1	+1	+1	+1
	+1	-1	+1	+1	-1	+1
Star dizajn	-0,5	0	0	-1	0	0
	+0,5	0	0	+1	0	0
	0	-0,5	0	0	-1	0
	0	+0,5	0	0	+1	0
	0	0	-0,5	0	0	-1
	0	0	+0,5	0	0	+1
Replikacije	0	0	0	0	0	0

Rotirajući centralni kompozicioni dizajn gotovo da je identičan sa ka centru orijentisanom CCD. Razlika je u generisanju punog faktorskog dizajna kod koga se tačke definišu izračunavanjem vrednosti $\alpha = \pm (2^n)^{1/4}$ koja zavisi od broja faktora [22]. U tabeli 2 prikazana je vrednost za α u funkciji broja faktora [25].

Tabela 2. Vrednosti za α

Broj faktora	2	3	4	5	5	6	6
				2^{5-1}			2^{6-1}
Broj eksperimenata faktorskog dizajna	4	8	16	32	16	64	32
Broj eksperimenata zvezda dizajna	4	6	8	10	10	12	12
α	1,414	1,682	2	2,378	2	2,828	2,378

Nakon kreiranja odgovarajućeg plana eksperimenta, a u skladu sa brojem faktora koji se optimiziraju, izvode se eksperimenti. Na osnovu dobijenih rezultata radi se statistička analiza podataka koja uključuje definisanje matematičkog modela koji na najbolji način opisuje sistem. U tom cilju primenjuje se multipla regresiona analiza (eng. *Multiple Regression Analysis* – MRA).

1.2.2. Multipla regresiona analiza

Multipla regresiona analiza koristi se kada je potrebno uspostaviti matematičku vezu u sistemu gde se ispituje uticaj više faktora na jedan odgovor sistema [6, 26]. Dobijeni matematički model omogućava procenu efekta izabranih faktora ili faktorskih interakcija na posmatrani odgovor sistema.

U osnovi, MRA se prikazuje funkcijom $y = f(x_1, \dots, x_n)$ koja opisuje vezu između ispitivanih faktora (x_1, \dots, x_n) i odgovora sistema (y). Najjednostavniji polinomijalni model, koji opisuje linearnu vezu između nezavisno promenljivih (x_1, \dots, x_i) i odgovora sistema (y) prikazuje se izrazom:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k \quad (1)$$

gde je:

- k – broj faktora
- β_0 – odsečak
- β_i – koeficijenti ispitivanih faktora

Da bi se polinomijalna funkcija mogla primeniti za određivanje optimuma (maksimuma i minimuma) treba da sadrži kvadratni član i tada se dobija kvadratni model koji se prikazuje izrazom:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

gde je:

- k – broj faktora
- β_0 – odsečak
- β_i – koeficijent ispitivanih faktora
- β_{ij} – koeficijent faktorskih interakcija
- β_{ii} – koeficijent kvadrata efekta ispitivanog faktora

Kvadratni model omogućava jasno definisanje kritičnih tačaka i pogodan je za grafičko prikazivanje veze između ispitivanih faktora i odgovora sistema. Članovi polinomijalne funkcije koji se odnose na faktorske interakcije višeg reda (trofaktorske, četvorofaktorske itd.) obično nisu uključeni, jer se takve interakcije smatraju beznačajnim.

Obično se β koeficijenti kod metoda površine odgovora procenjuju kao b koeficijenti. MRA se prikazuje funkcijom $\hat{y} = f(x_1, \dots, x_n)$ koja opisuje vezu između ispitivanih faktora (x_1, \dots, x_n) i predviđenog odgovora sistema (\hat{y}). Navedene polinomijalne funkcije transformišu se u sledeću funkciju:

$$\hat{y} = b_0 + \sum b_i x_i + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

odnosno, za kvadratni model na sledeći način:

$$\hat{y} = b_0 + \sum_1 b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

gde je:

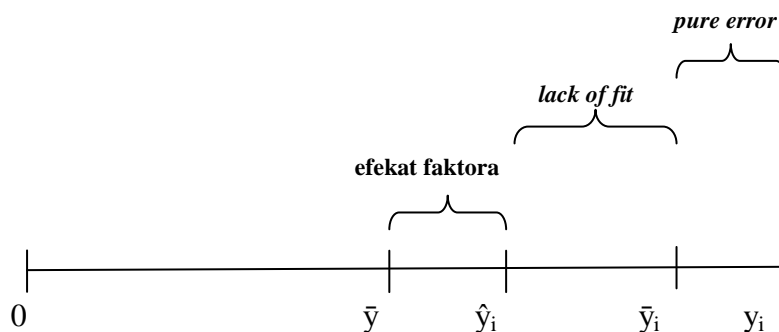
- \hat{y} – predviđeni odgovor sistema
- k – broj faktora
- b_0 – odsečak
- b_i – koeficijent ispitivanih faktora
- b_{ij} – koeficijent faktorskih interakcija
- b_{ii} – koeficijenti kvadrata efekta ispitivanih faktora
- ε – ostatak (*residual*).

Ostatak se dodaje modelu i njegova vrednost se izračunava iz replikacija.

Matematički model je dobar ukoliko su vrednosti ostataka male.

U matematičkom modelu ostatak ε sastoji se od dva dela (slika 3):

- greška samog modela (eng. *lack of fit*)
- eksperimentalna greška (eng. *pure error*)



Slika 3. Grafički prikaz eksperimentalno dobijenih odgovora i modelom izračunatih odgovora

\bar{y} – srednja vrednost svih odgovora

\hat{y}_i – vrednost odgovora izračunata iz modela (eng. *predicted value*)

\bar{y}_i – srednja vrednost odgovora replikacija

y_i – eksperimentalno dobijena vrednost odgovora

Efekat faktora, tj. razlika između vrednosti odgovora izračunatih iz modela i srednje vrednosti svih odgovora, i omogućava procenu uticaja faktora.

Greška samog modela predstavlja razliku između srednje vrednosti odgovora replikacija i vrednosti odgovora izračunatog iz modela. Manja razlika, odnosno manja vrednost greške samog modela ukazuje da model dobro predviđa odgovore sistema [27, 28].

Eksperimentalna greška predstavlja razliku između eksperimentalno dobijene vrednosti odgovora i srednje vrednosti odgovora replikacija i mera je eksperimentalne

nepouzdanosti. Manja razlika, odnosno manja vrednost eksperimentalna greške ukazuje da su odgovori precizniji.

Nakon definisanja matematičkog modela potrebno je pokazati da on na odgovarajući način opisuje odnos između faktora (nezavisno promenljivih) i odgovora (zavisno promenljivih). U tu svrhu primenjuje se analiza varijanse (ANOVA test) [6]. Procena rezultata primenom ANOVA testa podrazumeva ispitivanje rasipanja (disperzije).

U nastavku će biti prikazan način izračunavanja ANOVA testa.

Suma kvadrata svih devijacija (SS_{tot}) izračunava se prema izrazu (5):

$$SS_{tot} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (5)$$

SS_{tot} predstavlja zbir sume kvadrata devijacija koje uzrokuje sam model (SS_{reg}) i suma kvadrata devijacija koje uzrokuju dobijeni ostaci (SS_{res}):

$$SS_{tot} = SS_{reg} + SS_{res} \quad (6)$$

SS_{reg} i SS_{res} izračunavaju se prema izrazima (7) i (8):

$$SS_{reg} = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (7)$$

$$SS_{res} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (8)$$

Replikacije centralne tačke omogućavaju procenu statističke validnosti modela, a na osnovu SS_{res} koja predstavlja zbir sume kvadrata devijacija koje uzrokuje *greška samog modela* (SS_{lof}) i sume kvadrata devijacija koje uzrokuje *eksperimentalna greška* (SS_{pe}). SS_{lof} i SS_{pe} izračunavaju se prema izrazima (10) i (11):

$$SS_{res} = SS_{pe} + SS_{lof} \quad (9)$$

$$SS_{pe} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2 \quad (10)$$

$$SS_{lof} = \sum_{i=1}^n (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 \quad (11)$$

ANOVA test omogućava procenu značajnosti modela koji se koristi za predviđanje odgovora uzimajući u obzir uzrok varijanse (s^2). Varijansa je mera variranja rezultata. Varijansa se izračunava deljenjem sume kvadrata sa odgovarajućim brojem stepeni slobode.

Broj stepeni slobode (eng. *Degrees of Freedom* – DF) pokazuje koliko pojedinačnih rezultata u analiziranom nizu može nezavisno biti definisano.

Tabela 3. Broj stepeni slobode

Uzrok variranja	Broj stepeni slobode
Regresija	$p - 1$
Ostaci	$n - p$
LOF	$m - p$
PE	$n - m$
Ukupne	$n - 1$

n – ukupan broj eksperimenata
 m – ukupan broj nivoa u dizajnu
 p – broj parametara u dizajnu

Varijansa koju uzrokuje: model (s^2_{reg}), dobijeni ostaci (s^2_{res}) i nasumične greške tokom eksperimenta (s^2_{lof} i s^2_{pe}) izračunavaju se iz izraza (12), (13), (14), (15) i (16):

$$s^2_{reg} = SS_{reg} / (p - 1) \quad (12)$$

$$s^2_{res} = SS_{res} / (n - p) \quad (13)$$

$$s^2_{lof} = SS_{lof} / (m - p) \quad (14)$$

$$s^2_{pe} = SS_{pe} / (n - m) \quad (15)$$

$$s^2_{tot} = SS_{tot} / (n - 1) \quad (16)$$

Za procenu značajnosti regresionog modela, odnosno za procenu kako su eksperimentalno dobijeni rezultati uklopljeni u model koristi se izraz:

$$s^2_{res} / s^2_{reg} = F_{(p-1, n-p)} \quad (17)$$

Ako je model statistički značajan, tada je $F_{(p-1, n-p)} > F_{tab}$ što ukazuje da su eksperimentalno dobijeni rezultati dobro uklapaju u dobijeni matematički model.

Za procenu kako model predviđa odgovore koristi se izraz:

$$s^2_{\text{lof}} / s^2_{\text{pe}} = F_{(m-p, n-m)} \quad (18)$$

Ako je $F_{(m-p, n-m)} < F_{\text{tab}}$ model je odgovarajući, a ako je $F_{(m-p, n-m)} > F_{\text{tab}}$ model nije odgovarajući i potrebno ga je unaprediti ili promeniti.

Iz do sada navedenog, može se zaključiti da je model odgovarajući ukoliko je:

- regresija značajna i
- *greška samog modela* nije značajna

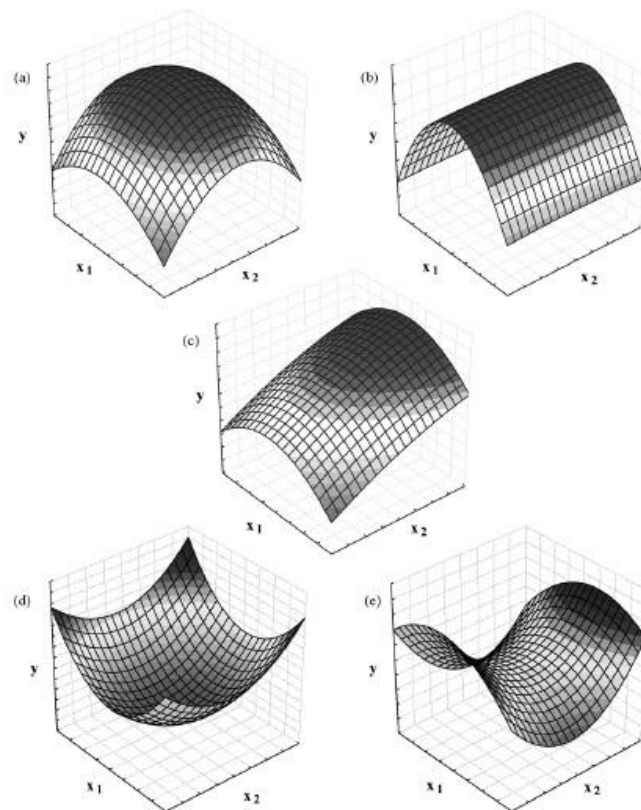
Ukoliko su ispunjena ova dva uslova najveći deo variranja rezultata može se objasniti regresionom jednačinom, dok su ostala variranja posledica ostataka. Variranja, koja su posledica ostataka nastaju usled nasumičnih variranja u eksperimentu (merenju), a ne kao posledica *greške samog modela* koji direktno ukazuje na "kvalitet" modela.

Kada se ANOVA testom potvrdi adekvatnost modela, pristupa se proceni efekata izabranih faktora. Efekti izabranih faktora procenjuju se na osnovu apsolutnih vrednosti koeficijenata definisanog matematičkog modela. Analiziraju se isključivo koeficijenti modela definisanog za kodirane vrednosti faktora, pri čemu veća vrednost koeficijenta ukazuje da faktor ima veći uticaj na posmatrani odgovor sistema. Predznak koeficijenta pokazuje uticaj faktora na odgovor:

- + ukazuje da faktor dovodi do povećanja odgovora
- – ukazuje da faktor dovodi do smanjenja odgovora

Na isti način tumači se i uticaj faktorskih interakcija, ali je u ovom slučaju daleko komplikovanije sagledati uticaj na pravi način i pravilno ga protumačiti. U tumačenju faktorskih interakcija veliku pomoć predstavlja grafički prikaz polinoma drugog reda u obliku 3–D dijagrama. Ovaj dijagram predstavlja površinu odgovora čijim se tumačenjem može objasniti ponašanje odgovora u posmatranom delu prostora, a u zavisnosti od dva posmatrana faktora (slika 4). Sem toga, tumačenjem površine odgovora u nekim slučajevima je moguće definisati optimum, odnosno optimalni region. *Maximum* površine odgovora predstavlja oblast u kojoj je algebarski odgovor najveći, dok je *minimum* oblast sa najmanjim algebarskim odgovorom. *Optimum* je region u kome sistem daje najbolji odgovor. Sistem može biti *unimodalan* – daje samo jedan optimum ili *multimodalan* – daje više optimuma. Funkcija (jedne ili više promenljivih) može imati više lokalnih i ekstremnih

vrednosti (minimum ili maksimum). Za tačku x kažemo da je lokalni minimum ako u nekoj okolini te tačke važi da je $f(x) < f(y)$, za svako y koje pripada toj okolini. Analogno važi i za lokalni maksimum. Među lokalnim minimumima biramo najmanji i proglašavamo ga za globalni minimum i možemo govoriti o okolini globalnog minimuma. Slično i za globalni maksimum, odnosno okolinu globalnog maksimuma. Svaki individualni optimum označava se kao *lokalni optimum* čija se najbolja oblast predstavlja kao *globalni optimum*. Svaka od njih može imati svoju maksimalnu i minimalnu vrednost [29].



Slika 4. Različiti profili 3D–dijagrama: a) maksimum; b) plato; c) maksimum izvan eksperimentalnog regiona; d) minimum i e) površina u obliku sedla

Definisanje optimuma na osnovu vizuelne analize 3–D dijagrama moguće je kada se prati samo jedan odgovor sistema. Ukoliko je optimalne uslove potrebno definisati praćenjem više odgovora, optimum je kompromis, tj. nalaze se uslovi pri kojima svi analizirani odgovori imaju zadovoljavajuću vrednost. U tom slučaju, jedan od mogućih pristupa definisanja optimuma jeste primena multikriterijumskog pristupa (eng. MCDM).

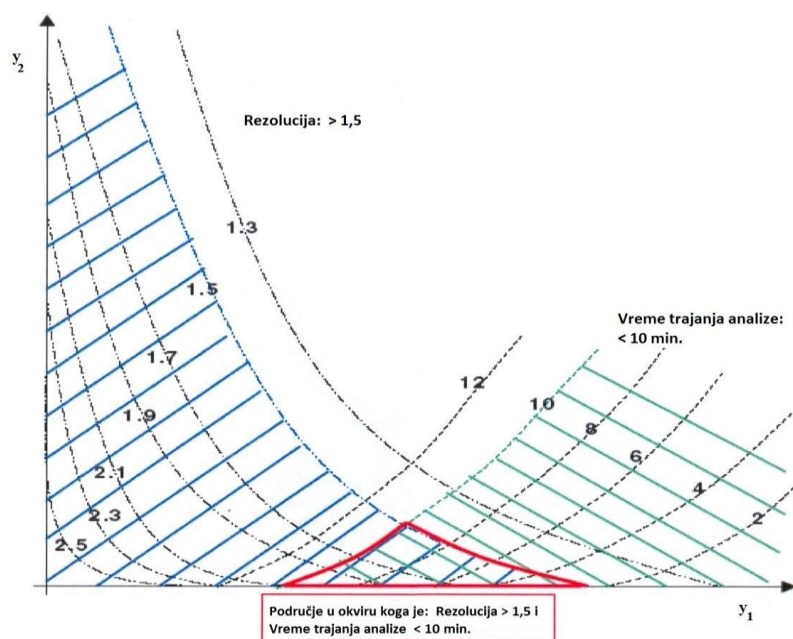
1.2.3. Multikriterijumski pristup optimizaciji metode

U fazi postavljanja optimalnih hromatografskih uslova najčešće postoji potreba istovremene optimizacije više različitih odgovora sistema, gde optimalni uslovi za jedan odgovor sistema nisu nužno optimalni i za druge. Situacija može dodatno biti zakomplikovana činjenicom da odgovori mogu imati suprotne ciljeve. Na primer, ukoliko se prate (i) faktor rezolucije za kritični par komponenti i (ii) vreme trajanja analize, prvi odgovor je bolji ukoliko ima veću vrednost i njega treba maksimizirati, dok je drugi optimalan ukoliko mu je vrednost manja tj. treba ga minimizirati. U hromatografskoj analizi uslovi koji obezbeđuju veliku vrednost faktora rezolucije najčešće prouzrokuju duže vreme trajanja analize i obrnuto.

Najveći problem u definisanju optimalnih uslova jeste iznalaženje opšteg optimuma, odnosno odabir odgovarajućeg kompromisa između individualnih optimuma koji će rezultirati željenim ponašanjem hromatografskog sistema. Prednost u postizanju navedenog cilja ima tzv. multikriterijumski pristup optimizaciji metode (MCDM) [6, 26], jer omogućava istovremenu optimizaciju više odgovora s različitim ciljevima. Multikriterijumski pristup predstavlja uvođenje potpuno novog načina sagledavanja i definisanja optimalnih uslova na osnovu kompromisa između različitih i vrlo često suprotnih ciljeva za izabrane odgovore. Za definisanje globalnog optimuma primenom MCDM metode koriste se različiti pristupi, kao što su putanja najvećeg uspona (eng. *path of steepest ascent*), metoda uslovne optimizacije (eng. *constrained optimization procedure*), metode preklapanja grafikona kontura (eng. *overlay of contour plots*), metoda Pareto optimizacije (eng. *Pareto optimality method*) i Deringerova funkcija poželjnih odgovora (eng. *Derringer's desirability function*) [30]. Koji će se pristup odabrati zavisi od problema koji se rešava, kao i od stručnosti i sposobnosti samog analitičara. Deringerova funkcija poželjnih odgovora je pristup koji podrazumeva dodeljivanje ciljane vrednosti određenom broju odgovora sistema, a zatim biranje i podešavanje ispitivanih faktora kako bi se ciljane vrednosti maksimizirale. Ovaj pristup je u hromatografiju uveo Deming određivši vrednost faktora rezolucije i vreme trajanja analize kao ciljane funkcije u postizanju i poboljšanju kvaliteta razdvajanja [31].

1.2.3.1. Metoda preklapanja grafikona kontura (eng. *overlay of contour plots*)

Ovaj pristup omogućava da se preklapanjem grafikona kontura odredi oblast u okviru koje su svi razmatrani odgovori sistema prihvatljivi ili željeni [4, 26]. Na slici 5 prikazana je površina u okviru eksperimentalnog prostora za dva odgovora sistema, y_1 (vreme trajanja analize) i y_2 (faktor rezolucije), unutar koje su zadovoljeni kriterijumi: faktor rezolucije $> 1,5$ i vreme tajanja analize < 10 min.

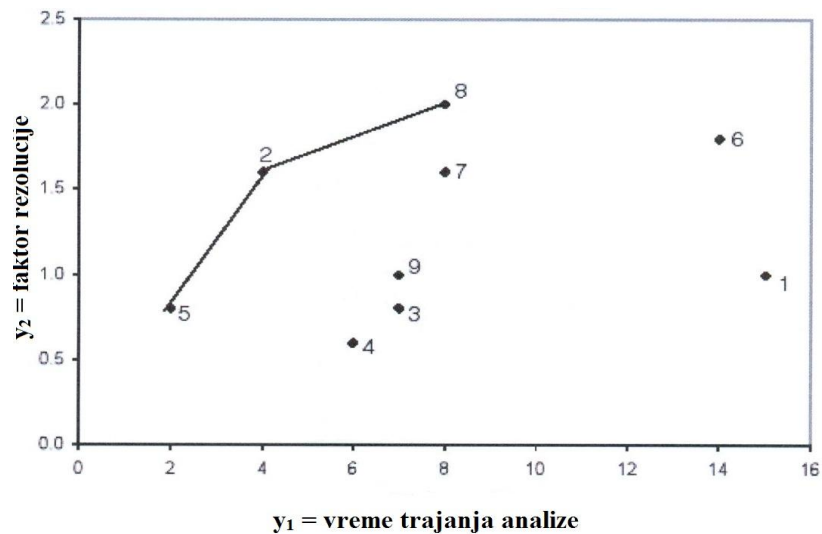


Slika 5. Metoda preklapanja grafikona kontura: površine u okviru kojih su faktor rezolucije $> 1,5$ (plavo) i vreme trajanja analize < 10 min. (zeleno)

Ovakav pristup definisanju globalnog optimuma je praktičan u slučaju dvofaktorske optimizacije. Za više od dva faktora često se može dobiti nekompletna slika s obzirom da je u tim slučajevima obično jedan od faktora fiksiran na određenom nivou. Iako ne postoji ograničenje u pogledu broja odgovora koji se na ovaj način mogu istovremeno optimizirati, što je njihov broj veći, manje su šanse u iznalaženju optimalne oblasti u okviru koje su svi razmatrani odgovori sistema prihvatljivi.

1.2.3.2. Metoda Pareto optimizacije (eng. *Pareto optimality method*)

Kod metoda Pareto optimizacije, eksperiment se smatra *Pareto optimalnim* ukoliko ne postoji ni jedan eksperiment sa boljim ishodom za jedan odgovor sistema, a da se pri tome ne dobije lošiji rezultat za drugi posmatrani odgovor sistema [32, 33]. Na slici 6 prikazani su podaci za dva odgovora sistema (y_1 = vreme trajanja analize i y_2 = faktor rezolucije) dobijeni izvođenjem devet eksperimenata definisanih centralnim kompozicionim dizajnom za dva faktora. Eksperimenti broj 2, 5 i 8 se smatraju *Pareto optimalnim* jer zadovoljavaju unapred definisane ciljeve za izabrane odgovore sistema, a to su skraćenje vremena trajanja analize i povećanje vrednosti faktora rezolucije za pikove koji odgovaraju kritičnom paru komponenti.



Slika 6. *Pareto optimizacija* – odgovori sistema: y_1 = vreme trajanja analize (odgovor koji je potrebno minimizirati) i y_2 = faktor rezolucije (odgovor koji je potrebno maksimizirati)

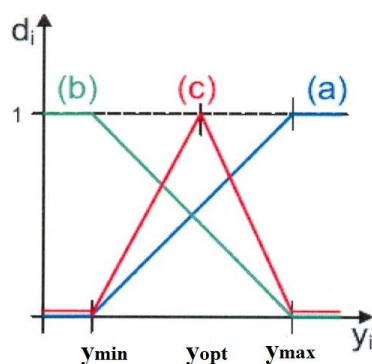
Kao i kod prethodnog pristupa definisanju globalnog optimuma, i metoda Pareto optimizacije je praktična u slučaju optimizacije dva odgovora sistema. Iako se može primeniti i u slučaju optimizacije većeg broja odgovora sistema, ne preporučuje se s obzirom da grafička interpretacija rezultata za tri odgovora nije jasna ili uopšte nije moguća. Takođe, *Pareto optimalna* tačka ne predstavlja uvek praktično najpogodniji optimum – u datom

primeru eksperiment 5 prikazan kao *Pareto optimalan*, nema zadovoljavajući faktor rezolucije.

1.2.3.3. Deringerova funkcija poželjnih odgovora (eng. *Derringer's desirability function*)

Treći pristup definisanju globalnog optimuma zasniva se na primeni Deringerove funkcije poželjnih odgovora, pri čemu se svi odgovori sistema, bilo da su predviđeni odgovori – \hat{Y}_i ili eksperimentalno dobijeni odgovori – Y_i , transformišu tako da se nalaze na istoj skali, a zatim kombinuju u jedan zajednički odgovor koji treba da ima maksimalnu vrednost [34–36]. Transformisani odgovori, (eng. *desirabilities*, d_i), nalaze se na skali od 0 (što predstavlja neželjeni odgovor) do 1 (željeni odgovor).

U zavisnosti da li je cilj da se određeni odgovor maksimizira, minimizira ili dostigne unapred definisanu vrednost koriste se različite transformacije, i to najčešće linearne (slika 7).



Slika 7. Deringerova funkcija poželjnih odgovora: funkcije transformacije za slučaj da je optimalni odgovor maksimalan (a), minimalan (b) ili na unapred definisanoj vrednosti (c)

Kombinovani odgovor, tj. globalni optimum (eng. *global desirability*), D , računa se prema izrazu (19) kao geometrijska sredina za R individualnih optimuma (eng. *desirabilities*, d_i). Vrednosti pojedinačnih optimuma mogu se modifikovati uvođenjem

eksponenta p_i – koeficijent značajnosti (eng. *importance coefficient*), gde, u zavisnosti od značajnosti koja se dodeljuje određenom odgovoru, p_i vrednost može biti:

$$0 < p_i < 1$$

$$p_i = 1, \text{ ili}$$

$$p_i > 1$$

Opseg vrednosti p_i je od 0,1 do 10, ali u najvećem broju slučajeva $p_i = 1$.

Željeni uslovi, odnosno globalni optimum (D) se postiže u slučaju kada vrednost D teži 1, i dobija se na osnovu specifičnih vrednosti nezavisnih promenljivih, tj. individualnih optimuma koje istovremeno dovode do maksimalne vrednosti globalnog optimuma:

$$D = \left(\prod_{i=1}^R (d_i)^{p_i} \right)^{1/R} \quad (19)$$

Transformacija odgovora sistema u vrednosti individualnih optimuma postiže se primenom funkcija poželjnih odgovora po *Derringer*-u i *Suich*-u [35, 37]:

Ukoliko je kod definisanja globalnog optimuma potrebno da pojedinačni odgovor dostigne unapred definisanu vrednost, njegova individualna funkcija poželjnih odgovora izračunava se kao:

$$d = \begin{cases} \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & \text{ako je } L_i \leq Y_i \leq T_i \\ \left[\frac{Y_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^t & \text{ako je } T_i < Y_i \leq U_i \\ 0 & \text{ako je } Y_i < L_i \text{ ili } Y_i > U_i \end{cases} \quad (20)$$

Ukoliko je potrebno da se pojedinačni odgovor maksimizira, njegova individualna funkcija poželjnih odgovora izračunava se kao:

$$d = \begin{cases} 0 & \text{ako je } Y_i \leq L_i \\ \left[\frac{Y_i - L_i}{T_i - L_i} \right]^s & \text{ako je } L_i < Y_i \leq T_i \\ 1 & \text{ako je } Y_i \geq T_i = U_i \end{cases} \quad (21)$$

Ukoliko je potrebno da se pojedinačni odgovor minimizira, njegova individualna funkcija poželjnih odgovora izračunava se kao:

$$d = \begin{cases} 1 & \text{ako je } Y_i \leq T_i = L_i \\ \left[\frac{Y_i - U_i}{T_i - U_i} \right]^s & \text{ako je } U_i < Y_i \leq T_i \\ 0 & \text{ako je } Y_i \geq U_i \end{cases} \quad (22)$$

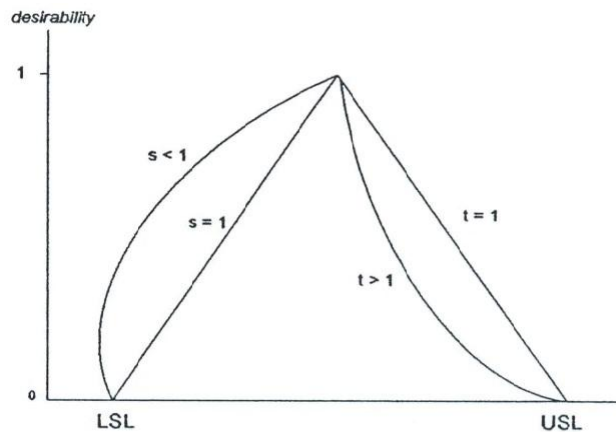
gde su:

- L_i – najmanja željena vrednost za odgovor sistema Y_i
- U_i – najveća željena vrednost za odgovor sistema Y_i
- T_i – ciljana vrednost za odgovor sistema Y_i ,

pri čemu je $L_i \leq T_i \leq U_i$.

Eksponenti s i t su težine (eng. *weights*) koje određuju koliko je bitno postizanje ciljane vrednosti T_i i definišu oblik funkcije poželjnih odgovora (eng. *desirability function*).

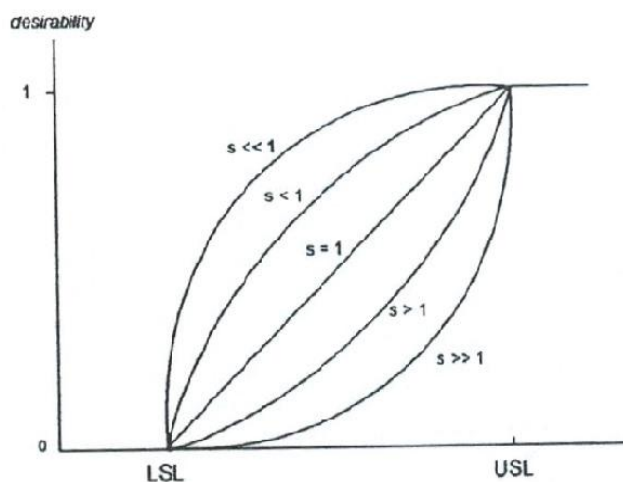
U slučaju definisanja globalnog optimuma kada je potrebno da pojedinačni odgovor dostigne unapred definisanu, ciljanu vrednost, funkcija poželjnih odgovora predstavlja dvostranu transformaciju tzv. *nominal the best desirability function* (slika 8).



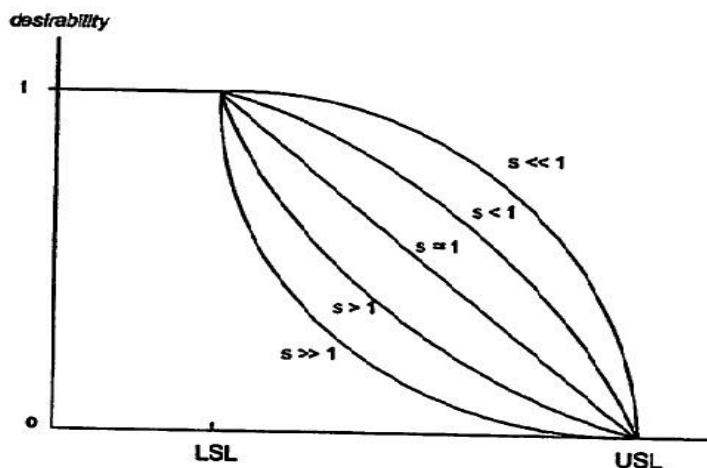
Slika 8. Dvostrana transformacija tzv. *nominal the best desirability function*

* niži specifikacijski limit (eng. *Lower Specification Limit, LSL*); viši specifikacijski limit (eng. *Upper Specification Limit, USL*)

Ukoliko je potrebno da se pojedinačni odgovor maksimizira, tzv. *larger the better desirability function* (slika 9), odnosno minimizira, tzv. *smaller the better desirability function*, funkcija poželjnih odgovora predstavlja jednostranu transformaciju (slika 10).



Slika 9. Jednostrana transformacija, tzv. *larger the better desirability function*



Slika 10. Jednostrana transformacija, tzv. *smaller the better desirability function*

Iz prikazanog se može zaključiti da ukoliko su vrednosti $s = t = 1$, funkcija poželjnijih odgovora linearno dostiže unapred definisanu, ciljanu vrednost (T_i). Odabir vrednosti $s < 1$ i $t < 1$ vrši se u slučaju kada su skoro sve vrednosti predviđenih odgovora sistema \hat{Y}_i veće od vrednosti L_i i manje od vrednosti U_i prihvatljive, ili ukoliko vrednosti \hat{Y}_i koje su značajno veće od vrednosti L_i nisu od kritičnog značaja; u tom slučaju funkcija je konveksna.

Ukoliko je poželjno da su vrednosti \hat{Y}_i bliske vrednosti T_i ili, da brzo dostižu vrednosti koje su veće od L_i , vrši se odabir vrednosti $s > 1$ i $t > 1$; u tom slučaju funkcija je konkavna.

Funkcije poželjnih odgovora, prvobitno uvedene od strane *Harrington-a*, široku upotrebu u multikriterijumskom pristupu opzimizaciji metoda, našle su primenom funkcija po *Derringer-u* i *Suich-u*.

1.2.4. Analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora

Funkcija poželjnih odgovora uključuje subjektivne parametre kao što su koeficijenti značajnosti (p_i) koji se koriste za izračunavanje globalnog optimuma, težine koje određuju oblik funkcije poželjnih odgovora (s i t), kao i opsege odgovora sistema. Ove parametre bira analitičar, pa su samim tim podložni subjektivnoj proceni. Zato je neophodno ispitati prihvatljivost i osetljivost ovih parametara kada su u pitanju željene vrednosti odgovora sistema. Analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora (eng. *sensitivity analysis*) omogućava potvrdu validnosti predviđanja, proučavanje prioriteta u optimizaciji i identifikaciju uticaja koeficijenata značajnosti, težina i opsega odgovora sistema na vrednost globalnog optimuma. Ova analiza treba da ima statističku osnovu kroz procenu robusnosti globalnog optimuma kada se navedeni parametri menjaju. Imajući u vidu pristup predložen u literaturi [37], analizu osetljivosti funkcije poželjnih odgovora treba sprovoditi variranjem parametara do određenog nivoa i analizom uticaja dobijenih odgovora na globalni optimum. Ova procedura uključuje sledeće faze:

- dodeljivanje graničnih vrednosti ispitivanim parametrima
- odabir odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna i definisanje plana eksperimenata

- rešavanje problema većeg broja odgovora za svaki eksperiment i izračunavanje vrednosti globalnog optimuma koji će se u analizi osetljivosti koristiti kao ciljani odgovor
- izračunavanje efekata i
- statistička i/ili grafička analiza efekata

Izračunate vrednosti efekata i odgovarajuće vrednosti predznaka za svaki od njih, identifikuju osetljivost svakog parametra. Efekti sa negativnim predznakom imaju negativan uticaj na globalni optimum i obrnuto. Bez obzira na predznak, za koeficijente čije su vrednosti bliske nuli, smatra se da ne utiču u značajnoj meri na globalni optimum (eng. *insensitive coefficients*).

1.2.5. Primena funkcije poželjnih odgovora u tačnoj hromatografiji

Iznalaganje opšteg optimuma, odnosno odabir odgovarajućeg kompromisa između individualnih optimuma koji će za rezultat imati željeno ponašanje hromatografskog sistema, predstavlja najveći problem u definisanju optimalnih hromatografskih uslova. Prednost u postizanju navedenog cilja ima tzv. multikriterijumski pristup optimizaciji metode (MCDM). Za definisanje globalnog optimuma primenom MCDM metode koriste se različiti pristupi od kojih se izdvaja primena funkcije poželjnih odgovora.

Iako do sada nije publikovan veći broj radova koji se bave primenom funkcije poželjnih odgovora u optimizaciji hromatografskih metoda, pregled literature ukazuje na veliki potencijal navedenog pristupa optimizaciji metoda, ne samo za farmaceutska istraživanja, već i za analitičke metode koje primenu nalaze u kontroli kozmetičkih proizvoda, životne sredine itd.

Opisana je i optimizirana RP–HPLC metoda za kvantitativnu analizu folne kiseline i njenih nečistoća. Preliminarnim ispitivanjima definisani su faktori čiji su efekti ispitivani tokom optimizacije metode primenom centralnog kompozicionog dizajna. Za definisanje optimalnih hromatografskih uslova primenjene su funkcije poželjnih odgovora čime je postignuta istovremena optimizacija odgovora sa različitim ciljevima, u ovom slučaju zadovoljavajuće separacije ispitivanih nečistoća i retencionog faktora folne kiseline [38].

Feniltiohidantoin (PTH) aminokiseline su od velikog značaja za određivanje sekvence aminokiselina kod peptida i proteina. Funkcije poželjnih odgovora primenjene su u optimizaciji metode micelarne tečne hromatografije za razdvajanje devet PTH aminokiselina, i postignuti su odgovarajuća separacija, kao i vreme trajanja analize [39].

Za optimizaciju sastava mobilne faze u cilju postizanja separacije ispitivanih supstanci u smeši primenjen je kompjuterski softver, koji objedinjuje funkcije poželjnih odgovora i PRIZMA dizajn model. Definisanjem optimalnog sastava mobilne faze primenom navedenog softvera postignuta je separacija smeše kumarina iz uzorka biljnog materijala [40].

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi uz hromatografsko razdvajanje primenjena je za istovremeno određivanje sedam antiinflamatornih i jednog antikonvulzivnog leka u uzorcima rečne vode. Definisanje optimalnih eksperimentalnih uslova vršeno je istovremenom optimizacijom više odgovora uz primenu funkcija poželjnih odgovora [41].

Multikriterijumski pristup optimizaciji zasnovan na funkciji poželjnih odgovora primenjen je za optimizaciju hromatografske metode za istovremeno određivanje L-prolina i sedam organskih kiselina u uzorcima vina [42].

Procena hromatografskog ponašanja ropinirola i njegovih nečistoća vršena je hemometrijskim pristupom. Za ispitivanje efekata najvažnijih faktora primenjen je centralni kompozicioni dizajn. Istovremena optimizacija pet izabranih odgovora vršena je primenom funkcije poželjnih odgovora [14].

1.3. PROCENA ROBUSNOSTI METODE PRIMENOM *PLACKETT–BURMAN*

DIZAJNA

Testiranje definisanih eksperimentalnih uslova, u cilju procene robusnosti kao konačne potvrde pogodnosti postavljene i optimizirane metode za farmaceutsku analizu, najčešće se vrši u poslednjoj fazi razvoja, odnosno optimizacije metode, ili u početnoj fazi postupka njene validacije. Ovakvim pristupom ispitivanju robusnosti izbegava se rizik koji postoji pri proceni robusnosti u kasnim fazama validacije analitičke metode, a koji podrazumeva, ukoliko se ustanovi da analitička metoda nije robusna, novi, ali drugačiji pristup razvoju i optimizaciji metode.

Prema preporukama Internacionalne konferencije o harmonizaciji *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) Q2 (R1) robusnost analitičke metode mera je njene sposobnosti da ostane nepromenjena usled malih, ali odmerenih promena u parametrima metode i ukazuje na pouzdanost metode tokom njene primene [43].

Sprovođenje ispitivanja robusnosti na odgovarajući način uključuje sledeće faze: identifikacija faktora koji će se ispitivati; definisanje nivoa ispitivanih faktora; odabir eksperimentalnog dizajna; definisanje protokola eksperimenta; definisanje odgovora koji će se pratiti; izvođenje eksperimenata i sakupljanje eksperimentalnih rezultata; izračunavanje i procena efekata, i izvođenje relevantnih zaključaka na osnovu statističke analize kao i, ukoliko je potrebno, preduzimanje odgovarajućih mera u cilju poboljšanja karakteristika analitičke metode.

1.3.1. Identifikacija faktora

Faktori koji se ispituju pri proceni robusnosti mogu biti vezani za analitičku proceduru (operacioni faktori) i za uslove sredine (faktori sredine) [44, 45]. Odabrani faktori mogu biti *kvantitativni* (pH rastvora, temperatura kolone, koncentracija pufera, protok mobilne faze i talasna dužina detekcije), *kvalitativni* (npr. hromatografska kolona) ili *faktori smeše* (koncentracija organskog rastvarača u mobilnoj fazi).

Osnovna karakteristika kvantitativnih faktora je da mogu da se menjaju u kontinuiranom opsegu. Kod hromatografskih metoda podešavanje, odnosno postavljanje ovih faktora je lako, ali je važno prepoznati na koji način treba da budu predstavljeni. Na primer, sastav pufera može se predstaviti kao koncentracija kisele ili bazne komponente ili kao masa soli rastvorena u odgovarajućoj zapremini vode.

S druge strane, kvalitativni faktori, kao što su proizvodna serija reagensa, proizvođač hromatografske kolone, različite proizvodne serije kolona istih karakteristika ali od jednog proizvođača itd. menjaju se u ograničenom opsegu i odnose se na aspekte kvaliteta analitičke metode – vrednost faktora rezolucije kod hromatografskih metoda ili vreme trajanja analize. Zajedničko za sve kvalitativne faktore je da se, za razliku od kvantitativnih faktora, ne mogu izvući opšti zaključci već samo zaključci primenjivi na ispitivane faktore.

Poslednji tip faktora su faktori smeše gde za smešu od p komponenata, samo $p-1$ se mogu menjati nezavisno. U principu, ako se pokaže da jedna od komponenti smeše ima uticaj na odgovor onda to znači da i smeša kao celina utiče na odgovor sistema.

Faktori koji se mogu razmatrati tokom procene robusnosti HPLC metode su:

- pH mobilne faze
- koncentracija organskog rastvarača
- koncentracija pufera, soli, jon–par reagensa
- protok mobilne faze
- temperatura hromatografske kolone
- kod gradijentnog eluiranja: inicijalni sastav mobilne faze; finalni sastav mobilne faze; nagib gradijenta
- faktori kolone: proizvodna serija stacionarne faze; proizvođač; starost kolone
- faktori detektora: talasna dužina kod UV ili fluorimetrijske detekcije; voltaža kod elektrohemijske detekcije
- faktori integracije: osetljivost

1.3.2. Definisanje nivoa ispitivanih faktora

Kod ispitivanja robusnosti uobičajeno je analiziranje izabranih faktora na dva nivoa, nižem (–1) i višem (+1) koji se nalaze oko nominalne vrednosti prethodno definisane u fazi optimizacije metode. Veoma je važno definisati odstupanja faktorskih nivoa u odnosu na nominalnu vrednost. Preporuka je da se izbor faktorskih nivoa bazira na nesigurnosti na koju se može računati pri postavljanju nivoa, što je obično uzak interval. S druge strane, ukoliko se faktor ispituje u širem intervalu, mogu se izvesti dodatni zaključci, ali je i verovatnoća veća da se pokaže da faktor ima značajan efekat. Dodatno, ako ispitivanja faktora u širem intervalu ukažu da faktor nema značajan uticaj, kvalitet metode je veći, odnosno metoda je robusnija. U definisanju nivoa ispitivanih faktora veoma su korisna iskustva i znanje o ponašanju sistema stečena tokom razvoja i optimizacije metode. Konačno, odluka o faktorskim nivoima može biti prepuštena analitičaru.

1.3.3. Izbor eksperimentalnog dizajna

Za ispitivanje robusnosti metode preporučuje se analiza što većeg broja faktora kako bi se proverio veći broj izmena u karakteristikama analitičke metode. Imajući to u vidu, primena punog faktorskog dizajna je beskorisna, jer veći broj ispitivanih faktora značajno utiče na povećanje broja eksperimenata. Zbog toga se kao eksperimentalni dizajn nameću redukovane forme faktorskog dizajna, kao što su frakcioni faktorski dizajn i *Plackett–Burman* dizajn, jer omogućavaju ispitivanje relativno velikog broja faktora izvođenjem malog broja eksperimenata. Iako ne pružaju informacije o faktorskim interakcijama, prihvatljivi su za ispitivanje, jer se kod robusnosti faktorske interakcije mogu zanemariti.

Frakcioni faktorski dizajn predstavlja redukovani pun faktorski dizajn, pri čemu broj eksperimenata može biti redukovan za 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 itd. i takođe se primarno koristi za skrining eksperimenta. Ovaj dizajn uglavnom se primenjuje na 2 nivoa ($k=2$). Za k nivoa i n faktora prikazuje se kao k^{n-p} eksperimenata, pri čemu je p uvek manje od n . Broj eksperimenata k^{n-p} mora biti veći od n (broj faktora), pri čemu p predstavlja veličinu frakcije, tj. broj kolona koje su proizašle iz punog faktorskog dizajna 2^{β} ($\beta=n-p$) i označava se kao *generator* dizajna. Svaka kolona koja je nastala kao proizvod kombinacija kolona iz faktorskog dizajna označava se kao generator dizajna.

Da bi se lakše razjasnio navedeni dizajn prikazan je jednostavan primer 2^{3-1} . Ako se na primer, primeni za 1/2 redukovani 2^3 pun faktorski dizajn, tada je broj eksperimenata $1/2 \times 2^3 = 2^{-1} \times 2^3 = 2^{3-1}$ tj 4 eksperimenta. Kod navedenog primera 2^{3-1} generator dizajna je x_3 jer nastaje kao proizvod kolona x_1 i x_2 . U tabeli 4 prikazane su faktorske kombinacije i izračunavanje faktorskih efekata za 2^{3-1} frakcioni dizajn.

Tabela 4. Matrica eksperimenata za 2^{3-1} frakcioni dizajn

Faktorske kombinacije	Faktori		
	x_1	x_2	$x_3 (x_1 * x_2)$
a	+	–	–
b	–	+	–
c	–	–	+
abc	+	+	+

Plackett–Burman dizajn predstavlja alternativu za frakcioni faktorski dizajn i omogućava ispitivanje uticaja $N-1$ faktora izvođenjem N eksperimenata, gde N predstavlja proizvod broja 4 [46]. Karakteristika ovog dizajna je da se isključivo procenjuju uticaji glavnih faktora na odgovore sistema. Najveću primenu imaju dizajni sa 8, 12 ili 16 eksperimenata. Za konstruisanje *Plackett–Burman* dizajna s brojem eksperimenata od 8, 12, 16, 20 i 24, koriste se generatori definisani od strane tvorca ovog dizajna, *Plackett–a* i *Burman–a*, a kojima su definisani nivoi faktora (+, –) za prvi eksperiment [47]:

$N = 8$ + + + – + – –

$N = 12$ + + – + + + – – – + –

$N = 16$ + + + + – + – + + – – + – – –

$N = 20$ + + – – + + + + – + – + – – – – + + –

$N = 24$ + + + + + – + – + + – – + + – – + – + – – – –

Naredni eksperimenti u matrici eksperimenata dobijaju se cikličnim permutacijama prve kolone, odnosno pomeranjem generatora prethodnog eksperimenta za jedno mesto udesno; nivo prvog faktora u nizu jednak je nivou poslednjeg faktora u prethodnom eksperimentu. U poslednjem, N –tom eksperimentu svim faktorima dodeljuje se nivo minus.

Primer *Plackett–Burman* dizajna za 12 eksperimenata kojim se prati uticaj 11 faktora dat je u tabeli 5:

Tabela 5. Plaket–Burman dizajn za 12 eksperimenata

№	Faktori										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

U slučajevima kada je broj ispitivanih faktora manji od $N-1$, preostale kolone *Plackett–Burman* dizajna definišu se kao veštački (eng. *dummy*) faktori. Veštački faktor je imaginarna promenljiva za koju promena nivoa nema značaja, odnosno promena faktora sa -1 nivoa na $+1$ nivo nema fizičko značenje. Između ostalog, prisustvo veštačkih faktora u *Plackett–Burman* dizajnu omogućava procenu prisustva nekontrolisanih faktora.

1.3.4. Protokol izvođenja eksperimenata definisanih eksperimentalnim dizajnom

Nakon odabira faktora i tipa eksperimentalnog dizajna, vrši se definisanje eksperimenata koji će se izvesti, tako što se definisani nivoi dizajna (-1 i $+1$, retko 0) zamene sa realnim vrednostima faktorskih nivoa. Izvođenjem eksperimenata određuju se odgovarajući odgovori sistema i vrši procena uticaja ispitivanih faktora na ponašanje hromatografskog sistema.

Često se preporučuje da se eksperimenti definisani dizajnom izvede randomizirano (nasumično) kako bi se minimizirali nekontrolisani uticaji na procenjivane faktorske efekte. Specijalna vrsta nekontrolisanih uticaja, gde se randomiziranim izvođenjem eksperimenata ne rešava problem, su uticaji vremena na odgovore sistema. Na primer, starenjem kolone se određeni odgovori sistema najčešće menjaju u istom smeru (rastu ili se smanjuju) tokom vremena.

Ponekad se eksperimenti dele u *blokove* na osnovu jednog ili više faktora [48]. U takvim situacijama se, npr. svi eksperimenti sa istim nivoom određenog faktora inicijalno izvode, a zatim izvodi ostatak eksperimenata. Primer je eksperimentalni dizajn kod koga se ispituju dve hromatografske kolone, ili kada je faktor koji se razmatra temperatura kolone.

1.3.5. Definisanje odgovora koji će se određivati

Odgovori koji se prate tokom ispitivanja robusnosti mogu se podeliti na kvantitativne i kvalitativne. Kvantitativni odgovori, kao što su sadržaj aktivne supstance i ispitivanih nečistoća, površina ili visina pika, koriste se za kvantitativnu proveru analitičke metode. S druge strane, odgovori koji definišu kvalitet separacije kao što su faktor rezolucije, faktor selektivnosti, retencioni faktor itd., omogućavaju definisanje testa za procenu pogodnosti sistema (eng. *System Suitability Test – SST*).

Postoje različiti pristupi kako bi se minimizirali nekontrolisani uticaji na faktorske efekte a praktično najjednostavniji je ponavljanje nominalnih (0) eksperimenata tokom eksperimentalnog dizajna i izračunavanje korigovanih faktorskih efekata prema izrazu [49]:

$$y_{i,korigovani} = y_{i,izmereno} + y_{nom,na\ poč} - \left(\frac{(p+1-i) \cdot y_{nom,pre} + i \cdot y_{nom,posle}}{p+1} \right) \quad (23)$$

gde je:

- $i = 1, 2, \dots, p$, gde je p broj eksperimenata u dizajnu između dva uzastopna ponovljena nominalna (0) eksperimenata
- $y_{i,korigovani}$ je korigovani faktorski odgovor
- $y_{i,izmereno}$ je eksperimentalno dobijeni faktorski odgovor
- $y_{nom,na\ poč}$ je odgovor nominalnog eksperimenata na početku dizajnom definisanih eksperimenata
- $y_{nom,pre}$ je odgovor nominalnog eksperimenata koji se izvodi pre eksperimenata čiji se odgovor koriguje
- $y_{nom,posle}$ je odgovor nominalnog eksperimenata koji se izvodi posle eksperimenata čiji se odgovor koriguje

Nakon definisanja odgovora koji će se pratiti tokom ispitivanja robusnosti, sledi izvođenje eksperimenata i sakupljanje eksperimentalnih rezultata.

1.3.6. Izračunavanje i procena efekata

1.3.6.1. Izračunavanje faktorskih efekata

Kao što je već spomenuto, nakon izvođenja eksperimenata definisanih dizajnom, efekti faktora se računaju [1] kao:

$$E_x = (\Sigma Y(+1) - \Sigma Y(-1)) / (N/2) \quad (24)$$

gde je:

- X – realni faktor (A, B, C itd.) ili *dummy* faktor iz *Plackett–Burman* dizajna
- E_x – efekat faktora X na odgovor sistema Y
- $\Sigma Y(+1)$ i $\Sigma Y(-1)$ – suma odgovora sistema u slučajevima kada je nivo faktora X (+1) i (-1)
- N – broj eksperimenata

U nekim slučajevima vrši se normalizacija efekata, tj. računaju se u odnosu na prosečnu nominalnu vrednost odgovora sistema (\bar{Y}):

$$\% E_x = (E_x / \bar{Y}) \times 100 \quad (25)$$

Normalizovani efekti, obično značajno više nego regularni faktorski efekti, omogućavaju procenu značajnosti faktorskih efekata čak i bez statističke potvrde.

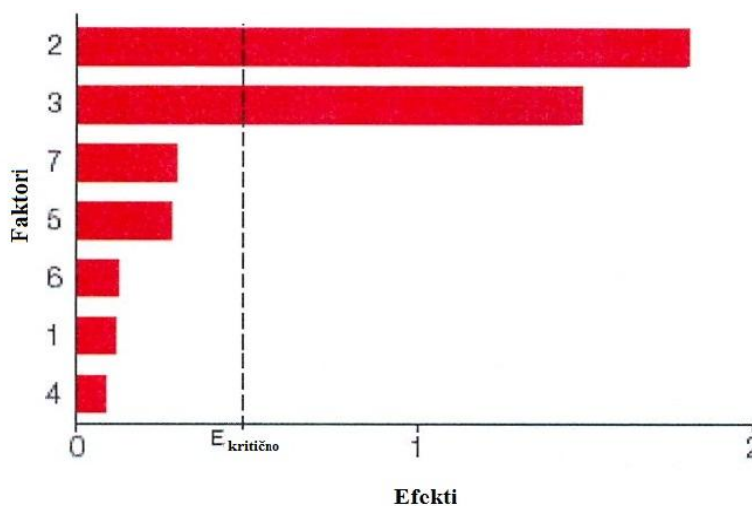
1.3.6.2. Interpretacija faktorskih efekata

Uticaj faktora određuje se primenom odgovarajućih grafičkih ili statističkih metoda [44, 50–52] a zatim vrši selekcija onih čiji je uticaj na hromatografski sistem najznačajniji.

1.3.6.2.1. Grafička interpretacija faktorskih efekata

Grafička procena može se vršiti pomoću *Pareto* dijagrama ili *normal probability* [53–55] odnosno *half–normal probability* [50, 54] grafikona.

Mnogi matematičko–softverski sistemi koji se koriste za analizu podataka prikazuju rezultate u vidu *Pareto* dijagrama [6, 48]. Slika 11 predstavlja prikaz procenjenih faktorskih efekata za primer gde se procenjuje uticaj 7 faktora kroz 8 eksperimenata. Horizontalni stupci predstavljaju apsolutne vrednosti procenjenih faktorskih efekata, dok je vertikalnom linijom predstavljena vrednost kritičnog efekta ($E_{\text{kritično}}$).



Slika 11. *Pareto* dijagram

Svaka vrednost veća od $E_{\text{kritično}}$ ukazuje na značajnost efekta i obrnuto, vrednosti manje od $E_{\text{kritično}}$ govore o tome da efekat faktora nije značajan.

Dalje, za grafičko tumačenje značajnosti efekata obično se primenjuju *normal probability* ili *half-normal probability* grafikoni. Kod *half-normal probability* grafikona na x osu nanose se apsolutne vrednosti faktorskih efekata, dok se kod *normal probability* grafikona nanose dobijene vrednosti efekata.

Efekti koji nisu značajni obično su pozicionirani oko nule ili na pravoj koja u nekim slučajevima prolazi kroz koordinatni početak, dok značajni efekti odstupaju od prave.

1.3.6.2.2. Statistička interpretacija faktorskih efekata

Veoma često, vizuelno određivanje značajnih efekata nije u tolikoj meri očigledno i iz tog razloga je preporučljivo izvesti statistički test za interpretaciju efekata [54, 56] čime se izbegava i subjektivna procena (ne)značajnosti.

Vrednosti limita kojima se procenjuju statistički značajni efekti izračunavaju se statističkim t -testom [44].

$$t = \frac{|E_X|}{(SE)_e} \Leftrightarrow t_{kritično} \quad (26)$$

gde je $(SE)_e$ standardna greška efekta koja predstavlja eksperimentalnu varijabilnost u okviru dizajna.

Vrednost t zavisi od efekta faktora, E_X , i standardne greške efekta, $(SE)_e$, i poredi se sa tabelarnom vrednošću – $t_{kritično}$, koja zavisi od broja stepeni slobode koji je pridružen standardnoj greški efekta $(SE)_e$ i obično se određuje za nivo značajnosti $\alpha = 0,05$.

Izraz (26) može se transformisati tako da vrednost kritičnog efekta, $E_{kritično}$, proizlazi iz vrednosti $t_{kritično}$ i $(SE)_e$:

$$|E_X| \Leftrightarrow E_{kritično} = t_{kritično} \cdot (SE)_e \quad (27)$$

Kritični efekat ($E_{kritično}$) se obično računa za nivo značajnosti $\alpha = 0,05$ (ponekad 0,01 ili 0,1). Efekat se smatra značajnim za dati nivo značajnosti α ako je $|E_X| \geq E_{kritično}$ ili ako je $t \geq t_{kritično}$.

Za statističku interpretaciju faktorskih efekata, opisani su različiti načini izračunavanja standardne greške efekata, $(SE)_e$ [1], od kojih su najznačajniji:

1. procena $(SE)_e$ iz varijanse ponovljenih eksperimenata
2. procena $(SE)_e$ iz *a-priori* proglašanih beznačajnih efekata
3. procena $(SE)_e$ iz *a-posteriori* definisanih beznačajnih efekata (Dongov algoritam)

1. Procena $(SE)_e$ iz varijanse ponovljenih eksperimenata

Standardna greška procenjenog efekta $(SE)_e$ izračunava se prema izrazu:

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{2s^2}{n}} \quad (28)$$

gde je:

- s^2 – varijansa ponovljenih eksperimenata
- n – broj eksperimenata za svaki faktorski nivo

Bilo da je reč o varijansi koja se odnosi na R broj ponavljanja na nominalnom nivou (0) ili iz ponovljenog eksperimentalnog dizajna, njena vrednost može se izračunati iz izraza:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^2}{2n} \quad (29)$$

gde je:

- d_i razlika između rezultata dobijenih za ponovljene eksperimente
- $n = N/2$ ukoliko se ponavljanja vrše na nominalnom nivou, odnosno $n = N$ ukoliko je ponovljen eksperimentalni dizajn
- broj stepeni slobode za $t_{kritično} = R - 1$, ukoliko se ponavljanja vrše na nominalnom novou
- broj stepeni slobode za $t_{kritično} = N$, ukoliko je eksperimentalni dizajn ponovljen

Preporuka je da se ponavljanja vrše u uslovima za intermedijernu preciznost, jer uslovi za ponovljivost dovode do pogrešne procene prave vrednosti za $E_{kritično}$ i tada se veliki broj faktorskih efekata smatra značajnim. Takođe, poželjno je da se procena $(SE)_e$ vrši imajući u vidu najmanje tri stepena slobode.

2. Procena $(SE)_e$ iz *a-priori* proglašanih beznačajnih efekata

U ovom pristupu standardna greška procenjenog efekta, $(SE)_e$, proističe iz n_N *a-priori* proglašanih beznačajnih efekata, E_N , na primer dvofaktorskih interakcija frakcionog faktorskog dizajna ili *dummy* efekata kod *Plackett–Burman* dizajna. U zavisnosti od frakcije izabranog faktorskog dizajna, i faktorske interakcije višeg reda mogu se razmatrati kao beznačajne. Koristi se izraz:

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{\sum E_N^2}{n_N}} \quad (30)$$

gde $\sum E_N^2$ predstavlja sumu kvadrata n_N *dummy* efekata ili efekata interakcija.

Statistički testovi sa malim brojem stepeni slobode nisu preporučljivi, jer je nemoguće adekvatno proceniti značajnost faktora. Ukoliko se ovaj pristup koristi za izračunavanje $(SE)_e$ eksperimentalni dizajn se postavlja tako da ima najmanje tri *dummy* faktora.

Takođe, treba uzeti u obzir činjenicu da u nekim situacijama *dummy* efekti mogu potencijalno biti pod uticajem nekontrolisanih faktora i tada se ne mogu koristiti za izračunavanje $(SE)_e$ jer više ne predstavljaju efekte koji se mogu zanemariti. U slučaju kada to nije moguće, treba se odlučiti za Dongov algoritam.

3. Procena $(SE)_e$ iz *a-posteriori* definisanih beznačajnih efekata (Dongov algoritam)

Standardna greška procenjenog efekta $(SE)_e$ kod ovog pristupa proističe iz *a-posteriori* definisanih beznačajnih efekata primenom Dongovog algoritma koji se bazira na tzv. principu proređenosti efekata (eng. *effect sparsity*) – od svih ispitivanih efekata tokom skринing–a ili testa robusnosti samo nekolicina se smatra značajnim. Standardna greška $(SE)_e$ izračunava se iz izraza:

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{\sum E_k^2}{m}} \quad (31)$$

uzimajući u obzir m efekata E_k koji se ne smatraju značajnim, odnosno za koje važi princip:

$$|E_k| \leq 2,5 \times s_0 \quad (32)$$

gde je s_0 inicijalna procena greške zasnovana na svim greškama i računa se kao:

$$s_0 = 1,5 \times \text{median } |E_x| \quad (33)$$

$(SE)_e$ se koristi za računanje tzv. granice greške (eng. *Margin of Error – ME*) koja je statistički validan kriterijum za testiranje značajnosti kada treba testirati jedan efekat:

$$ME = t_{(1-\alpha/2, df)} \times (SE)_e \quad (34)$$

gde je:

- $1-\alpha/2 = 0,975$ za $\alpha=0,05$

- $1-\alpha/2 = 0,995$ za $\alpha=0,01$
- $df = m$

Efekat faktora, E_x , značajan je ukoliko je $|E_x| \geq ME$.

Kada je potrebno testirati veći broj efekata, statistička značajnost se drugačije testira i definiše se drugi kriterijum tzv. *Simultaneous Margin Error –SME*.

$$SME = t_{(1-\alpha^*/2,df)} \times (SE)_e \quad (35)$$

gde je $\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^{(1/m)}$, tj. Sidakov prilagođeni nivo značajnosti [57].

ME i *SME* su kritični limiti i efekat koji prevazilazi *ME* ali je ispod *SME*, definiše se kao moguće značajan, dok se efekat koji je iznad *SME* smatra značajnim [58]. Međutim, iz praktičnih razloga *ME* vrednost se koristi kao kriterijum za definisanje značajnosti efekata, čak iako postoji šansa da se neki efekat okarakterise kao lažno značajan.

1.3.7. Procena intervala "neznačajnosti" za značajne faktore

Nakon procene značajnosti efekata, postavlja se pitanje u kom intervalu nivoa faktor čiji je efekat na ponašanje hromatografskog sistema značajan, treba kontrolisati da bi se faktorski efekat eliminisao. Intervali "neznačajnosti" za značajne efekte [44], izračunavaju su na sledeći način:

$$\left[X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{critical}}{2|E_X|}, X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{critical}}{2|E_X|} \right] \quad (36)$$

gde su $X_{(0)}$, $X_{(1)}$ i $X_{(-1)}$ prave vrednosti faktora X za nivoe (0), (1) i (-1).

Iz navedenog se može zaključiti:

- da se ovi nivoi mogu izračunati samo za kvantitativne faktore
- da ekstremni nivoi moraju biti postavljeni simetrično oko jednog nominalnog nivoa i
- da se podrazumeva da se odgovor linearno ponaša u funkciji faktorskih nivoa

1.3.8. Definisavanje granica testa za proveru pogodnosti sistema

Test za proveru pogodnosti sistema je sastavni deo mnogih farmaceutskih test metoda, jer se njime potvrđuje podobnost i efektivnost sistema [59]. SST granice se obično

određuju na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih za vreme optimizacije i validacije metode i na osnovu iskustva analitičara. Međutim, ICH Q2 (R1) ukazuju da "jedna od posledica procene robusnosti sistema treba da bude i definisanje serije parametara za procenu pogodnosti sistema kako bi pri svakoj rutinskoj primeni metode bili sigurni u njenu validnost" [43]. Zato se preporučuje definisanje SST granica upotrebom eksperimenta koji za rezultat ima najgori odgovor sistema, tzv. "uslovi sa najgorim odgovorom" (eng. *worst-case situation*) [60]. "Uslovi sa najgorim odgovorom" predviđaju se iz izračunatih efekata, tako da ustvari predstavljaju kombinaciju faktora koja rezultuje najgorim odgovorima sistema.

Da bi se definisali "uslovi sa najgorim odgovorom", uzimaju se u obzir samo statistički značajni faktori (na $\alpha = 0,05$) i oni koji su im bliski (značajni na $\alpha = 0,1$). Za faktore koji nisu značajni na $\alpha = 0,1$ smatra se da njihovi faktorski efekti potiču samo iz eksperimentalne greške. Izvedena je jednačina kombinacije faktorskih nivoa kojom se mogu predvideti "uslovi sa najgorim odgovorom":

$$Y = b_0 + \frac{E_{F_1}}{2} * F_1 + \frac{E_{F_2}}{2} * F_2 + \dots + \frac{E_{F_k}}{2} * F_k \quad (37)$$

U izrazu (37), Y predstavlja odgovor, b_0 srednju vrednost odgovora dobijenih iz dizajna, E_{F_i} efekat faktora koji se uzima kao eksperiment koji je rezultovao najgorim retencionim parametrima i F_i nivo tog faktora (-1 ili +1). Faktori koji nisu značajni održavaju se na nominalnoj vrednosti ($F_k = 0$).

SST granica se može eksperimentalno odrediti iz rezultata jednog ili više eksperimenata izvedenih pod "uslovima sa najgorim odgovorom" ili se može predvideti. Kada se eksperiment ponavlja SST granica se može definisati kao gornja ili donja granica iz jednostranog intervala pouzdanosti 95 % [56] oko srednje vrednosti "uslova sa najgorim odgovorom". Za faktor rezolucije i reticioni faktor, na primer, treba izabrati donju granicu, dok za faktor simetrije to treba da bude gornja granica.

Interval pouzdanosti se definiše kao $\left[\bar{Y}_{Worst-case} - t_{\alpha, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \infty \right)$ kada se razmatra donja granica i $\left[0, \bar{Y}_{Worst-case} + t_{\alpha, n-1} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right]$ kada se razmatra gornja granica.

Ukoliko za neki odgovor nema značajnih efekata, tada se SST granice mogu definisati kao u prethodnom slučaju samo se kao "uslovi sa najgorim odgovorom" biraju nominalni uslovi [44].

Mnogo je jednostavnije da se kao SST granica uzme srednja vrednost rezultata eksperimenata pod "uslovima sa najgorim odgovorom" ($Y_{Worst-case}$).

Najzad, SST granica se može izračunati iz teorijskog modela definisanog izrazom (37) bez izvođenja dodatnih eksperimenata.

Treba znati da se SST granica određuje samo kada je metoda robusna u pogledu kvantitativnosti [44]. U tom slučaju, može se očekivati da ni u jednoj tački eksperimentalnog dela, uključujući i one gde izvesni odgovori imaju najgore rezultate, neće biti problema sa kvantitativnošću. Hipoteza da "uslovi sa najgorim odgovorom" ne utiče na kvantitativnost može se lako proveriti u praksi.

Pored preporuka ICH smernica postoje i praktični razlozi za određivanje SST granica na osnovu testa robusnosti. Iz iskustva je zapaženo da se SST granice, odabrane nezavisno od rezultata testa robusnosti, ne mogu se često ispoštovati prilikom transfera metode. S druge strane, nije poželjno ni definisati SST granice kao najekstremniju vrednost koja i dalje ne utiče na kvantitativnost. Na primer, pod definisanim i optimiziranim uslovima vrednost faktora rezolucije je oko šest, vrednost faktora rezolucije dva neće biti prihvatljiva čak i ako se kvantifikacija još uvek čini mogućom. Zato je poželjno SST limite definisati iz testa robusnosti, jer se prilikom testiranja robusnosti ispituju najekstremnije varijacije faktora, pri čemu su te varijacije teorijski moguće u datim uslovima.

1.3.9. Primena *Plackett–Burman* dizajna u proceni robusnosti metode tečne hromatografije

Primenom *Plackett–Burman* dizajna procenjena je robusnost metode za određivanje senozida A i senozida B u tabletama. Ispitano je 11 faktora kroz 23 eksperimenata (dizajn na

tri nivoa), a kao faktori ispitvani su vrsta kolone, koncentracija jon-par reagensa, sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH pufera, temperatura kolone, brzina protoka mobilne faze, talasna dužina detekcije i faktor koje predstavlja karakteristiku detektora poznat kao *time constant*, a kao odgovori praćene su vrednosti faktora rezolucije između kritičnih parova, retenciono vreme senozida B, itd. [61].

Za procenu robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje ketokonazola i formaldehida u šamponu primenom *Plackett–Burman* dizajna ispitano je 11 faktora u 12 eksperimenata. Kao pravi faktori praćeni su koncentracija natrijum-dihidrogenfosfata u vodenom delu mobilne faze, pH vodenog dela mobilne faze, sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, protok mobilne faze i temperatura kolone, dok su površina pika, retencioni faktor i faktor simetrije pika praćeni kao odgovori sistema [62].

Za analizu uticaja 7 faktora na robusnost metode za određivanje R-timolola i drugih srodnih supstanci u S timolol-maleatu izvedeno je 8 eksperimenata prema *Plackett–Burman* dizajnu. Ispitani su uticaj vrste LC opreme, godina proizvodnje kolone, sadržaj 2-propanola u mobilnoj fazi, sadržaj dietilamina u mobilnoj fazi, brzina protoka mobilne faze, talasna dužina detekcije i temperatura na površinu pika [63].

Robusnost metode tečne hromatografije za određivanje fermentacijom dobijenog pneumocandin B₀ ispitana je kroz 12 eksperimenata dizajniranih *Plackett–Burman* dizajnom. Uticaj šest faktora (talasna dužina detekcije, volumen injektovanja, brzina protoka mobilne faze, sastav mobilne faze, temperatura kolone i serija kolone) na retenciono vreme, retencioni faktor, broj teorijskih platoa kolone, faktor simetrije pika i faktor rezolucije ispitani su u proceni robusnosti [64].

Robusnost metode za određivanje sadržaja (R)-salbutamol sulfata procenjena analizom 4 eksperimenata definisanih *Plackett–Burman* dizajnom. Ispitan je uticaj pH mobilne faze, brzine protoka mobilne faze i temperature kolone na faktor rezolucije, reproduktivnost i R/S odnos (odnos enantiomera) [65].

Plackett–Burman dizajn izveden u 12 eksperimenata primenjen je za ispitivanje uticaja 6 pravih faktora (sadržaj acetonitrila, sadržaj trietilamina, pH vodene faze, brzina protoka mobilne faze, temperatura kolone i vrsta kolone) na retencione faktore pramipeksola i njegovih 5 nečistoća. Procenjena je robusnost metode, definisani su intervali neznačajnosti

za značajne faktore, a na osnovu rezultata iz dizajna definisani su limiti za procenu pogodnosti sistema [66].

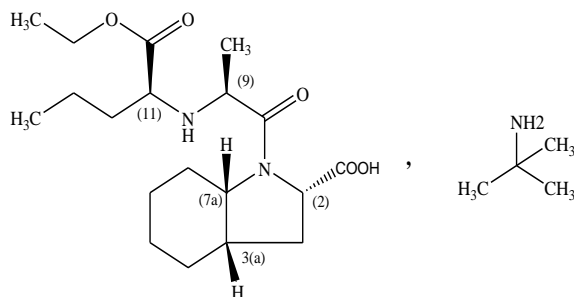
Robusnost metode tačne hromatografije za određivanje ropinirola i njegove nečistoće C ispitana je primenom *Plackett–Burman* dizajna. Ispitano je 7 pravih faktora (sadržaj acetonitrila, koncentracija natrijum-heptansulfonata, pH mobilne faze, talasna dužina detekcije, temperatura kolone, brzina protoka mobilne faze i vrsta kolone) kroz 12 eksperimenata. Kao odgovori praćeni su retencioni faktori ropinirola i nečistoće C, faktor simetrije pika, faktor rezolucije i površine pikova [67].

1.4. ANALITIKA PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA

1.4.1. Struktura i fizičko–hemijske karakteristike

INN: Perindopril

Strukturna formula:



Slika 12. Strukturna formula perindopril *t*-butilamina

Molekulska formula: $C_{23}H_{43}N_3O_5$

Relativna molekulska masa: 441,6

Hemijsko ime:

- 2-metilpropan-2-amin(2S,3aS,7aS)-1-((2S)-2-(((1S)-1-(etoksikarbonil)butil)amino)propanoil)oktahidro-1H-indol-2-karboksilat (Evropska farmakopeja, 7. izdanje, monografija 01/2008:2019)

Ostala imena:

- (2S,3aS,7aS)-1-((S)-N-((S)-1-(etoksikarbonil)alanil)oktahidro-1H-indol-2-karboksilna kiselina, *t*-butilamin so (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)
- S 9490-3 (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)

CAS broj: 107133-36-8

ATC kod: C09AA04

Oficinalan u farmakopijama: Evropska farmakopeja (Ph.Eur.) 7. izdanje [68]

Izgled. Beo ili skoro beo, neznatno higroskopan, kristalan prašak.

Rastvorljivost. Lako rastvoran u vodi i etanolu (96 %), rastvoran do umereno rastvoran u metilenhloridu.

pH vodenog rastvora: 8,20.

Tačka topljenja. Vrednost tačke topljenja perindopril *t*-butilamina varira u zavisnosti od eksperimentalnih uslova i posledica je termičke razgradnje. Zbog toga tačka topljenja ne može biti kriterijum za identifikaciju aktivne supstance.

Polimorfizam. Postoje 4 kristalne forme perindopril *t*-butilamina: α , β , hidratizana β i γ . Aktivna supstanca koja ulazi u sastav farmaceutskih doziranih oblika je uvek u obliku α kristalne forme.

Hiralnost. Perindopril *t*-butilamin sadrži 5 asimetričnih C atoma, što za rezultat ima postojanje 32 izomera, odnosno postojanje 12 pari enantiomera. Aktivna supstanca koja ulazi u sastav farmaceutskih doziranih oblika je uvek SSSSS konfiguracija.

Optička rotacija. $[\alpha]_{D/20}$ od -67° do -69° u etanolu.

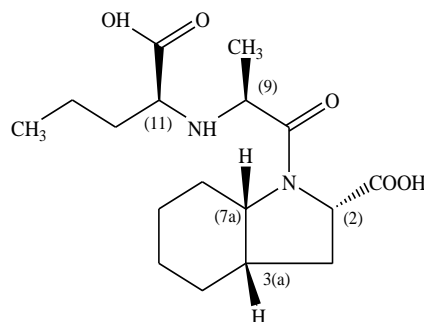
1.4.2. Nečistoće perindopril *t*-butilamina

Nečistoće koje mogu biti prisutne u aktivnoj farmaceutskoj supstanci perindopril *t*-butilamin mogu poticati od polaznih sirovina koje se koriste u procesu sinteze, mogu se formirati tokom procesa sinteze ili nastati degradacijom molekula perindopril *t*-butilamina.

Perindopril *t*-butilamin je derivat indola i u bočnom nizu ima estarsku grupu čijom hidrolizom nastaje perindoprilat, njegov aktivni metabolit od koga potiče farmakološko dejstvo. Nečistoće Y31, Y32 i Y33 su laktamski derivati koji nastaju intramolekulskom ciklizacijom perindopрила. Nečistoća Y31 nastaje hidrolitičkom razgradnjom estarske grupe u bočnom nizu nečistoće Y33. S druge strane, Y32 i Y33 su i epimeri sa suprotnom konfiguracijom na 4a stereogenom centru molekula.

Perindoprilat, Y31, Y32 i Y33 su degradacioni produkti aktivne supstance perindopril *t*-butilamina, ali se mogu javiti i kao nečistoće prilikom procesa sinteze perindopril *t*-butilamina.

Perindoprilat



Slika 13. Strukturna formula perindoprilata

Molekulska formula: C₁₇H₂₈N₂O₅

Relativna molekulska masa: 340,4

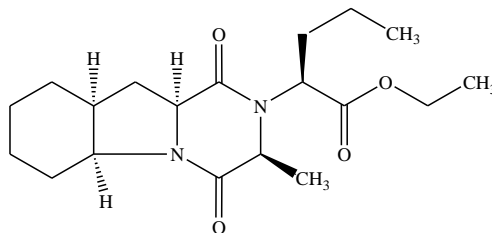
Hemijsko ime:

- (2S,3aS,7aS)-1-(((2S)-2-(((1S)-1-karboksibutil)amino)propanoil)oktahidro-1H-indol-2-karboksilna kiselina (Evropska farmakopeja, 7. izdanje, monografija 01/2008:2019)

Ostala imena:

- (2S,3aS,7aS)-1-((S)-N-((S)-1-karboksibutil)alanil)oktahidro-1H-indol-2-karboksilna kiselina (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)
- S 9780–1 (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)

Nečistoća Y31



Slika 14. Strukturna formula nečistoće Y31

Molekulska formula: $C_{19}H_{30}N_2O_4$

Relativna molekulska masa: 350,5

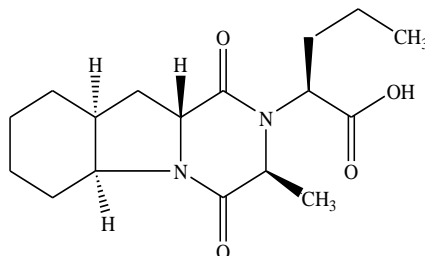
Hemijsko ime:

- etil (2S)-2-((3S,5aS,9aS,10aS)-3-metil-1,4-dioksodekahidropirazino-(1,2-a)-indol-2-(1H)-il)-pentanoat (Evropska farmakopeja, 7. izdanje, monografija 01/2008:2019)

Ostala imena:

- (2S)-etil-(2-((2S,4aS,5aS,9aS)-2-metil-1,4-dioksooktahidro-1H-indolo-(1,2-a)-piperazin-3-il))-pentanoat (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)
- BMD 4-1 (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)

Nečistoća Y32



Slika 15. Strukturna formula nečistoće Y32

Molekulska formula: $C_{17}H_{26}N_2O_4$

Relativna molekulska masa: 322,4

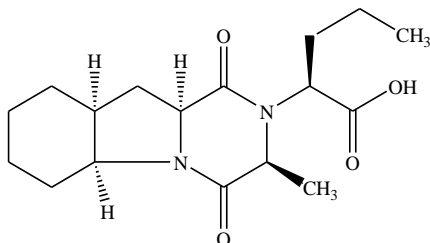
Hemijsko ime:

- (2S)-2-((3S,5aS,9aS,10aR)-3-metil-1,4-dioksodekahidropirazino-(1,2-a)-indol-2-(1H)-il)-pentanska kiselina (Evropska farmakopeja, 7. izdanje, monografija 01/2008:2019)

Ostala imena:

- (2S)-2-((2S,4aR,5aS,9aS)-2-metil-1,4-dioksooktahidro-1H-indolo-(1,2-a)-piperazin-3-il)-pentanska kiselina (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)
- BMD 5-1 (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)

Nečistoća Y33



Slika 16. Strukturna formula nečistoće Y33

Molekulska formula: $C_{17}H_{26}N_2O_4$

Relativna molekulska masa: 322,4

Hemijsko ime:

- (2S)-2-((3S,5aS,9aS,10aS)-3-metil-1,4-dioksodekahidropirazino-(1,2-a)-indol-2-(1H)-il)-pentanska kiselina (Evropska farmakopeja, 7. izdanje, monografija 01/2008:2019)

Ostala imena:

- (2S)-2-((2S,4aS,5aS,9aS)-2-metil-1,4-dioksooktahidro-1H-indolo-(1,2-a)-piperazin-3-il)-pentanska kiselina (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)
- BMD 6-1 (dokumentacija proizvođača aktivne supstance, *Les Laboratoires Servier*, Francuska)

1.4.3. Farmakološko dejstvo

- Mehanizam dejstva

Perindopril *t*-butilamin je antihipertenzivni agens i noviji je predstavnik grupe inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima (eng. *Angiotensin Converting Enzyme*, ACE).

Ovi lekovi sprečavaju pretvaranje neaktivnog angiotenzina I u visoko aktivni angiotenzin II i tim mehanizmom snižavaju povišeni arterijski krvni pritisak. Kako je ACE ujedno i kininaza II, enzim koji učestvuje u razgradnji bradikinina, ovi lekovi inhibicijom

ACE sprečavaju razgradnju ove supstance koja je važan vazodilatator. Prema tome, ACE inhibitori sprečavaju nastajanje jednog snažnog vazokonstriktora (angiotenzin II) i istovremeno zaustavljaju razgradnju jednog snažnog vazodilatatora (bradikinin). Oba efekta su bitni faktori za smanjivanje perifernog vaskularnog otpora. Minutni volumen i frekvencija rada srca se, pri tom, znatnije ne menjaju [69, 70].

S druge strane, inhibicija metabolizma bradikinina je odgovorna za neželjena dejstva ovih lekova, uključujući kašalj i angioedem.

Za razliku od direktnih vazodilatatora, ACE inhibitori ne prouzrokuju refleksnu aktivaciju simpatikusa, pa se mogu pouzdano primeniti i kod bolesnika sa ishemičnom srčanom bolešću.

Perindopril *t*-butilamin deluje preko svog aktivnog metabolita, perindoprilata. Drugi metaboliti ne pokazuju inhibiciju ACE aktivnosti u *in vitro* uslovima.

- Klinička primena ACE inhibitora: hipertenzija, srčana insuficijencija, stanje posle infarkta miokarda, pacijenti sa visokim rizikom od ishemijske bolesti srca, dijabetička nefropatija, progresivna renalna insuficijencija.
- Farmakokinetički podaci [71]

Posle oralne primene perindopril se brzo resorbuje. Vreme postizanja maksimalne koncentracije perindoprila u plazmi iznosi 1 h.

Stepen biološke raspoloživosti iznosi 65 % – 70 %.

Oko 20 % ukupnog perindoprila posle resorpcije brzo hidrolizuje u aktivni metabolit, perindoprilat. Pored aktivnog perindoprilata, perindopril ima još pet metabolita, od kojih nijedan ne ispoljava ACE inhibitornu aktivnost.

Poluvreme eliminacije perindoprila je 1 sat. Maksimalna koncentracija perindoprilata u plazmi postiže se nakon 3–4 h.

Hrana smanjuje konverziju perindoprila u perindoprilat, samim tim i bioraspoloživost, pa iz tog razloga tablete perindopril *t*-butilamina treba uzimati u jednoj dozi ujutro pre jela. Volumen distribucije za nevezan perindoprilat prosečno iznosi 0,2 L/kg. Stepenn vezivanja perindoprilata za proteine plazme je slab (vezivanje perindoprilata za ACE je manje od 30 %), ali zavisi od koncentracije.

Perindoprilat se eliminiše urinom, a poluvreme eliminacije nevezanog perindoprilata je prosečno od 3–5 h. Disocijacija perindoprilata vezanog za ACE vodi efektivnom poluvremenu eliminacije od 25 h; stanje ravnoteže postiže se u roku od četiri dana.

Posle ponovljene upotrebe, nije primećeno kumulovanje perindopрила.

Eliminacija perindopрила je smanjena u starijoj populaciji, kao i kod pacijenata sa srčanom insuficijencijom i renalnim poremećajima, pa je kod pacijenata sa bubrežnom insuficijencijom neophodno podešavati dozu, u skladu sa stepenom oštećenja (klirens kreatinina).

Dijalizni klirens je 70 mL/min.

Kinetika perindopрила je promenjena kod pacijenata sa cirozom jetre gde je hepatični klirens perindopрила smanjen na pola. Međutim, količina formiranog perindoprilata se ne smanjuje, te nema potrebe za podešavanjem doze leka.

- Neželjeni efekti

Zajednički neželjeni efekti za sve ACE inhibitore su prekomerna hipotenzija, akutna renalna insuficijencija, hiperkalemija, angioedem, suvi kašalj, a manje značajni su poremećaj ukusa i alergijske kožne promene.

Suvi kašalj je verovatno rezultat akumulacije bradikinina u bronhijalnoj sluzokoži i najčešći je perzistentni neželjeni efekat. Ponekad je toliko jak da zahteva prekid terapije.

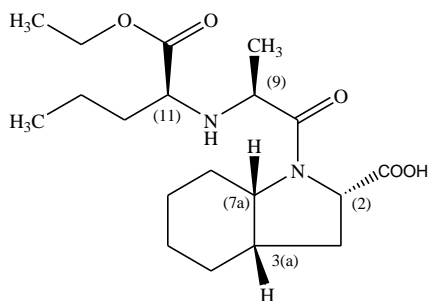
1.4.4. Pregled literature

Perindopril *t*-butilamin je oficinalan prema propisu Ph.Eur. 7 [68]. Jedina oficinalna metoda za ispitivanje stepena čistoće aktivne farmaceutske supstance perindopril *t*-butilamin je metoda reverzno–fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (RP–HPLC), uz gradijentno eluiranje u trajanju od 65 min. Mobilna faza A je voda čiji je pH podešen rastvorom perhlorne kiseline na 2,5, a mobilna faza B je 0,03 % V/V rastvor perhlorne kiseline u acetonitrilu. Razdvajanje se vrši na 4,0 mm × 150 mm *spherical end-capped* C₈ koloni, 5 μm veličine čestica i 15 nm veličine pora, pri protoku mobilne faze 1,0 mL min⁻¹. Monografija Ph.Eur. navodi sledeće zahteve pri praćenju nečistoća u aktivnoj farmaceutskoj supstanci:

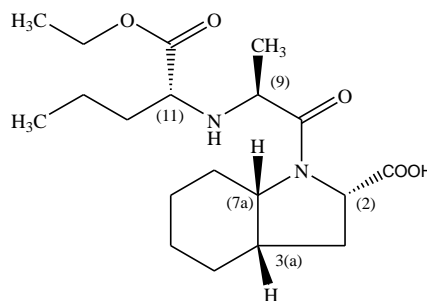
- Nečistoća B (perindoprilat) – najviše 0,3 %,

- Nečistoća F (Y31) – najviše 0,2 %,
- Nečistoće C (Y33), D (Y32) i ostale nespecificirane nečistoće, pojedinačno – najviše 0,1 %,
- Nečistoće, ukupno – najviše 1,0 %.

Perindopril *t*-butilamin sadrži 5 asimetričnih C atoma, što za rezultat ima postojanje 32 izomera, odnosno 12 pari enantiomera. S obzirom da je aktivna supstanca koja ulazi u sastav farmaceutskih doziranih oblika uvek SSSSS konfiguracije, Ph.Eur. monografija propisuje ispitivanje stereochemijske čistoće aktivne farmaceutske supstance perindopril *t*-butilamin RP–HPLC metodom, uz izokratsko eluiranje u trajanju od oko 150 min. Mobilnu fazu čini smeša acetonitrila–pentanola–1,50 g L⁻¹ rastvora natrijum-heptansulfonata čiji je pH podešen na 2,0 rastvorom perhlorne kiseline (21,7 : 0,3 : 78 V/V/V). Razdvajanje se vrši na 4,6 mm × 250 mm *spherical* C₁₈ koloni, 5 μm veličine čestica, pri protoku mobilne faze 0,8 mL min⁻¹, a vreme potrebno za uravnotežavanje sistema je 4 h. Test zahteva korišćenje hemijskog referentnog standarda nečistoće I (*perindopril for stereochemical purity CRS*), epimera perindopрила, sa suprotnom konfiguracijom na 11 stereogenom centru molekula:



Perindopril



Nečistoća I

Monografija Ph.Eur. kao maksimalnu dozvoljenu koncentraciju nečistoće I u aktivnoj farmaceutskoj supstanci navodi 0,1 %.

Imajući u vidu da je perindopril *t*-butilamin noviji predstavnik grupe inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima, do sada nije publikovan veći broj radova koji se bave

ispitivanjima, kako aktivne farmaceutske supstance, tako i farmaceutskih doziranih oblika u čiji sastav ulazi ova supstanca.

Za enantioselektivno određivanje perindopрила (S) razvijena je elektrohemijaska metoda uz upotrebu enantioselektivne, potenciometrijske membranske elektrode bazirane na grafitnim pastama impregniranim hiralnim selektorima. Kao hiralni selektori korišćeni su različiti maltodekstrini i derivati ciklodekstrina, a razvijene metode poslužile su za ispitivanje stereohemijске čistoće aktivne farmaceutske supstance (S)-perindopрила, kao i za određivanje sadržaja (S)-perindopрила aktivne farmaceutske supstance i u farmaceutskim doziranim oblicima [72, 73].

Istovremeno praćenje (S)-perindopрила i (R)-perindopрила vršeno je tečnom hromatografijom uz amperometrijske biosenzore kao detektore. Amperometrijski biosenzori zasnovani su na *l*-aminokiselinskoj oksidazi i *d*-aminokiselinskoj oksidazi. Opisani sistemi su se pokazali kao veoma pouzdani za istovremeno određivanje (S)-perindopрила i (R)-perindopрила u procesu sinteze aktivne farmaceutske supstance [74–76].

Za uporednu analizu perindopрила i indapamida u farmaceutski doziranim oblicima razvijena je i validirana metoda UV spektrofotometrije, zasnovana na istovremenom određivanju navedenih supstanci u metanolnim rastvorima bez prethodnog razdvajanja, merenjem na dve talasne dužine: 210,4 nm (za perindopril) i 285,8 nm (za indapamid) [77].

Opisane su metode atomske apsorpcione spektroskopije, kao i spektrofotometrijske metode za istovremeno određivanje pojedinih inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima i perindopрила, odnosno lizinopрила, enalapril-maleata, ramipрила i perindopril *t*-butilamina u farmaceutskim preparatima. Metode su zasnovane na formiranju kompleksa ispitivanih jedinjenja sa eozinom i bakrom [78, 79].

Za određivanje sadržaja perindopрила u farmaceutskim doziranim oblicima razvijena je i opisana osetljiva kinetička spektrofotometrijska metoda, zasnovana na interakciji perindopрила i 1-hloro-2,4-dinitrobenzena u dimetilsulfoksidu na 40 °C. Reakcija se prati spektrofotometrijski merenjem brzine promene apsorbanacije na 420 nm. Pod optimiziranim eksperimentalnim uslovima, kalibraciona kriva pokazuje linearnu zavisnost u opsegu koncentracija od 20 mg mL⁻¹ do 140 mg mL⁻¹ [80].

Opisana je optimizacija metode kapilarne elektroforeze za istovremeno određivanje nekoliko inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima: enalaprila, lisinoprila, kvinaprila, fosinoprila, perindoprila i benazeprila. Ispitivanjem različitih faktora, kao što su pH pufera, sastav organske faze i prisustvo surfaktanata, utvrđeno je da su pH pufera i sadržaj surfaktanta kritični faktori za separaciju ispitivanih komponenti. Primenom punog faktorskog dizajna na tri nivoa, ustanovljeno je da dodatak surfaktanta, natrijum-laurilsulfata ima negativan uticaj na simetriju pika i da ne dovodi do poboljšanja selektivnosti metode [81–83].

Određivanje sadržaja perindoprila u farmaceutskim preparatima vršeno je metodom gasne hromatografije uz derivatizaciju sa pentafluorobenzil-bromidom čime je polaran i neisparljiv molekul perindoprila preveden u derivat pogodan za analizu tehnikom gasne hromatografije uz plameno–jonizacioni detektor [84]. Isti postupak derivatizacije korišćen je i za istovremenu analizu više predstavnike grupe inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima: kaptoprila, benazeprila, ramiprila, enalaprila, perindoprila i njihovih aktivnih metabolita: benazeprilata, ramiprilata, enalaprilata i perindoprilata. Hromatografsko razdvajanje postignuto je primenom staklene kolone punjene metilsilikonskom tečnošću, dimenzija 30 m × 0,252 mm termostahirane na 295 °C, uz helijum kao gas nosač i detekciju uz detektor na bazi zahvata elektrona (eng. *Electron–Capture Detector*) [85].

Za određivanje perindoprila i njegovog aktivnog metabolita u biološkim tečnostima razvijene su metode gasne hromatografije uz detekciju masenom spektrometrijom, kao i metoda radioimuno određivanja [86, 87].

Sadržaj perindopril *t*-butilamina i indapamida u tabletama određen je metodom hromatografije na tankom sloju pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Thin Layer Chromatography* – HPTLC). Hromatografsko razdvajanje dve aktivne supstance vršeno je na pločama prevučeni silikagelom 60 F₂₅₄ uz mobilnu fazu sastava: dihlormetan – metanol–glacijalna sirćetna kiselina (9,5 : 0,5 : 0,1 V/V/V). Kvantitativna analiza vršena je denzitometrijski na 215 nm [88].

Za određivanje sadržaja perindopril erbumina [89], kao i kombinacije perindoprila sa indapamidom [90], odnosno losartan kalijumom [91,92] u doziranim oblicima, postavljene

su i validirane metode reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (RP-HPLC) uz izokratsko eluiranje.

Opisana je i optimizirana RP-HPLC metoda za kvantitativnu analizu perindopрила i indapamida, odnosno perindorpila i kaptopрила u farmaceutskim preparatima, uz hidrohloriazid kao interni standard. Razdvajanje ispitivanih komponenti vršeno je na cijanopropil koloni dimenzija 250 mm × 4,6 mm, veličine čestica 5 μm, uz mobilnu fazu koja je predstavljala smešu 10 mmol L⁻¹ fosfatnog pufera i metanola u odnosu 55 : 45 V/V, čiji je pH podešen na 6,0 [93].

Studije forsirane degradacije sprovedene su u cilju postavljanja RP-HPLC *stability indicating* metode za kvantitativnu analizu perindopрила i indapamida u farmaceutski doziranim oblicima. Razdvajanje ispitivanih komponenti i njihovih nečistoća vršeno je na XTerra[®] RP₁₈ koloni dimenzija 150 mm × 4,6 mm, veličine čestica 5 μm, uz mobilnu fazu koja je predstavljala smešu 5 mmol L⁻¹ fosfatnog pufera i acetonitrila u odnosu 75 : 25 V/V [94].

2. CILJ

Cilj doktorske disertacije bio je da se:

1. uz hemometrijsku podršku proceni hromatografsko ponašanje perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u hromatografskim sistemima sa reverzno-faznim i mikroemulzionim eluentima;
2. primenom multikriterijumskog pristupa, uz primenu *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora, postave optimalni hromatografski uslovi za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina primenom RP-HPLC metode i metode mikroemulzione tečne hromatografije;
3. kao konačna potvrda pogodnosti postavljene i optimizirane RP-HPLC metode i metode mikroemulzione tečne hromatografije za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina izvrši procena robusnosti primenom *Plackett-Burman* dizajna;
4. kroz validaciju metode izvrši dodatna potvrda pouzdanosti primene postavljene RP-HPLC metode i metode mikroemulzione tečne hromatografije za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina;
5. postavljena RP-HPLC metoda i metode mikroemulzione tečne hromatografije primeni za analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u farmaceutskim doziranim oblicima.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. APARATI, REAGENSI I MATEMATIČKO-SOFTVERSKI SISTEM

Hromatograf: Hewlett Packard 1100 series, *Agilent Technologies*, Nemačka

Binarna pumpa: Agilent 1100 Series

Degaser: Agilent 1100 Series

Detektor: Diode array detector (DAD), Agilent 1100 Series

Integrator: Agilent ChemStation Software Rev.A.10.01.

Termostat za kolonu: Agilent 1100 Series

Termostatirani autosampler: Agilent 1100 Series

Analitička vaga: Mettler, tip XP-205 TDR KL (I) (*Mettler-Toledo AG*, Švajcarska)

pH-metar sa kombinovanom staklenom elektrodom: Metrohm tip 780 (*Metrohm*, Švajcarska)

Sistem za prečišćavanje vode: EasyPure RF (*Barnstead*, SAD)

Ultrazvučno kupatilo: tip USK (*EI Niš*, Srbija)

Centrifuga: SIGMA 2-16 (*Sartorius*, Nemačka)

Hromatograf: *Waters Breeze*, SAD

Binarna pumpa: *Waters 1525 Binary HPLC Pump*, SAD

Detektor: *Waters 2487 UV/VIS detector*

Termostat za kolonu: HP 1100 model G 1316 A

Integrator: *Breeze Software data collection*, Windows XP

Mikrolitarski špric od 100 µL, *SGE Australia Pty. Ltd.*, Australija

Sistem za filtriranje: Whatman 47 mm Glass/mesh membranski nosač i membranski filtri 0,45 µm, *Whatman International Ltd.*, Engleska

Analitička vaga: *Sartorius, Sartorius Werke GmbH*, Nemačka

pH-metar sa kombinovanom pH elektrodom, *Dolmen*, Holandija

Ultrazvučno kupatilo: *Fungilab*, Španija

Acetonitril – HPLC grade, *Sigma-Aldrich*, Nemačka

Koncentrovana ortofosfatna kiselina p. a., *Carlo Erba*, Italija

Kalijum-dihidrogenfosfat, *Reanal*, Mađarska

Etilacetat – HPLC grade, *Fluka*, Švajcarska

Butilacetat – HPLC grade, *Fluka*, Švajcarska

Natrijum-laurilsulfat (SDS), *Sigma*, SAD

n-butanol – HPLC grade, *Riedel-deHäen*, Nemačka

Matematičko–softverski sistem koji se koristi za analizu rezultata i podataka generisanih upotrebom navedenih metodologija kao i procena *desirability* funkcija je Design–Expert® 7.0.0. (Stat–Ease Inc., Minneapolis).

3.2. STANDARDNE SUPSTANCE I FARMACEUTSKI DOZIRANI OBLICI

3.2.1. Standardne supstance

- Perindopril *t*-butilamin, radni standard, *Les Laboratories Servier*, Francuska
- Nečistoće: perindoprilat; Y31; Y32 i Y33, radni standardi, *Les Laboratories Servier*, Francuska
- Perindopril *t*-butilamin, hemijski referentni standard, Evropski Direktorat za kvalitet lekova i brigu o zdravlju (European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare), Council of Europe, Strasbourg, Francuska

3.2.2. Farmaceutski dozirani oblik

- Prexanil® tablete, (jedna tableta sadrži 4 mg perindopril *t*-butilamina), *Les Laboratories Servier*, Francuska

3.2.3. Specifikacijski zahtevi proizvođača

- Perindopril *t*-butilamin 3,6 – 4,2 mg/tabl (90 % – 105 %)
- Perindoprilat najviše 2 %
- Nečistoća Y31 najviše 2 %

- Nečistoća Y32 najviše 1 %
- Nečistoća Y33 najviše 1 %
- Ostale nečistoće, pojedinačno najviše 0,25 %

3.3. SUPSTANCE ZA PROCENU SELEKTIVNOSTI METODE

- Laktoza monohidrat, *p.a.*
- Celuloza, mikrokristalna, *p.a.*
- Magnezijum-stearat, *p.a.*
- Silicijum-dioksid, koloidni, bezvodni, *p.a.*

3.4. OPTIMIZACIJA RP–HPLC METODE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA PRIMENOM MULTIKRITERIJUMSKOG PRISTUPA

3.4.1. Priprema rastvora za optimizaciju RP–HPLC metode

Preliminarnim ispitivanjima, pod istim hromatografskim uslovima, otkriveno je na istom retencionom vremenu prisustvo nepoznate nečistoće, kako analizom rastvora uzorka tako, i analizom rastvora standarda perindopril *t*-butilamina. Kako bi se omogućilo praćenje hromatografskog ponašanja i navedene nepoznate nečistoće, odlučeno je da se za optimizaciju RP–HPLC metode koristi rastvor uzorka.

Izmereno je i sprašeno 20 tableta. Odmerena je ona količina tabletne mase koja sadrži 50 mg perindopril *t*-butilamina i preneti u odmerni sud od 50 mL. Dodato je oko 30 mL rastvarača (acetonitril–voda (40:60 V/V)) i ekstrahovano 20 minuta na ultrazvučnom kupatilu, a zatim 20 minuta na mehaničkoj mešalici. Odmerni sud je dopunjen rastvaračem do oznake. Nakon centrifugiranja i dodavanja odgovarajućih količina standarda nečistoća, supernatant je korišćen za izradu rastvora sledećih koncentracija:

- perindopril *t*-butilamina – 0,40 mg mL⁻¹
- perindoprilat – 8,00 µg mL⁻¹
- nečistoća Y31 – 8,00 µg mL⁻¹

- nečistoća Y32 – 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y33 – 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.4.2. Hromatografski uslovi

<i>Hromatografski sistem</i>	Hewlett Packard 1100 Series, <i>Agilent Technologies</i> , Nemačka
<i>Kolona</i>	YMC–Pack C8, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm
<i>Mobilna faza</i>	Acetonitril–50 mmol L^{-1} rastvor kalijum-dihidrogenfosfata
<i>Talasna dužina</i>	215 nm
<i>Injekciona zapremina</i>	50 μL
<i>Rastvarač</i>	acetonitril–voda (40 : 60 V/V)

3.4.3. Eksperimentalni uslovi za izvođenje centralnog kompozicionog dizajna

Faktori i njihovi nivoi prikazani su u tabeli 6, a matrica za izvođenje eksperimenata u tabeli 7.

Tabela 6. Faktori i njihovi nivoi

Faktori	(–1)	(+1)	(0)	α (– 0,5)	α (+ 0,5)
x_1 Acetonitril (V/V %)	32	40	36	34	38
x_2 pH mobilne faze	2	4	3	2,5	3,5
x_3 Temperatura kolone ($^{\circ}\text{C}$)	40	60	50	45	55
x_4 Brzina protoka mobilne faze (mL min^{-1})	1,4	2,0	1,7	1,55	1,85

Tabela 7. Matrica eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn

№	Faktori i faktorski nivoi			
	x_1	x_2	x_3	x_4
1	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)
2	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)
3	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)
4	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)
5	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)
6	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)
7	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)
8	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)
9	(-1)	(-1)	(-1)	(+1)
10	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)
11	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)
12	(+1)	(+1)	(-1)	(+1)
13	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)
14	(+1)	(-1)	(+1)	(+1)
15	(-1)	(+1)	(+1)	(+1)
16	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)
17	(-0,5)	(0)	(0)	(0)
18	(+0,5)	(0)	(0)	(0)
19	(0)	(-0,5)	(0)	(0)
20	(0)	(+0,5)	(0)	(0)
21	(0)	(0)	(-0,5)	(0)
22	(0)	(0)	(+0,5)	(0)
23	(0)	(0)	(0)	(-0,5)
24	(0)	(0)	(0)	(+0,5)
25	(0)	(0)	(0)	(0)
26	(0)	(0)	(0)	(0)
27	(0)	(0)	(0)	(0)
28	(0)	(0)	(0)	(0)

Prema navedenom planu eksperimenata podešeni su hromatografski uslovi pod kojim je injektovan rastvor za optimizaciju RP–HPLC metode opisan pod tačkom 3.4.1 . Iz dobijenih hromatograma izračunate su vrednosti za retencione faktore perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}), odnosno faktora rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{Y32/Y33}$). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 14. Na osnovu dobijenih vrednosti za retencione faktore perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}), odnosno faktora rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{Y32/Y33}$), izračunati su koeficijenti kvadratnog modela koji su prikazani u tabeli 15. Rezultati su dalje obrađeni primenom MCDM pristupa.

3.5. PROCENA ROBUSNOSTI RP–HPLC METODE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA PRIMENOM *PLACKETT–BURMAN* DIZAJNA

3.5.1. Priprema rastvora za procenu robusnosti RP–HPLC metode

Pripremljeni su rastvori standardnih supstanci u rastvaraču: perindopril *t*-butilamin – rastvor a_S , koncentracije $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$; perindoprilat – rastvor a_p , koncentracije $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; nečistoća Y31 – rastvor a_{Y31} , koncentracije $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; nečistoća Y32 – rastvor a_{Y32} , koncentracije $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoća Y33 – rastvor a_{Y33} , koncentracije $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Od rastvora a_S , a_p , a_{Y31} , a_{Y32} i a_{Y33} pripremljena je smeša rastvora: perindopril *t*-butilamin $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$, perindoprilat $8,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, nečistoća Y31 $8,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, nečistoća Y32 $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoća Y33 $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5.2. Hromatografski uslovi

<i>Hromatografski sistem</i>	Hewlett Packard 1100 Series, <i>Agilent Technologies</i> , Nemačka
<i>Kolona</i>	YMC–Pack C8, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm Zorbax–SB C8, 250 mm x 4,6 mm, 5 μm
<i>Mobilna faza</i>	acetonitril– rastvor kalijum-dihidrogenfosfata
<i>Injekciona zapremina</i>	50 μL
<i>Rastvarač</i>	acetonitril–voda (40 : 60 V/V)

3.5.3. Eksperimentalni uslovi

Eksperimentalni uslovi definisani su *Plackett–Burman* dizajnom. Faktorski nivoi ("niži"(-), "viši" (+) i "nominalni" (0)) prikazani su su tabeli 8, a plan eksperimenata u tabeli 9.

Tabela 8. Faktori i njihovi nivoi

Ispitivani faktor	Niži nivo (-1)	Nominalni nivo (0)	Viši nivo (+1)
Kolona	Zorbax-SB C8*	YMC-Pack C8*	YMC-Pack C8*
Temperatura (°C)	45	50	55
Acetonitril (V/V %)	36	37	38
Rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L ⁻¹)	45	50	55
pH mobilne faze	2,3	2,5	2,7
Protok (mL min ⁻¹)	1,6	1,7	1,8
Talasna dužina (nm)	214	215	216
<i>Dummy 1</i>	-1	0	+1
<i>Dummy 2</i>	-1	0	+1
<i>Dummy 3</i>	-1	0	+1
<i>Dummy 4</i>	-1	0	+1

*4,6 mm × 250 mm, 5 μm

3.5.4. Plan eksperimenta

Plan eksperimenta definisan je primenom softvera Design Expert 7.0 i dvanaest eksperimenata je prikazano u tabeli 9.

Tabela 9. Plan *Plackett–Burman* dizajna

Broj eksperimenta	Faktori* i faktorski nivoi										
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
4	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
5	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
6	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
8	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
10	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1
11	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1

*A–hromatografska kolona; B–*dummy* 1; C–temperatura (°C); D–acetonitril (V/V %); E–koncentracija rastvora kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L⁻¹); F– *dummy* 2; G–pH mobilne faze; H– *dummy* 3; J–protok (mL min⁻¹); K–talasna dužina (nm); L– *dummy* 4

Prema planu eksperimenata u tabeli 9 podešeni su hromatografski uslovi pod kojim je injektovan rastvor za procenu robusnosti RP–HPLC metode opisan pod tačkom 3.5.1. Iz dobijenih hromatograma izračunati su sledeći odgovori sistema: k_1 – retencioni faktor perindoprilata, k_2 – retencioni faktor perindopril *t*-butlamina, k_3 – retencioni faktor nepoznate nečistoće, k_4 – retencioni faktor nečistoće Y32, k_5 – retencioni faktor nečistoće Y33, k_6 – retencioni faktor nečistoće Y31; Sy_1 – faktor simetrije perindoprilata, Sy_2 – faktor simetrije perindopril *t*-butlamina, Sy_3 – faktor simetrije nepoznate nečistoće, Sy_4 – faktor simetrije nečistoće Y32, Sy_5 – faktor simetrije nečistoće Y33, Sy_6 – faktor simetrije nečistoće Y31; R_1 – faktor rezolucije između perindopril *t*-butlamina i perindoprilata, R_2 – faktor rezolucije između perindoprilata i nepoznate nečistoće, R_3 – faktor rezolucije između nepoznate nečistoće i nečistoće Y32, R_4 – faktor rezolucije između nečistoće Y32 i nečistoće Y33, R_5 – faktor rezolucije između nečistoće Y33 i nečistoće Y31; α_1 – faktor selektivnosti između perindopril *t*-butlamina i perindoprilata, α_2 – faktor selektivnosti između perindoprilata i nepoznate nečistoće, α_3 – selektivnost između nepoznate nečistoće i nečistoće Y32, α_4 – faktor selektivnosti između nečistoće Y32 i nečistoće Y33, α_5 – faktor selektivnosti između nečistoće Y33 i nečistoće Y31; A_1 – površina pika perindoprilata, A_2 –

površina pika perindopril *t*-butilamina, A_3 – površina pika nepoznate nečistoće, A_4 – površina pika nečistoće Y32, A_5 – površina pika nečistoće Y33, A_6 – površina pika nečistoće Y31 i prikazani u tabeli 20. Statističkom analizom izračunati su efekti faktora i prikazani u tabeli 21. Za značajne faktore izračunati su intervali neznačajnosti i rezultati prikazani u tabeli 23. Na kraju, određeni su SST limiti i prikazani tabelarno.

3.6. VALIDACIJA RP–HPLC METODE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA U DOZIRANIM OBLICIMA

3.6.1. Priprema rastvora za procenu selektivnosti metode

Za procenu selektivnosti RP–HPLC metode, pripremljena je *placebo* smeša u rastvaraču, koju su sačinjavale laktoza monohidrat, mikrokristalna celuloza, magnezijum-stearat i koloidni bezvodni silicijum-dioksid u koncentracijama koje su odgovarale njihovim sadržajima u ispitivanim tabletama.

Placebo smeša je tretirana na isti način kao i tabletna masa za izradu rastvora uzorka (v. poglavlje 3.6.6).

Laboratorijska smeša sastava: perindopril *t*-butilamin $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$, perindoprilat $8,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, nečistoća Y31 $8,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, nečistoća Y32 $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoća Y33 $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, korišćena je za procenu selektivnosti metode.

3.6.2. Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode

Za procenu linearnosti metode analiziran je odnos površina pikova rastvora ispitivanih supstanci u zavisnosti od njihove koncentracije. Kalibracione krive konstruisane su metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka dobijena je kao rezultat tri injektovanja odgovarajućih rastvora.

3.6.2.1. Priprema rastvora standarda perindopril *t*-butilamina

Pripremljen je rastvor standardne supstance perindopril *t*-butilamina u rastvaraču, rastvor a_s , koncentracije $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Od rastvora a_s pripremljeni su u rastvaraču rastvori perindopril *t*-butilamina sledećih koncentracija: $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,60 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,80 \text{ mg mL}^{-1}$ i $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 26.

3.6.2.2. Priprema rastvora standarda perindoprilata

Pripremljen je rastvor standardne supstance perindoprilata u rastvaraču, rastvor a_p , koncentracije $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_s pripremljeni su rastvori perindoprilata sledećih koncentracija: $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $12,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $16,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $20,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 26.

3.6.2.3. Priprema rastvora standarda nečistoće Y31

Pripremljen je rastvor standardne supstance nečistoće Y31 u rastvaraču, rastvor a_{Y31} , koncentracije $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_s pripremljeni su rastvori nečistoće Y31 sledećih koncentracija: $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $12,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $16,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $20,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 26.

3.6.2.4. Priprema rastvora standarda nečistoće Y32

Pripremljen je rastvor standardne supstance nečistoće Y32 u rastvaraču, rastvor a_{Y32} , koncentracije $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_s pripremljeni su rastvori nečistoće Y32 sledećih koncentracija: $0,10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $6,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $10,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 26.

3.6.2.5. Priprema rastvora standarda nečistoće Y33

Pripremljen je rastvor standardne supstance nečistoće Y33 u rastvaraču, rastvor a_{Y33} , koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_S pripremljeni su rastvori nečistoće Y33 sledećih koncentracija: $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 26.

3.6.3. Priprema rastvora standarda za procenu preciznosti metode

Preciznost RP–HPLC metode procenjena je određivanjem perindopril *t*-butilamina i njegove četiri nečistoće u standardnim rastvorima odgovarajućih koncentracija. Pripremljene su tri serije po deset standardnih rastvora, različitih koncentracija i izračunati odgovarajući statistički parametri.

3.6.3.1. Priprema rastvora standarda perindopril *t*-butilamina

Od rastvora a_S (v. poglavlje 3.6.2.1) pripremljeni su rastvori perindopril *t*-butilamina sledećih koncentracija: $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$ i $0,60 \text{ mg mL}^{-1}$.

Rezultati za procenu preciznosti prikazani su u tabeli 27.

3.6.3.2. Priprema rastvora standarda perindoprilata

Od rastvora a_P (v. poglavlje 3.6.2.2) pripremljeni su rastvori perindoprilata sledećih koncentracija: $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $12,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati za procenu preciznosti prikazani su u tabeli 27.

3.6.3.3. Priprema rastvora standarda nečistoće Y31

Od rastvora a_{Y31} (v. poglavlje 3.6.2.3) pripremljeni su rastvori nečistoće Y31 sledećih koncentracija: $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $12,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati za procenu preciznosti prikazani su u tabeli 27.

3.6.3.4. Priprema rastvora standarda nečistoće Y32

Od rastvora a_{Y32} (v. poglavlje 3.6.2.4) u rastvaraču pripremljeni su rastvori nečistoće Y32 sledećih koncentracija: $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati za procenu preciznosti prikazani su u tabeli 27.

3.6.3.5. Priprema rastvora standarda nečistoće Y33

Od rastvora a_{Y33} (v. poglavlje 3.6.2.5) pripremljeni su rastvori nečistoće Y33 sledećih koncentracija: $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati za procenu preciznosti prikazani su u tabeli 27.

3.6.4. Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode

Tačnost RP–HPLC metode procenjena je određivanjem perindopril *t*-butilamina i njegove četiri nečistoće u rastvorima laboratorijske smeše čiji sastav su, pored navedenih ispitivanih supstanci, sačinjavale i komponente *placeba* u koncentracijama koje su odgovarale njihovim sadržajima u ispitivanim tabletama. Laboratorijska smeša je tretirana na isti način kao i tabletna masa za izradu rastvora uzorka (v. poglavlje 3.6.6). Pripremljene su tri serije razblaženja laboratorijske smeše sa koncentracijama ispitivanih komponenti koje su odgovarale koncentracijama rastvora uzorka od 80 %, 100 % i 120 %. Za svaku seriju razblaženja pripremljeno je po pet rastvora i izračunati su odgovarajući statistički parametri.

3.6.4.1. Laboratorijska smeša 1 (80 %)

- perindopril *t*-butilamin – $0,32 \text{ mg mL}^{-1}$
- perindoprilat – $6,40 \mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y31 – $6,40 \mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y32 – $3,20 \mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y33 – $3,20 \mu\text{g mL}^{-1}$

3.6.4.2. Laboratorijska smeša 2 (100 %)

- perindopril *t*-butilamin – $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$

- perindoprilat – 8,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y31 – 8,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y32 – 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y33 – 4,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$

3.6.4.3. Laboratorijska smeša 3 (120 %)

- perindopril *t*-butilamin – 0,48 mg mL^{-1}
- perindoprilat – 9,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y31 – 9,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y32 – 4,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$
- nečistoća Y33 – 4,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Rezultati za procenu tačnosti metode prikazani su u tabeli 28.

3.6.5. Određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije

Vrednosti limita kvantifikacije (LOQ) i limita detekcije (LOD) određene su eksperimentalno, sa odgovarajućim razblaženjima osnovnih rastvora standarda ispitivanih komponenti. U tabeli 29 prikazane su vrednosti LOQ i LOD.

3.6.5.1. Priprema rastvora za određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije

3.6.5.1.1. Perindopril *t*-butilamin

Od rastvora a_s (v. poglavlje 3.6.2.1) pripremljeni su rastvori perindopril *t*-butilamina sledećih koncentracija: 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6.5.1.2. Perindoprilat

Od rastvora a_p (v. poglavlje 3.6.2.2) pripremljeni su rastvori perindoprilata sledećih koncentracija: 50,0 ng mL^{-1} ; 30,0 ng mL^{-1} ; 10,0 ng mL^{-1} i 5,0 ng mL^{-1} .

3.6.5.1.3. Nečistoća Y31

Od rastvora a_{Y31} (v. poglavlje 3.6.2.3) pripremljeni su rastvori nečistoće Y31 sledećih koncentracija: 300,0 ng mL⁻¹; 150,0 ng mL⁻¹; 50,0 ng mL⁻¹ i 30,0 ng mL⁻¹.

3.6.5.1.4. Nečistoća Y32

Od rastvora a_{Y32} (v. poglavlje 3.6.2.4) pripremljeni su rastvori nečistoće Y32 sledećih koncentracija: 90,0 ng mL⁻¹; 60,0 ng mL⁻¹; 30,0 ng mL⁻¹ i 10,0 ng mL⁻¹.

3.6.5.1.5. Nečistoća Y33

Od rastvora a_{Y33} (v. poglavlje 3.6.2.5) pripremljeni su rastvori nečistoće Y33 sledećih koncentracija: 50,0 ng mL⁻¹; 30,0 ng mL⁻¹; 10,0 ng mL⁻¹ i 5,0 ng mL⁻¹.

3.6.6. Priprema rastvora uzorka tableta

Izmereno je i sprašeno 20 tableta. Odmerena je ona količina tabletne mase koja sadrži 50 mg perindopril *t*-butilamina i preneti u odmerni sud od 50 mL. Dodato je oko 30 mL rastvarača i ekstrahovano 20 minuta na ultrazvučnom kupatilu, a zatim 20 minuta na mehaničkoj mešalici. Odmerni sud je dopunjen rastvaračem do oznake. Nakon centrifugiranja supernatant je korišćen za izradu serije od deset rastvora koji sadrže 0,4 mg mL⁻¹ perindopril *t*-butilamina.

U tabeli 30 prikazani su rezultati kvantitativne analize perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u ispitivanim tabletama.

3.6.7. Hromatografska analiza

3.6.7.1. Hromatografski uslovi

<i>Hromatografski sistem</i>	Hewlett Packard 1100 Series, Agilent Technologies, Nemačka
<i>Kolona</i>	YMC-Pack C8, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm

<i>Mobilna faza</i>	Acetonitril–50 mmol L ⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (37 : 63 V/V)
<i>pH mobilne faze</i>	2,50
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Talaska dužina</i>	215 nm
<i>Protok</i>	1,7 mL min ⁻¹
<i>Injekciona zapremina</i>	50 µL
<i>Rastvarač</i>	acetonitril–voda (40 : 60 V/V)

3.6.7.2. Postupak

HPLC sistem, koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiranjem kolone mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije hromatograma. Podešenost sistema proverena je ponovljenim injektovanjem rastvora standarda do postizanja ujednačenosti površina hromatografskih pikova ispitivanih supstanci, za tri uzastopna injektovanja.

3.7. OPTIMIZACIJA METODE MIKROEMULZIONE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*- BUTILAMINA PRIMENOM MULTIKRITERIJUMSKOG PRISTUPA

3.7.1. Priprema rastvora za optimizaciju MELC metode

Preliminarnim ispitivanjima, pod istim hromatografskim uslovima, otkriveno je na istom retencionom vremenu prisustvo nepoznate nečistoće kako analizom rastvora uzorka tako i analizom rastvora standarda perindopril *t*-butilamina. Kako bi se omogućilo praćenje hromatografskog ponašanja i navedene nepoznate nečistoće, odlučeno je da se za optimizaciju metode mikroemulzione tečne hromatografije (eng. *Microemulsion Liquid Chromatography* – MELC) metode koristi rastvor uzorka.

Izmereno je i sprašeno 20 tableta. Odmerena je ona količina tabletna mase koja sadrži 40 mg perindopril *t*-butilamina i preneti u odmerni sud od 50 mL. Dodato je oko 30 mL mobilne faze (0,24 % m/v butilacetat, 0,30 % m/v etilacetat, 2 % m/v natrijum-laurilsulfat

(SDS), 7,75 % m/v *n*-butanol i 20 mmol L⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata, čiji je pH podešen na 3,70 koncentrovanom *orto*-fosfatnom kiselinom) i ekstrahovano 15 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake. Nakon filtriranja korišćenjem *Whatman* filter papira, daljim razblaženjima u mobilnoj fazi i dodavanjem odgovarajućih količina standarda nečistoća pripremljen je rastvor sa koncentracijama ispitivanih komponenti:

- perindopril *t*-butilamina – 0,40 mg mL⁻¹
- perindoprilat – 8,00 µg mL⁻¹
- nečistoća Y31 – 8,00 µg mL⁻¹
- nečistoća Y32 – 4,00 µg mL⁻¹
- nečistoća Y33 – 4,00 µg mL⁻¹

3.7.2. Hromatografski uslovi

<i>Hromatografski sistem</i>	Waters Breeze, SAD
<i>Kolona</i>	Nucleosil 120–5 C ₄ , 250 mm x 4,0 mm, 5 µm
<i>Mobilna faza</i>	butilacetat–etilacetat–SDS– <i>n</i> -butanol–20 mmol L ⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata
<i>Injekciona zapremina</i>	20 µL
<i>Temperatura</i>	40 °C
<i>Talasna dužina</i>	254 nm
<i>Rastvarač</i>	mobilna faza (v. poglavlje 3.7.1.1.)
<i>Protok</i>	1,25 mL min ⁻¹

3.7.3. Eksperimentalni uslovi za izvođenje centralnog kompozicionog dizajna

Faktori i njihovi nivoi prikazani su u tabeli 10, a matrica za izvođenje eksperimenata u tabeli 11.

Tabela 10. Faktori i njihovi nivoi

Faktori	(-1)	(+1)	(0)	$\alpha = -0,5$	$\alpha = +0,5$
x_1 Butilacetat (% m/V)	0,1	0,3	0,2	0,15	0,25
x_2 Etilacetat (% m/V)	0,3	0,7	0,5	0,4	0,6
x_3 SDS (% m/V)	1,5	2,5	2,0	1,75	2,25
x_4 <i>n</i> -butanol (% m/V)	5,0	9,0	7,0	6,0	8,0
x_5 pH mobilne faze	3,70	5,70	4,70	4,20	5,20

Tabela 11. Matrica eksperimenata za centralni kompozicioni dizajn

№	Faktori i faktorski nivoi				
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5
1	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)	(+1)
2	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)	(-1)
3	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)	(-1)
4	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)
5	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)	(-1)
6	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)
7	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)	(+1)
8	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)	(-1)
9	(-1)	(-1)	(-1)	(+1)	(-1)
10	(+1)	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)
11	(-1)	(+1)	(-1)	(+1)	(+1)
12	(+1)	(+1)	(-1)	(+1)	(-1)
13	(-1)	(-1)	(+1)	(+1)	(+1)
14	(+1)	(-1)	(+1)	(+1)	(-1)
15	(-1)	(+1)	(+1)	(+1)	(-1)
16	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)	(+1)
17	(-0,5)	(0)	(0)	(0)	(0)
18	(+0,5)	(0)	(0)	(0)	(0)
19	(0)	(-0,5)	(0)	(0)	(0)
20	(0)	(+0,5)	(0)	(0)	(0)
21	(0)	(0)	(-0,5)	(0)	(0)
22	(0)	(0)	(+0,5)	(0)	(0)
23	(0)	(0)	(0)	(-0,5)	(0)
24	(0)	(0)	(0)	(+0,5)	(0)
25	(0)	(0)	(0)	(0)	(-0,5)
26	(0)	(0)	(0)	(0)	(+0,5)
27	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
28	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
29	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
30	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

Prema navedenom planu eksperimenata podešeni su hromatografski uslovi pod kojim je injektovan rastvor za optimizaciju MELC metode opisan pod tačkom 3.7.1. Iz dobijenih hromatograma izračunate su vrednosti za retencione faktore perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}), odnosno faktora rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{\text{Y32/Y33}}$). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 31. Dobijene vrednosti za retencione faktore perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}), odnosno faktora rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{\text{Y32/Y33}}$), obrađene su primenom softvera Design Expert 7.0. Softver je za različite odgovore sistema predložio kao optimalne različite modele: za retencione faktore perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}) kao optimalan predložen je kvadratni model, dok je za faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{\text{Y32/Y33}}$) predložen polinomijalni model drugog reda. Koeficijenti su prikazani u tabelama 32 i 33. Rezultati su dalje obrađeni primenom MCDM pristupa.

3.8. PROCENA ROBUSNOSTI METODE MIKROEMULZIONE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA PRIMENOM *PLACKETT*–*BURMAN* DIZAJNA

3.8.1. Priprema rastvora za procenu robusnosti MELC metode

Za procenu robusnosti MELC metode korišćen je rastvor uzorka pripremljen na način kao rastvor za optimizaciju MELC metode (v. poglavlje 3.7.1).

3.8.2. Hromatografski uslovi

<i>Hromatografski sistem</i>	Waters Breeze, SAD
<i>Kolona</i>	Nucleosil 120–5 C ₄ , 250 mm x 4,0 mm, 5 μm
<i>Mobilna faza</i>	butilacetat–etilacetat–SDS– <i>n</i> -butanol–20 mmol L ⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata
<i>Injekciona zapremina</i>	20 μL

Talasna dužina 254 nm
 Rastvarač mobilna faza

3.8.3. Eksperimentalni uslovi

Eksperimentalni uslovi definisani su *Plackett–Burman* dizajnom. Faktorski nivoi ("niži"(-), "viši" (+) i "nominalni" (0)) prikazani su su tabeli 12.

Tabela 12. Faktori i njihovi nivoi

Ispitivani faktor	Niži nivo (-1)	Nominalni nivo (0)	Viši nivo (+1)
Butilacetat (% m/V)	0,20	0,24	0,28
Etilacetat (% m/V)	0,26	0,30	0,34
<i>Dummy 1</i>	-1	0	+1
SDS (% m/V)	1,9	2,0	2,1
Butanol (% m/V)	7,65	7,75	7,85
<i>Dummy 2</i>	-1	0	+1
Rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L ⁻¹)	19,5	20,0	20,5
pH mobilne faze	3,60	3,70	3,80
<i>Dummy 3</i>	-1	0	+1
Protok (mL min ⁻¹)	1,20	1,25	1,30
Temperatura (°C)	35	40	45

3.8.4. Plan eksperimenta

Plan eksperimenta definisan je primenom softvera Design Expert 7.0 i dvanaest eksperimenata je prikazano u tabeli 13.

Tabela 13. Plan *Plackett–Burman* dizajna

Broj eksperimenta	Faktori* i faktorski nivoi										
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

* A–butilacetat (% m/V); B–etilacetat (% m/V); C–*dummy 1*; D–SDS (% m/V); E–butanol (% m/V); F–*dummy 2*; G–rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L⁻¹); H–pH mobilne faze; J–*dummy 3*; K–protok (mL min⁻¹); L–temperatura (°C)

3.9. VALIDACIJA METODE MIKROEMULZIONE TEČNE HROMATOGRAFIJE ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA U DOZIRANIM OBLICIMA

3.9.1. Priprema rastvora za procenu selektivnosti metode

Za procenu selektivnosti MELC metode, pripremljena je *placebo* smeša u mobilnoj fazi: laktoza monohidrat, mikrokristalna celuloza, magnezijum-stearat i koloidni bezvodni silicijum-dioksid u odnosima koncentracija koje su odgovarale njihovim sadržajima u ispitivanim tabletama. *Placebo* smeša tretirana je na isti način kao i tabletna masa za izradu rastvora uzorka (v. poglavlje 3.9.6).

Laboratorijska smeša sastava: perindopril *t*-butilamin $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$, perindoprilat $8,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, nečistoća Y31 $8,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, nečistoća Y32 $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoća Y33 $4,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, korišćena je za procenu selektivnosti metode.

3.9.2. Priprema rastvora standarda za procenu linearnosti metode

Za procenu linearnosti metode analiziran je odnos površina pikova rastvora ispitivanih supstanci u zavisnosti od koncentracija. Kalibracione krive konstruisane su metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka dobijena je kao rezultat tri injektovanja odgovarajućih rastvora.

3.9.2.1. Priprema rastvora standarda perindopril *t*-butilamina

Pripremljen je rastvor standardne supstance perindopril *t*-butilamina u mobilnoj fazi, rastvor a_S , koncentracije $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Od rastvora a_S pripremljeni su rastvori perindopril *t*-butilamina sledećih koncentracija: $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,60 \text{ mg mL}^{-1}$; $0,80 \text{ mg mL}^{-1}$ i $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 45.

3.9.2.2. Priprema rastvora standarda perindoprilata

Pripremljen je rastvor standardne supstance perindoprilata u mobilnoj fazi, rastvor a_P , koncentracije $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_S pripremljeni su rastvori perindoprilata sledećih koncentracija: $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $12,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $16,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $20,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 45.

3.9.2.3. Priprema rastvora standarda nečistoće Y31

Pripremljen je rastvor standardne supstance nečistoće Y31 u mobilnoj fazi, rastvor a_{Y31} , koncentracije $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_S pripremljeni su rastvori nečistoće Y31 sledećih koncentracija: $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $12,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $16,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ i $20,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 45.

3.9.2.4. Priprema rastvora standarda nečistoće Y32

Pripremljen je rastvor standardne supstance nečistoće Y32 u mobilnoj fazi, rastvor a_{Y32} , koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_s pripremljeni su rastvori nečistoće Y32 sledećih koncentracija: $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 45.

3.9.2.5. Priprema rastvora standarda nečistoće Y33

Pripremljen je rastvor standardne supstance nečistoće Y33 u mobilnoj fazi, rastvor a_{Y33} , koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Od rastvora a_s pripremljeni su rastvori nečistoće Y33 sledećih koncentracija: $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $2,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Rezultati su prikazani u tabeli 45.

3.9.3. Priprema rastvora za procenu preciznosti metode

Za procenu preciznosti metode mikroemulziona tečne hromatografije pripremljene su tri serije po tri rastvora uzorka, izračunati odgovarajući statistički parametri i rezultati prikazani u tabeli 46.

- (a) Rastvor uzorka (1) sadržao je 80 % deklarisanog, teorijskog sadržaja aktivne supstance perindopril *t*-butilamina – $0,32 \text{ mg mL}^{-1}$
- (b) Rastvor uzorka (2) sadržao je 100 % deklarisanog, teorijskog sadržaja aktivne supstance perindopril *t*-butilamina – $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$
- (c) Rastvor uzorka (3) sadržao je 120 % deklarisanog, teorijskog sadržaja aktivne supstance perindopril *t*-butilamina – $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$

Priprema rastvora uzorka opisana je u poglavlju 3.9.6.

3.9.4. Priprema rastvora standarda za procenu tačnosti metode

Tačnost MELC metode procenjena je određivanjem perindopril *t*-butilamina i njegove četiri nečistoće u rastvorima laboratorijske smeše čiji sastav su, pored navedenih ispitivanih

supstanci, sačinjavale i komponente *placeba* u koncentracijama koje su odgovarale njihovim sadržajima u ispitivanim tabletama. Laboratorijska smeša je tretirana na isti način kao i tabletna masa za izradu rastvora uzorka (v. poglavlje 3.9.6). Pripremljene su tri serije razblaženja laboratorijske smeše sa koncentracijama ispitivanih komponenti koje su odgovarale koncentracijama rastvora uzorka od 80 %, 100 % i 120 %. Za svaku seriju razblaženja pripremljeno je po tri rastvora i izračunati su odgovarajući statistički parametri.

3.9.4.1. Laboratorijska smeša 1 (80 %)

- perindopril *t*-butilamin – 0,32 mg mL⁻¹
- perindoprilat – 6,40 µg mL⁻¹
- nečistoća Y31 – 6,40 µg mL⁻¹
- nečistoća Y32 – 3,20 µg mL⁻¹
- nečistoća Y33 – 3,20 µg mL⁻¹

3.9.4.2. Laboratorijska smeša 2 (100 %)

- perindopril *t*-butilamin – 0,40 mg mL⁻¹
- perindoprilat – 8,00 µg mL⁻¹
- nečistoća Y31 – 8,00 µg mL⁻¹
- nečistoća Y32 – 4,00 µg mL⁻¹
- nečistoća Y33 – 4,00 µg mL⁻¹

3.9.4.3. Laboratorijska smeša 3 (120 %)

- perindopril *t*-butilamin – 0,48 mg mL⁻¹
- perindoprilat – 9,60 µg mL⁻¹
- nečistoća Y31 – 9,60 µg mL⁻¹
- nečistoća Y32 – 4,80 µg mL⁻¹
- nečistoća Y33 – 4,80 µg mL⁻¹

Rezultati za procenu tačnosti metode prikazani su u tabeli 47.

3.9.5. Određivanje limita kvantifikacije i limita detekcije

Vrednosti limita kvantifikacije (LOQ) i limita detekcije (LOD) određene su statistički, uzimajući u obzir odnos signal/šum 3:1 za LOQ i 10:1 za LOD.

U tabeli 48 prikazane su vrednosti LOQ i LOD.

3.9.6. Priprema rastvora uzorka tableta

Izmereno je i sprašeno 20 tableta. Odmerena je ona količina tabletne mase koja sadrži 40 mg perindopril *t*-butilamina i preneti u odmerni sud od 50 mL. Dodato je oko 30 mL mobilne faze i ekstrahovano 15 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Odmerni sud je dopunjen mobilnom fazom do oznake.

Nakon filtriranja korišćenjem *Whatman* filter papira, daljim razblaženjima u mobilnoj fazi pripremljen je rastvor perindopril *t*-butilamina koncentracije 0,40 mg mL⁻¹.

U tabeli 49 prikazani su rezultati kvantitativne analize perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u ispitivanim tabletama.

3.9.7. Hromatografska analiza

3.9.7.1. Hromatografski uslovi

<i>Hromatografski sistem</i>	Waters Breeze, SAD
<i>Kolona</i>	Nucleosil 120–5 C ₄ , 250 mm x 4,0 mm, 5 μm
<i>Mobilna faza</i>	butilacetat–etilacetat–SDS– <i>n</i> -butanol–20 mmol L ⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata pH 3,70 (0,24 m/V : 0,30 m/V : 2,00 m/V : 7,75 m/V : 20,0 mmol L ⁻¹)
<i>Temperatura</i>	40 °C
<i>Talasna dužina</i>	254 nm
<i>Protok</i>	1,25 mL min ⁻¹
<i>Injekciona zapremina</i>	20 μL
<i>Rastvarač</i>	mobilna faza

3.9.7.2. Postupak

HPLC sistem, koji je podešen prema navedenim hromatografskim uslovima, ispiranjem kolone mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije hromatograma. Podešenost sistema proverena je ponovljenim injektovanjem rastvora standarda do postizanja ujednačenosti površina hromatografskih pikova ispitivanih supstanci, za tri uzastopna injektovanja.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. RP–HPLC METODA ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

4.1.1. OPTIMIZACIJA PRIMENOM MULTIKRITERIJUMSKOG PRISTUPA

Izvedena je serija preliminarnih eksperimenata s ciljem definisanja faktora koji značajno utiču na ponašanje RP–HPLC sistema za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća. Kao adekvatna stacionarna faza odabrana je kolona C₈ dimenzija 250 mm x 4,6 mm i veličine čestica 5 μm (YMC–Pack C8). Imajući u vidu da su sve ispitivane komponente kiseline (izuzev nečistoće Y31), istraživanja su započeta sa mobilnom fazom čiji je vodeni deo sačinjavao fosfatni pufer sa vrednošću pH < 7. Eksperimentima koji su uključivali mobilne faze sa metanolom i acetonitrilom, utvrđeno je da je simetrija pikova ispitivanih komponenti poboljšana ukoliko se kao organski rastavarč koristi acetonitril. Variranjem udela acetonitrila u mobilnoj fazi u opsegu 30 % do 40 % zapažen je značajan uticaj navedenog organskog rastvarača na hromatografsko ponašanje svih ispitivanih komponenti, prvenstveno na faktor rezolucije perindopril *t*-butilamina, nečistoće Y32 i nepoznate nečistoće čiji sadržaj može značajno uticati na kvantifikaciju pika komponente sa kojom koeluiru. Udeo acetonitrila u mobilnoj fazi takođe utiče u značajnoj meri i na retenciono ponašanje nečistoća: perindoprilata i Y31.

Preliminarnim istraživanjima utvrđeno je da koncentracija fosfatnog pufera nema značajan uticaj na hromatografsko ponašanje perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća, tako da je kao vodena faza tokom optimizacije korišćen 50 mmol L⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata. Preliminarnim eksperimentima utvrđeno je da pH mobilne faze i temperatura kolone značajno utiču na retenciono ponašanje i simetriju pika perindoprilata, odnosno simetriju pikova perindoprilata i perindopril *t*-butilamina. Na osnovu preliminarnih ispitivanja zaključeno je da sledeća 4 faktora značajno utiču na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci:

- sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi je od velikog značaja za hromatografsko razdvajanje perindopril *t*-butilamina, nečistoće Y32 i nepoznate nečistoće, kao i na retenciono ponašanje nečistoća perindoprilata i Y31
- pH mobilne faze je od značaja za retenciono ponašanje i simetriju pika perindoprilata
- temperatura je od značaja za simetriju pikova perindoprilata i perindopril *t*-butilamina
- brzina protoka mobilne faze je od značaja za vreme trajanja analize, kao i simetriju pikova ispitivanih komponenti

Uticaj četiri izabrana faktora (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH mobilne faze, temperatura kolone i brzina protoka mobilne faze) na posmatrani hromatografski sistem ispitan je primenom eksperimentalnog dizajna.

Kao odgovori sistema koji značajno karakterišu kvalitet hromatografske analize, a koje je potrebno istovremeno optimizirati, odabrani su retencioni faktor perindoprilata – k_{PLAT} , faktor rezolucije između nečistoća Y32 i Y33 – $R_{\text{Y32/Y33}}$ i retencioni faktor nečistoće Y31 – k_{Y31} . Naime, cilj optimizacije RP–HPLC metode bio je da se postigne odgovarajuće razdvajanje kritičnog para pikova, odnosno da vrednost faktora rezolucije $R_{\text{Y32/Y33}}$ bude veća od 1,5, a da pri tome analiza ne traje predugo, odnosno da retencioni faktor k_{Y31} komponente koja se poslednja eluira (nečistoća Y₃₁) ima što manju vrednost. Takođe, optimizacijom metode potrebno je obezbediti odgovarajuće retenciono ponašanje perindoprilata, komponente koja se prva eluira, odnosno obezbediti da vrednost k_{PLAT} bude što veća.

Sledeća faza ispitivanja bila je odabir odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna kojim će se definisati plan eksperimenta tako da bude obuhvaćeno određeno eksperimentalno područje. S obzirom na broj izabranih faktora (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH mobilne faze, temperatura kolone i brzina protoka mobilne faze) javila se potreba za izborom dizajna koji ne zahteva veliki broj eksperimenata, a da se pri tome dobije dovoljan broj podataka za opisivanje sistema. Kao najpogodniji, izabran je centralni kompozicioni dizajn (CCD) uz primenu 2^4 punog faktorskog dizajna, zvezda dizajna sa nivoima $\alpha = \pm 0,5$, sa četiri replikacije u centralnoj tački. Imajući u vidu ograničenja kada je u pitanju sastav mobilne faze i pH mobilne faze, nije bilo

moguće insistirati na pojedinim graničnim vrednostima u dizajnu, pa je vrednost α u zvezda dizajnu morala biti postavljena na 0,5. Faktori koji se ispituju, njihovi nivoi kao i matrica eksperimenata za CCD prikazani su u poglavlju 3.4.3. Vrednosti za odgovore sistema koji su praćeni prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. Dobijene vrednosti za izabrane odgovore sistema

№	Odgovori sistema		
	k_{PLAT}	$R_{Y32/Y33}$	k_{Y31}
1	0,56	6,34	36,48
2	0,33	3,60	15,08
3	0,43	0	34,50
4	0,27	2,75	14,62
5	0,59	5,86	33,51
6	0,34	3,49	14,20
7	0,37	0	32,24
8	0,26	0	13,66
9	0,55	4,89	36,75
10	0,34	3,23	15,25
11	0,39	0	34,91
12	0,22	0	14,61
13	0,60	5,43	33,36
14	0,35	3,05	14,11
15	0,39	0	31,74
16	0,26	0	13,58
17	0,45	5,41	28,59
18	0,36	4,16	19,98
19	0,46	4,83	24,66
20	0,46	3,40	21,58
21	0,41	3,61	21,27
22	0,44	3,51	20,46
23	0,47	3,61	20,91
24	0,43	3,47	20,92
25	0,45	3,10	20,88
26	0,43	3,56	20,90
27	0,42	3,58	20,93
28	0,43	3,54	20,93

k_{PLAT} – retencioni faktor perindoprilata; k_{Y31} – retencioni faktor nečistoće Y31; $R_{Y32/Y33}$ – faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33

Primenom softvera Design Expert 7.0, a na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti za retencione faktore perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}), odnosno faktora rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{Y32/Y33}$), izračunati su koeficijenti kvadratnog modela (tabela 15).

Tabela 15. Koeficijenti kvadratnog modela za k_{PLAT} , $R_{Y32/Y33}$ i k_{Y31}

	k_{PLAT}	p -vrednost	$R_{Y32/Y33}$	p -vrednost	k_{Y31}	p -vrednost
b_0	2,353		3,903		21,708	
b_1	-0,212	<0,0001*	-0,426	0,0078*	-9,859	<0,0001*
b_2	-0,217	<0,0001*	-2,052	<00001*	-0,632	0,0062*
b_3	0,034	0,0033*	-0,184	0,1984	-0,982	0,0002*
b_4	-0,011	0,2693	-0,334	0,0284*	0,002	0,9939
b_{12}	0,134	<0,0001*	0,744	0,0001*	0,284	0,1732
b_{13}	0,006	0,5264	-0,194	0,1825	0,486	0,0282*
b_{14}	-0,007	0,4487	-0,105	0,4590	-0,0025	0,9901
b_{23}	-0,015	0,1422	-0,157	0,2730	0,06	0,7654
b_{24}	-0,006	0,5264	-0,004	0,9787	-0,024	0,9058
b_{34}	0,009	0,3787	0,231	0,1167	-0,104	0,6071
b_{11}	0,292	0,0083*	2,769	0,0608	8,603	0,0006*
b_{22}	0,092	0,3441	0,089	0,9481	3,943	0,0620
b_{33}	-0,227	0,0311*	-2,131	0,1383	-5,077	0,0208*
b_{44}	-0,188	0,0678	-2,211	0,1253	-4,877	0,0253*
Model	-	<00001*	-	<00001*	-	<00001*

* značajni članovi modela za nivo pouzdanosti od 95%

Matematički modeli koji opisuju zavisnost retencionih faktora perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}), odnosno faktora rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{Y32/Y33}$) od kodiranih vrednosti faktora x_1 , x_2 , x_3 i x_4 su:

$$\begin{aligned}
 k_{\text{PLAT}} = & 2,353 - 0,212x_1 - 0,217x_2 + 0,034x_3 - 0,011x_4 + 0,134x_1x_2 + \\
 & + 0,006x_1x_3 - 0,007x_1x_4 - 0,015x_2x_3 - 0,006x_2x_4 + \\
 & + 0,009x_3x_4 + 0,292x_1^2 + 0,092x_2^2 - 0,227x_3^2 - 0,188x_4^2
 \end{aligned} \quad (38)$$

$$\begin{aligned}
 k_{Y31} = & 21,708 - 9,859x_1 - 0,632x_2 - 0,982x_3 + 0,002x_4 + 0,284x_1x_2 + \\
 & + 0,486x_1x_3 - 0,0025x_1x_4 + 0,06x_2x_3 - 0,024x_2x_4 - 0,104x_3x_4 \\
 & + 8,603x_1^2 + 3,943x_2^2 - 5,077x_3^2 - 4,877x_4^2
 \end{aligned} \quad (39)$$

$$\begin{aligned}
 R_{Y32/Y33} = & 3,903 - 0,426x_1 - 2,052x_2 - 0,184x_3 - 0,334x_4 + 0,744x_1x_2 - \\
 & + 0,194x_1x_3 - 0,105x_1x_4 - 0,157x_2x_3 - 0,004x_2x_4 + 0,231x_3x_4 + \\
 & + 2,769x_1^2 + 0,089x_2^2 - 2,131x_3^2 - 2,211x_4^2
 \end{aligned} \quad (40)$$

Analizom vrednosti faktorskih efekata ispitivanih faktora (sadržaj acetonitrila, pH mobilne faze, temperature kolone i brzine protoka mobilne faze) na posmatrane odgovore sistema moglo se zaključiti da se:

① sadržaj acetonitrila (faktor x_1 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_1) ima značajan uticaj na sva tri posmatrana odgovora sistema. Vrednost efekta ovog faktora ima negativan predznak, što ukazuje da povećanje ovog faktora dovodi do istovremenog smanjenja vrednosti k_{Y31} što je poželjno, ali s druge strane i do smanjenje vrednosti za k_{PLAT} i $R_{Y32/Y33}$ što nije u skladu sa postavljenim ciljevima optimizacije. Imajući ovo u vidu, nije bilo moguće proceniti kojom koncentracijom acetonitrila bi se zadovoljili svi postavljeni ciljevi optimizacije.

② pH mobilne faze (faktor x_2 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_2) i brzina protoka mobilne faze (faktor x_4 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_4) imaju značajan uticaj na $R_{Y32/Y33}$. Zbog negativnog predznaka vrednosti ovih efekata, sa povećanjem vrednosti ovih faktora dolazi do smanjenja vrednosti faktora rezolucije kritičnog para ispitivanih supstanci. Vrednost pH mobilne faze značajno utiče i na k_{PLAT} . Sa povećanjem vrednosti ovog faktora (vrednost efekta ovog faktora ima negativan predznak) dolazi do smanjenja vrednosti k_{PLAT} što je u suprotnosti sa postavljenim ciljevima optimizacije.

③ temperatura kolone (faktor x_3 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_3) je faktor koji ima značajan uticaj na odgovore k_{Y31} i k_{PLAT} ; vrednost efekta ovog faktora ima negativan predznak što ukazuje da sa povećanjem temperature kolone dolazi do smanjenja odgovora k_{Y31} a do povećanja vrednosti k_{PLAT} .

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se doneti zaključci o pojedinačnim uticajima faktora, kao i o faktorskim interakcijama. Nedostatak analize ovih rezultata ogleda se upravo u tome što se ne može definisati optimum metode. Naime, na osnovu ovih rezultata moguće je definisati region ponašanja sistema, ali ne i tačne vrednosti faktora kojima odgovara optimum eksperimenta.

Dakle, kako bi se definisali optimalni hromatografski uslovi za farmaceutsku analizu ispitivanih jedinjenja potrebno je istovremeno pratiti više odgovora koji imaju suprotne ciljeve (povećanje vrednosti faktora rezolucije kritičnog para – $R_{Y32/Y33}$) za što je moguće kraće vreme (smanjenje k_{Y31}). Definisani optimum, dakle, mora biti kompromis, odnosno kombinacija ispitivanih faktora mora biti takva da analizirani odgovori imaju zadovoljavajuću vrednost. Zato je za istovremenu optimizaciju vrednosti faktora u cilju dobijanja zadovoljavajućih vrednosti više odabranih odgovora,

primenjena metoda multikriterijumske optimizacije i to Deringerova funkcija poželjnih odgovora.

U tabeli 16 prikazani su definisani: 1. prihvatljivi opsezi za ispitivane faktore, 2. za izabrane odgovore ciljevi koje treba postići multikriterijumskom optimizacijom. Oblik funkcije poželjnih odgovora za svaki od posmatranih odgovora sistema definisan je odabranim vrednostima težinskih koeficijenata, a utvrđene su i vrednosti koeficijenata značajnosti jer se koriste za izračunavanje globalnog optimuma (tabela 16).

Tabela 16. Usvojene granične vrednosti za određivanje globalnog optimuma

	Faktori	Cilj	Opseg		Težinski koeficijenti	Koeficijent značajnosti
Faktori	Acetonitril (% V/V)	u opsegu	35	40	–	3
	pH mobilne faze	u opsegu	2	3	–	3
	T kolone (°C)	u opsegu	45	55	–	3
	Protok (mL min ⁻¹)	u opsegu	1,5	2,0	–	3
Odgovori	k _{PLAT}	u opsegu	2,0	2,5	–	3
	R _{Y32/Y33}	ciljana vrednost – 4,7	4	6	$s = 5$ $t = 10$	3
	k _{Y31}	u opsegu	14	21	–	1

Za odgovor k_{PLAT} kao cilj postavljen je da bude u opsegu od 2,0 do 2,5 jer se smatra da su sve vrednosti u okviru ovog opsega prihvatljive.

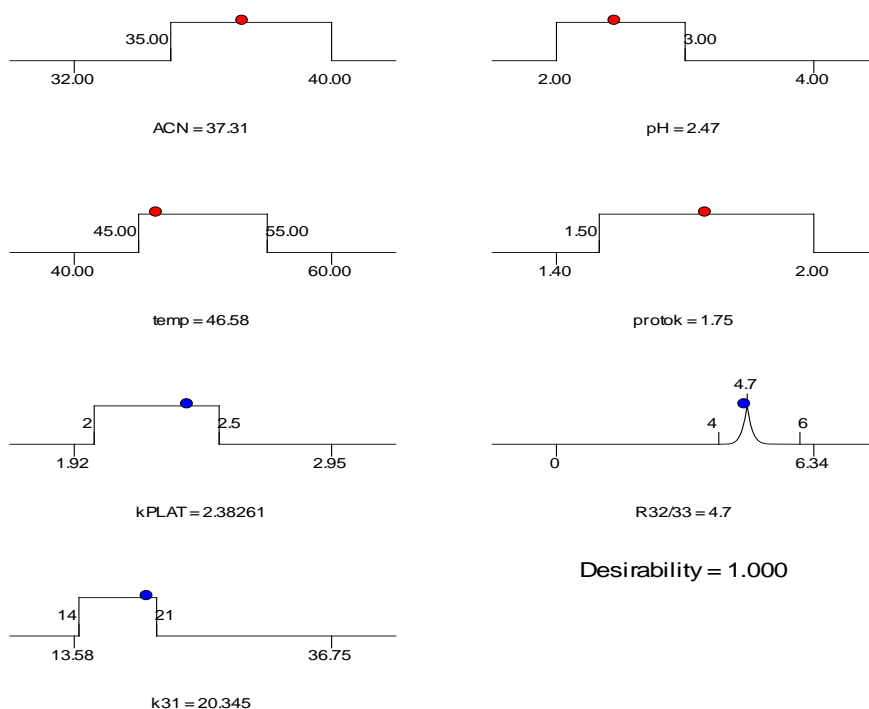
Za odgovor R_{Y32/Y33} kao cilj optimizacije postavljeno je dostizanje ciljane vrednosti 4,7. Sem toga, težinski koeficijenti su postavljeni na $s = 5$ i $t = 10$ čime je naglašen značaj dostizanja vrednosti bliske ciljanoj. Vrednosti faktora rezolucije kritičnog para između 4 i 4,7, odnosno 4,7 i 6 imaju d_i vrednosti između 0 i 1, dok će samo dostizanje definisane ciljane vrednosti 4,7 za rezultat imati vrednost $d_i = 1$.

Za odgovor k_{Y31} kao cilj postavljeno je da bude u opsegu od 14 – 21, tako da se svaka vrednost veća od 21 smatra neprihvatljivom i dodeljuje joj se vrednost $d_i = 0$. Vrednosti za odgovor k_{Y31} koje su između 14 i 21 smatraju se zadovoljavajućim i njima se dodeljuje vrednost $d_i = 1$.

Definisani limiti, težinski koeficijenti i koeficijenti značajnosti za ispitivane faktore i posmatrane odgovore sistema obrađeni su Design–Expert[®] softverom i na taj način utvrđena kombinacija faktora koja daje najbolji globalni optimum $D = 1,000$.

Predviđeni optimalni hromatografski uslovi su: 37 % (V/V) acetonitrila, 50 °C kao temperatura kolone i brzina protoka mobilne faze od 1,7 mL min⁻¹. pH mobilne faze treba da bude 2,50. Za navedene uslove, softverom predviđene vrednosti posmatranih odgovora sistema iznosile su: $k_{PLAT} = 2,38$; $R_{Y32/Y33} = 4,7$ i $k_{Y31} = 20,35$.

Grafički prikaz dobijenih optimalnih uslova, kao i softverom predviđenih odgovora, dat je na slici 17.



Slika 17. Grafički prikaz optimalnih hromatografskih uslova: a) sadžaj acetonitrila u mobilnoj fazi, b) pH mobilne faze; c) temperaturu kolone i d) brzinu protoka mobilne faze, kao i predviđenih odgovora sistema: e) k_{PLAT} ; f) $R_{Y32/Y33}$ g) k_{Y31}

Imajući u vidu da funkcija poželjnih odgovora uključuje subjektivne parametre kao što su *i*) koeficijenti značajnosti koji se koriste za izračunavanje globalnog optimuma, *ii*) težinske koeficijente koji određuju oblik individualnih odgovora i *iii*) opsege odgovora sistema, koje specificira analitičar (eng. *user specified*), neophodno je kada su u pitanju željene vrednosti odgovora sistema ispitati prihvatljivost i osetljivost

ovih parametara. Za ispitivanje prihvatljivosti i osetljivosti navedenih parametara u odnosu na željene vrednosti odgovora sistema, primenjena je analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora koja uz statističku podršku pruža uvid u efekat promena parametara na robusnost globalnog optimuma.

Odabrana su četiri faktora kojima su dodeljene granične vrednosti, a plan eksperimenata za analizu osetljivosti funkcije poželjnih odgovora definisan je primenom 2^{4-1} frakcionog faktorskog dizajna. Ispitivani faktori i njihovi nivoi prikazani su u tabeli 17.

Tabela 17. Analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora – faktori i njihovi nivoi

Faktor	Nivoi	
	niži	viši
Koeficijent značajnosti za $R_{Y32/Y33}$	1	5
<i>Težina s</i> za $R_{Y32/Y33}$	1	5
<i>Težina t</i> za $R_{Y32/Y33}$	5	10
Ciljana vrednost za $R_{Y32/Y33}$	4,6	4,8

Matrica eksperimenata prema 2^{4-1} frakcionom faktorskom dizajnu prikazana je u tabeli 18.

Tabela 18. Analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora – Matrica eksperimenata za 2^{4-1} frakcioni dizajn

Broj	Kodirane vrednosti za ispitivane faktore			
	A	B	C	D
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1

A – koeficijent značajnosti za $R_{Y32/Y33}$; B – težina s za $R_{Y32/Y33}$;

C – težina t za $R_{Y32/Y33}$; D – ciljana vrednost za $R_{Y32/Y33}$

Sledeći definisane promene parametara za izračunavanje vrednosti globalnog optimuma, izračunato je osam novih vrednosti globalnog optimuma koji su predstavljeni u tabeli 19. U istoj tabeli prikazani su i ulazni faktori i vrednosti individualnih odgovora.

Tabela 19. Vrednosti globalnog optimuma (D), ulaznih faktora i odgovora sistema

Broj eksperimenata	D	Dobijene vrednosti						
		Ulazni faktori				Odgovori		
		Inp1	Inp2	Inp3	Inp4	k_{PLAT}	$R_{Y32/Y33}$	k_{Y31}
1	1,000	37,79	2,11	54,24	1,87	2,450	4,60	19,823
2	1,000	37,73	2,68	48,96	1,69	2,369	4,80	19,637
3	1,000	38,45	2,75	52,41	1,75	2,364	4,80	18,683
4	1,000	37,77	2,77	48,75	1,73	2,347	4,60	19,340
5	1,000	38,03	2,50	54,17	1,65	2,394	4,80	18,834
6	1,000	37,96	2,87	49,59	1,67	2,338	4,60	19,037
7	1,000	39,23	2,85	54,51	1,81	2,334	4,60	17,532
8	1,000	37,70	2,20	53,17	1,84	2,452	4,80	20,178

Inp1 – acetonitril (% V/V); Inp2 – pH mobilne faze; Inp3 – T kolone ($^{\circ}\text{C}$); Inp4 – protok (mL min^{-1}); k_{PLAT} – retencioni faktor perindoprilata; k_{Y31} – retencioni faktor nečistoće Y31; $R_{Y32/Y33}$ – faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33

Analizom dobijenih vrednosti u tabeli 19 može se primetiti da se vrednost globalnog optimuma nije menjala, odnosno da je u svih osam slučajeva zadržala

maksimalnu vrednost od 1. Može se zaključiti da je analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora potvrdila da subjektivni parametri nisu uticali na pouzdanost optimizacije.

Optimalni uslovi primenjeni su za hromatografsku analizu perindorpil *t*-butilamina i njegovih nečistoća:

<i>Hromatografski sistem</i>	Hewlett Packard 1100 Series, <i>Agilent Technologies</i> , Nemačka
<i>Kolona</i>	YMC-Pack C8, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m
<i>Mobilna faza</i>	acetonitril–50 mmol L ⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (37 : 63 V/V)
<i>pH mobilne faze</i>	2,50
<i>Temperatura</i>	50 °C
<i>Talasna dužina</i>	215 nm
<i>Protok</i>	1,7 mL min ⁻¹
<i>Injekciona zapremina</i>	50 μ L
<i>Rastvarač</i>	acetonitril–voda (40 : 60 V/V)

4.1.2. PROCENA ROBUSNOSTI PRIMENOM *PLACKETT–BURMAN* DIZAJNA

Kao konačna potvrda pogodnosti postavljene i optimizirane RP–HPLC metode za farmaceutsku analizu perindorpil *t*-butilamina, izvršeno je testiranje definisanih eksperimentalnih uslova u cilju procene robusnosti. Faktori koji se ispituju i njihovi nivoi prikazani su u poglavlju 3.5.3. Za faktore su definisani niži (–1) i viši nivoi (+1) koji su simetrično raspoređeni oko nominalne vrednosti (0), osim za kolonu za koju su nominalna i viša vrednost iste. Plan eksperimenta definisan je primenom softvera Design Expert 7.0 i dvanaest eksperimenata je tabelarno prikazano u poglavlju 3.5.4. *Plackett–Burman* dizajnom sa 12 eksperimenata može se ispitivati 11 faktora. S obzirom da je broj realnih faktora koji su se ispitivali bio 7 (hromatografska kolona; temperatura (°C); acetonitril (V/V %); koncentracija rastvora kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L⁻¹); pH mobilne faze; protok (mL min⁻¹); talasna dužina (nm)), preostali faktori, tj. kolone u dizajnu definisane su kao veštački (eng. *dummy*) faktori.

Kao odgovori sistema praćeni su oni koji u najvećoj meri karakterišu hromatografsko ponašanje ispitivanih jedinjenja na koloni (retencioni faktor – k ; faktor selektivnosti – α ; faktor rezolucije – R ; simetrija pika – S_y), kao i njihovu kvantifikaciju (površina pika – A).

Konačno, izvršena je analiza 28 odgovora sistema čije su vrednosti prikazane u tabeli 20.

Tabela 20. Dobijene vrednosti za izabrane odgovore sistema*

Odgovor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
k_1	2,32	1,73	1,72	1,57	2,27	1,79	2,31	1,57	1,76	2,38	2,39	2,27
k_2	4,01	3,69	2,63	2,54	4,01	3,65	4,57	3,21	3,71	4,65	4,67	4,06
k_3	5,40	5,38	3,44	3,35	5,41	5,33	6,41	4,55	5,53	6,59	6,58	5,5
k_4	6,34	6,23	4,13	3,95	6,20	6,40	7,13	5,56	6,65	7,48	7,17	6,51
k_5	7,31	7,27	4,67	4,46	7,13	7,50	8,35	6,42	7,84	8,83	8,40	7,53
k_6	17,37	21,08	11,83	11,40	16,89	21,70	20,75	18,14	23,05	21,99	20,76	18,10
Sy_1	0,74	0,71	0,59	0,25	0,66	0,66	0,52	0,25	0,54	0,47	0,75	0,41
Sy_2	0,46	0,34	0,34	0,38	0,42	0,35	0,40	0,39	0,29	0,39	0,42	0,42
Sy_3	0,8	0,87	0,83	0,86	0,87	0,90	0,96	0,85	0,88	0,84	0,91	0,95
Sy_4	0,84	0,90	0,92	0,93	0,83	0,90	0,86	0,92	0,93	0,86	0,85	0,84
Sy_5	0,86	0,93	0,91	0,91	0,85	0,99	0,87	0,91	0,93	0,77	0,85	0,84
Sy_6	0,93	0,97	0,96	0,99	0,94	0,93	0,95	1,00	0,99	0,95	0,94	0,96
R_1	4,47	4,4	3,97	4,19	4,67	4,03	3,94	4,41	3,36	3,81	4,93	3,92
R_2	5,11	5,28	4,85	4,39	5,14	5,27	5,54	4,47	5,33	5,86	5,65	5,14
R_3	3,77	3,01	4,76	3,79	3,21	3,77	2,36	3,77	3,81	2,98	1,94	3,96
R_4	3,72	3,9	3,55	3,25	3,79	3,79	4,34	3,32	4,13	4,50	4,26	4,01
R_5	26,19	30,18	28,77	27,36	26,75	29,18	28,23	27,66	30,04	27,86	27,72	27,28
α_1	1,73	2,14	1,58	1,62	1,77	2,04	1,98	2,05	2,11	1,95	1,95	1,79
α_2	1,35	1,46	1,31	1,32	1,35	1,46	1,40	1,42	1,49	1,42	1,41	1,35
α_3	1,17	1,16	1,20	1,18	1,15	1,20	1,11	1,22	1,20	1,14	1,09	1,18
α_4	1,15	1,17	1,13	1,13	1,15	1,17	1,17	1,10	1,18	1,18	1,17	1,16
α_5	2,37	2,9	2,54	2,56	2,37	2,89	2,48	2,83	2,94	2,49	2,47	2,40
A_1	272,6	316,4	286,0	249,2	319,9	249,6	282,6	274,9	318,1	277,5	250,1	273,7
A_2	9361	1052,4	9502,5	8476,5	10625	8427	9444	9487,7	10818	9528,6	8419,5	9397,5
A_3	21,6	24,2	22,2	20,6	23,6	20,4	20,9	23,2	26,9	21,2	19,1	26,4
A_4	134,4	152,3	130,6	119,1	153,5	119,1	132,4	134,6	152,6	134,2	116,9	133,6
A_5	93,2	99,4	87,6	76,6	98,6	81,4	85,6	86,4	97,6	92,0	75,9	85,1
A_6	173,2	198,6	174,2	157,9	195,8	154,6	167,5	177,4	198,4	171,5	151,8	171,3

* k_1 - retencioni faktor perindoprilata, k_2 - retencioni faktor perindopril *t*-butlamina, k_3 - retencioni faktor nepoznate nečistoće, k_4 - retencioni faktor nečistoće Y32, k_5 - retencioni faktor nečistoće Y33, k_6 - retencioni faktor nečistoće Y31; Sy_1 - faktor simetrije perindoprilata, Sy_2 - faktor simetrije perindopril *t*-butlamina, Sy_3 - faktor simetrije nepoznate nečistoće, Sy_4 - faktor simetrije nečistoće Y32, Sy_5 - faktor simetrije nečistoće Y33, Sy_6 - faktor simetrije nečistoće Y31; R_1 - faktor rezolucije između perindopril *t*-butlamina i perindoprilata, R_2 - faktor rezolucije između perindoprilata i nepoznate nečistoće, R_3 - faktor rezolucije između nepoznate nečistoće i nečistoće Y32, R_4 - faktor rezolucije između nečistoće Y32 i nečistoće Y33, R_5 - faktor rezolucije između nečistoće Y33 i nečistoće Y31; α_1 - faktor selektivnosti između perindopril *t*-butlamina i perindoprilata, α_2 - faktor selektivnosti između perindoprilata i nepoznate nečistoće, α_3 - faktor selektivnosti između nepoznate nečistoće i nečistoće Y32, α_4 - faktor selektivnosti između nečistoće Y32 i nečistoće Y33, α_5 - faktor selektivnosti između nečistoće Y33 i nečistoće Y31; A_1 - površina pika perindoprilata, A_2 - površina pika perindopril *t*-butlamina, A_3 - površina pika nepoznate nečistoće, A_4 - površina pika nečistoće Y32, A_5 - površina pika nečistoće Y33, A_6 - površina pika nečistoće Y31.

Efekti ispitivanih faktora izračunati su primenom softvera Design Expert 7.0, i njihove vrednosti prikazane su u tabeli 21.

Tabela 21. Vrednosti dobijenih faktorskih efekata, kritičnog efekta ($E_{kritično}$) i granice greške (Margin of Error – ME)

Odgovor*	Kolona	Dummy 1	T (°C)	ACN (%)	Pufer (mM)	Dummy 2	pH	Dummy 3	Protok (mL min ⁻¹)	Talasna dužina (nm)	Dummy 4	E _{critical} (α=0,05)	E _{critical} (α=0,01)	ME (0,975, m)	ME (0,995, m)
k₁	0,63	0,0067	0,06	-0,11	-0,17	-0,01	-0,067	0	-0,0067	0,0033	-0,0033	0,0133	0,0234	0,0200	0,3567
k₂	1,09	0,072	-0,015	-0,74	0,16	-0,035	-0,0017	0,005	0,0083	-0,19	-0,2	0,2297	0,4037	0,2483	0,4115
k₃	1,39	0,1	-0,065	-1,36	0,28	-0,058	-0,018	-0,017	0,022	-0,38	-0,39	0,4336	0,7621	0,2781	1,0607
k₄	1,32	0,068	-0,14	-1,39	0,43	-0,035	-0,21	0,0083	0,00833	-0,54	-0,54	0,5815	1,0219	0,7169	1,3004
k₅	1,57	0,088	-0,19	-1,78	0,51	-0,045	-0,28	0,015	0,022	-0,65	-0,65	0,7116	1,2506	0,8790	4,2162
k₆	1,44	0,3	-0,63	-5,93	1,86	-0,12	-0,84	-0,075	-0,058	-2,32	-2,36	2,5405	4,4649	2,9643	0,1187
Sy₁	0,092	-0,032	0,28	-0,12	0,005	-0,038	-0,045	-0,042	-0,052	-0,032	0,0017	0,0694	0,1219	0,0816	0,0557
Sy₂	0,07	0	0,01	0,037	0,02	0	0,017	-0,0033	0,03	0,0033	0,0033	0,0050	0,0087	0,0392	0,0842
Sy₃	0,023	-0,0033	-0,027	-0,033	0,023	0,01	0,02	-0,0033	-0,033	0,05	-0,033	0,0371	0,0652	0,0596	0,0194
Sy₄	-0,07	0	-0,017	-0,0033	-0,01	-0,01	0	0	0,0033	0,003	0,0067	0,0128	0,0226	0,0131	0,0612
Sy₅	-0,09	-0,033	0,027	-0,01	0,03	-0,0067	0,0033	-0,0033	-0,0067	0,02	-0,02	0,0419	0,0736	0,0430	0,0426
Sy₆	-0,028	0,0083	0,028	0,0083	-0,005	-0,005	0,012	-0,0083	-0,005	-0,0083	-0,0017	0,0137	0,0241	0,0302	0,6128
R₁	0,23	0,13	0,47	0,19	0,04	-0,01	0,5	-0,073	0,26	-0,023	-0,09	0,1860	0,3268	0,4309	0,1962
R₂	0,48	0,078	0,095	-0,64	-0,068	0,022	-0,18	0,038	-0,088	-0,058	0,005	0,0956	0,168	0,1365	0,1418
R₃	-0,78	-0,048	-0,035	0,9	0,025	0,052	-0,83	0,095	-0,18	0,005	0,035	0,1317	0,2314	0,0987	0,2724
R₄	0,45	0,087	-0,09	-0,55	-0,067	-0,013	-0,14	0,0033	-0,15	-0,027	-0,0067	0,0941	0,1654	0,1896	0,1383
R₅	-1,53	0,29	0,06	-1,53	0,037	0	-0,24	-0,053	-0,88	-0,023	-0,0067	0,3143	0,5525	0,0913	0,0296
α₁	-0,062	0,036	-0,048	-0,27	0,12	-0,015	0,051	0,0055	-0,0055	-0,13	-0,12	0,1346	0,2366	0,1668	0,2372
α₂	-0,03	0	-0,01	-0,09	0,023	-0,0033	-0,0033	-0,0033	0,0033	-0,04	-0,037	0,0398	0,0699	0,0409	0,0588
α₃	-0,053	-0,0033	-0,01	0,033	0,013	0,0033	-0,03	0,0067	0	-0,013	-0,013	0,0164	0,0287	0,0364	0,0517
α₄	0,017	-0,0067	0,0033	0,037	-0,033	0,01	-0,013	-0,01	-0,01	0	0	0,0167	0,0293	0,0380	0,0536
α₅	-0,35	0,0033	-0,027	-0,18	0,083	-0,0033	-0,0033	-0,0067	-0,0033	-0,093	-0,093	0,0995	0,1749	0,1192	0,1713
A₁	-2,95	-2,22	3,11	-2,98	-5,18	0,32	2,59	1,76	-37,14	-31,38	-0,36	3,0633	5,3838	6,5509	9,6920
A₂	-114,38	-11,31	-10,14	-90,53	-83,84	29,14	27,76	-35,33	-1140,28	-1150,39	-17,98	54,148	95,2005	140,498	207,866
A₃	-0,79	0,4	-1,34	0,84	0,54	0,42	-1,19	-1,21	-3,03	-1,86	-1,48	2,1296	3,7427	3,0746	4,3387
A₄	-0,56	-1,5	0,063	-0,31	-0,08	1,69	0,7	-0,76	-16,1	-18,32	-1,22	2,8548	5,0174	19,357	28,638
A₅	0,24	-1,09	2,11	-0,7	0,47	1,12	-2,37	0,63	-8,05	-12,49	1,55	2,4406	4,2894	3,161	4,677
A₆	-4,96	-0,47	0,74	1,26	-1,14	1,18	0,95	-1,71	-19,89	-2,92	-1,07	21,233	37,317	3,395	5,029

* Odgovori sistema su objašnjeni u fusnoti za tabelu 20.

Sledeća faza ispitivanja robusnosti metode bila je grafička i statistička interpretacija dobijenih rezultata (v. poglavlje 1.3.6.2) na osnovu kojih je procenjen uticaj ispitivanih faktora i utvrđeno koji faktori imaju najznačajniji uticaj na hromatografski sistem. Grafičko tumačenje značajnosti faktorskih efekata podrazumeva primenu *normal probability* ili *half-normal probability* grafikona [50, 55]. Primenom *half-normal probability* grafikona definisani su značajni efekti (tabela 22). Kako bi se dobile potpune informacije o faktorskim efektima, dodatno su analizirani i *Pareto* dijagrami na osnovu limita standardnog *t*-testa. Rezultati su prikazani u tabeli 22.

Statistička procena faktorskih efekata preciznija je i omogućava definisanje limita za pojedine faktore. Zasniva se na statističkom *t*-testu. Za izračunavanje standardne greške efekata, neophodne za određivanje *t* vrednosti, opisane su različite metode (v. poglavlje 1.3.6.2.2), od kojih su u radu primenjene metoda kod koje se procena vrši na osnovu beznačajnih efekata (efekata veštačkih faktora) i metoda koja se bazira na primeni *Dong*-ovog algoritma. U oba slučaja su za izračunavanje eksperimentalnih *t* vrednosti primenjivani nivoi značajnosti $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$. Efekti za koje se primenom opisanih statističkih procena pokazalo da su značajni prikazani su u tabeli 22.

Tabela 22. Procena faktorskih efekata

Odgovor*	značajni efekti za $\alpha = 0,05$ (dobijeni poređenjem sa kritičnim efektom izračunatim na osnovu beznačajnih efekata)	značajni efekti za $\alpha = 0,01$ (dobijeni poređenjem sa kritičnim efektom izračunatim na osnovu beznačajnih efekata)	značajni efekti za $\alpha = 0,05$ (na osnovu Dong-ovog algoritma)	značajni efekti za $\alpha = 0,01$ (na osnovu Dong-ovog algoritma)	značajni efekti na osnovu <i>half-normal probability</i> grafikona	značajni efekti na osnovu <i>Pareto</i> dijagrama
k_1	A+C+D+G+E	A+C+D+G	A+C+D+G	A+C+D+G	A+D	A+D
k_2	A+D	A+D	A+D	A+D	A+D	A+D
k_3	A+D	A+D	A+D+E+K+L	A+D	A+D	A+D
k_4	A+D	A+D	A+D	A+D	A+D	A+D
k_5	A+D	A+D	A+D	A+D	A+D	A+D
k_6	D	D	D	D	D	D
Sy_1	A+C+D	C	C+D	C	C	C+D
Sy_2	A+C+D+E+G+J	A+C+D+E+JG	A	A	A	A
Sy_3	–	–	–	–	–	–
Sy_4	A+C	A	A+C	A+C	A	A+C
Sy_5	A	A	A	A	A	A
Sy_6	A+C	A+C	–	–	A	A+C
R_1	A+C+D+G+J	C+G	C+G	–	C+G	C+G
R_2	A+D+G	A+D+G	A+D+G	A+D	A+D	A+D
R_3	A+D+G+J	A+D+G	A+D+G+J	A+D+G+J	A+D+G	A+D+G
R_4	A+D+G+J	A+D	A+D	A+D	A+D	A+D
R_5	A+D+J	A+D+J	A+B+D+G+J	A+B+D+G+J	A+D+J	A+D+J
α_1	D	D	D	D	D	D
α_2	D+K	D	D	D	D	D
α_3	A+D+K	A+D+G	A	A	A	A
α_4	A+D+E	D+E	–	–	D	D
α_5	A+D	A+D	A+D	A+D	A	A+D
A_1	C+E+J+K	J+K	J+K	J+K	J+K	J+K
A_2	J+K	J+K	J+K	J+K	J+K	J+K
A_3	J	–	–	–	–	J
A_4	J+K	J+K	–	–	J+K	J+K
A_5	G+J+K	J+K	J+K	J+K	J+K	J+K
A_6	–	–	K	–	A+J+K	A+J+K

* Odgovori sistema su objašnjeni u fusnoti za Tabelu 20.

Kao što se i očekivalo, za odgovore koji karakterišu razdvajanje ispitivanih jedinjenja, odnosno zadržavanje ispitivanih jedinjenja na koloni, najznačajniji faktori su tip hromatografske kolone i sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi. S druge strane, na odgovore koji karakterišu kvantifikaciju, najveći uticaj imali su protok mobilne faze i talasna dužina detekcije. Razlike u dobijenim rezultatima posledica su vrednosti nivoa značajnosti i primenjene statističke metode. Ukoliko se procena vrši na osnovu beznačajnih efekata, veće vrednosti za kritične efekte ($E_{kritično}$) dobijene su na osnovu većih vrednosti jednog ili više efekata veštačkih faktora. S druge strane, kod metode koja se bazira na primeni Dong-ovog

algoritma, procenjena vrednost granice greške (*eng.* ME) u poređenju sa vrednošću kritičnog efekta ($E_{kritično}$) posledica je uključivanja visokih vrednosti faktorskih efekata u izračunavanje vrednosti inicijalne procene greške, s_0 . Uopšteno govoreći, faktorski efekat će lakše biti procenjen kao značajan ukoliko je vrednost kritičnog efekta niža. Kada je eksperimentalna greška procenjena na pravi način, vrednosti kritičnih efekata biće uporedive bez obzira koja statistička metoda se koristi [98]. Kako su slični rezultati dobijeni primenom oba statistička pristupa procene faktorskih efekata, za izračunavanje intervala neznačajnosti za značajne faktore korišćeni su rezultati dobijeni poređenjem sa kritičnim efektom izračunatim na osnovu beznačajnih efekata za nivo značajnosti $\alpha = 0,05$.

Osim za kvantitativne faktore (koncentracija pufera, pH mobilne faze i temperatura kolone), intervali "neznačajnosti" izračunati su i za faktor smeše (koncentracija organskog rastvarača, odnosno acetonitrila u mobilnoj fazi), za koji je prethodnim istraživanjem utvrđena značajnost, i rezultati su prikazani u tabeli 23. Na osnovu prikazanih rezultata, moguće je kontrolisati hromatografski sistem pod različitim okolnostima i u različitim laboratorijama, a da to ne utiče na kvalitativne i kvantitativne rezultate metode.

Tabela 23. Intervali "neznačajnosti" za značajne faktore

Odgovor*	Značajan faktor	Interval "neznačajnosti" dobijen na osnovu kritičnog efekta za $\alpha = 0,05$
k₁	C	48,89 – 51,11
	D	36,88 – 37,12
	G	2,46 – 2,54
k₂	D	36,69 – 37,31
k₃	D	36,68 – 37,72
	E	–
k₄	D	36,58 – 37,42
k₅	D	36,60 – 37,40
k₆	D	36,57 – 37,43
Sy₁	C	48,76 – 51,24
	D	36,42 – 37,58
Sy₂	C	47,50 – 52,50
	D	36,86 – 37,14
	E	48,75 – 51,25
Sy₃	–	–
Sy₄	C	46,24 – 53,76
Sy₅	–	–
Sy₆	C	47,54 – 52,46
R₁	C	48,02 – 51,98
	G	2,43 – 2,57
R₂	D	36,85 – 37,15
	G	2,39 – 2,61
R₃	D	38,86 – 37,14
	G	2,39 – 2,61
R₄	D	36,84 – 37,16
	G	2,37 – 2,63
R₅	D	36,79 – 37,21
	G	–
α_1	D	36,50 – 37,50
α_2	D	36,56 – 37,44
α_3	D	36,51 – 37,49
α_4	D	36,55 – 37,45
	E	47,47 – 52,53
α_5	D	36,45 – 37,55
A₁	C	45,07 – 54,93
	E	47,04 – 52,96
A₂	D	36,40 – 37,60
	E	47,0 – 53,0
A₃	–	–
A₄	–	–
A₅	G	2,29 – 2,71
A₆	–	–

* Odgovori sistema su objašnjeni u fusnoti za Tabelu 20.

*C – temperatura (°C); D – acetonitril (V/V %); E – koncentracija rastvora kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L⁻¹); G – pH mobilne faze

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je metoda osetljiva na promene sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi čija se vrednost mora održavati u veoma uskom intervalu da bi se održavale vrednosti hromatografskih parametara. S druge strane, kvantitativni odgovori su se pokazali relativno robusno.

Konačni cilj ovog dela istraživanja bio je definisanje limita za procenu pogodnosti sistema.

Kod postavljene RP–HPLC metode za kvantitativnu analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća ispitan je uticaj velikog broja faktora na odgovore sistema. Za hromatografsko razdvajanje ispitivanih supstanci, naročito u slučaju strukturno sličnih supstanci, najvažniji kriterijum je faktor rezolucije. S tim u vezi, ispitani su uslovi najgoreg slučaja za sve dobijene vrednosti faktora rezolucije (od R_1 do R_5) – tabela 24.

Tabela 24. Faktorski nivoi za situaciju *najgoreg slučaja*

Faktor	Odgovori				
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
A: Kolona	-1	-1	+1	-1	+1
C: Temperatura (°C)	-1	-1	+1	-1	+1
D: Acetonitril (%)	-1	+1	+1	+1	+1
E: Koncentracija kalijum-dihidrogenfosfata (mM)	-1	+1	-1	+1	+1
G: pH mobilne faze	-1	+1	+1	+1	-1
J: Protok (mL min⁻¹)	-1	+1	+1	+1	+1
K: Talasna dužina (nm)	-1	-1	+1	-1	-1

Pod uslovima prikazanim u tabeli 24, sprovedeni su eksperimenti u triplikatu, a srednje vrednosti i vrednosti standardne devijacije (SD) date su u tabeli 25. SST limiti su izračunati na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti, ali i iz teorijskog modela primenom izraza (37). U teorijskom pristupu izračunavanja SST limita, korišćene su vrednosti značajnih faktorskih efekata koji su dobijeni poređenjem sa kritičnim efektom izračunatim na osnovu beznačajnih efekata za nivo značajnosti $\alpha = 0,05$. Kao što se vidi iz tabele 25, dobijeno je slaganje teorijskih i eksperimentalno dobijenih vrednosti za faktore rezolucije određene pod *najgorim* uslovima. S obzirom da je cilj ovog dela ispitivanja definisanje granične vrednosti najkritičnijeg odgovora u cilju stalne provere adekvatnosti sistema, to se ovde može zaključiti da je najniža vrednost dobijena za odgovor R_3 . Konačan zaključak bio bi da je sistem pogodan ako je vrednost faktora rezolucije $R_3 > 2,0$. Na ovaj način podaci su za ispitivanje robusnosti RP–HPLC metode za kvantitativnu analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u potpunosti definisani.

Tabela 25. SST limiti dobijeni na osnovu situacije *najgoreg slučaja* i teorijskog modela

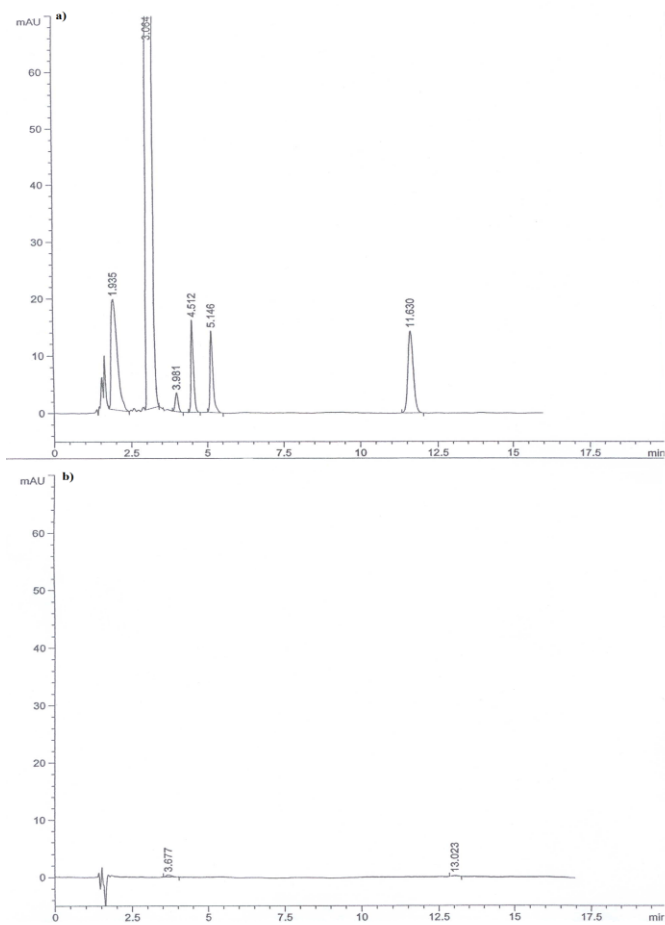
Eksperiment	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	3,36	4,47	1,94	3,32	26,19
2	3,38	4,4	1,92	3,25	26,25
3	3,43	4,52	2,01	3,34	25,19
Srednja vrednost	3,39	4,46	1,96	3,30	25,88
SD	0,036	0,060	0,047	0,047	0,595
n	3	3	3	3	3
SST limiti dobijeni na osnovu situacije najgoreg slučaja					
	$3,39 - 2,92 \times (0,036 / \sqrt{3}) = 3,33$	$4,46 - 2,92 \times (0,060 / \sqrt{3}) = 4,359$	$4,797 - 2,92 \times (0,047 / \sqrt{3}) = 4,718$	$3,30 - 2,92 \times (0,047 / \sqrt{3}) = 3,221$	$25,88 - 2,92 \times (0,595 / \sqrt{3}) = 25,537$
SST limiti dobijeni na osnovu teorijskog modela					
	3,365	5,16	2,085	3,785	26,13

4.1.3. VALIDACIJA RP-HPLC METODE

Za metode farmaceutске analize potrebno je, pored uobičajenih zahteva koje svaka instrumentalna metoda mora da ispuni, izvršiti i dodatnu evaluaciju kojom se potvrđuje pouzdanost njene primene, odnosno metoda je validirana, tj. ispitani su selektivnost, linearnost, preciznost, tačnost, limiti kvantifikacije (LOQ) i limiti detekcije (LOD) [43].

Potvrđeno je da je metoda selektivna što znači da se na retencionim vremenima perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća nisu javljali interferirajući pikovi. Pomoćne materije iz analiziranih tableta nisu uticale na razdvajanje ispitivanih komponenti.

Reprezentativni hromatogrami laboratorijske a) i *placebo smeše* b) smeše prikazani su na slici 18.



Slika 18. a) Reprezentativni hromatogram laboratorijske smeše perindoprila ($t_R = 3,064$ min.) i njegovih nečistoća: perindoprilata ($t_R = 1,935$ min.), nepoznate nečistoće ($t_R = 3,981$ min.), Y32 ($t_R = 4,512$ min.), Y33 ($t_R = 5,146$ min.) i Y31 ($t_R = 11,630$ min.). (Mobilna faza: acetonitril–kalijum-dihidrogenfosfatni pufer (50 mM) (37 : 63 V/V), pH 2,5; protok mobilne faze $1,7 \text{ mL min}^{-1}$; talasna dužina detekcije $\lambda = 215 \text{ nm}$)
b) Hromatogram placebo smeše (v. poglavlje 3.6.1)

Za procenu linearnosti metode analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih jedinjenja u funkciji koncentracije. Kalibracione krive konstruisane su metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka dobijena je kao rezultat tri injektovanja odgovarajućih rastvora. Kako su koeficijenti korelacije (r) za kalibracione krive perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća veći od 0,990 i kako je vrednost statističkog parametra (t_b) manja od tabelarne vrednosti (t_{tab}), može se zaključiti da dobijene kalibracione krive odgovaraju zahtevima smernice ICH Q2 (R1) – *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Značajni parametri za procenu linearnosti kalibracione krive perindopril *t*-butilamina kao i kalibracionih krivih perindoprilata, nečistoća Y31, Y32 i Y33, prikazani su u tabeli 26.

Tabela 26. Rezultati za regresionu analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća

Parametri	Perindopril <i>t</i> -butilamin	Perindoprilat	Nečistoća Y31	Nečistoća Y32	Nečistoća Y33
Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10 – 1000	0,2 – 20	0,2 – 20	0,1 – 10	0,1 – 10
$y = ax + b$	$21\,232x + 651,61$	$29,914x + 9,843$	$19,395x + 4,507$	$22,403x + 5,577$	$23,778x + 0,272$
r	0,9973	0,9989	0,9996	0,9969	1,0000
S_b	294,434	5,2559	1,892	3,3065	0,2064
S_a	593,77	0,530	0,191	0,667	0,042
t_b	2,213	1,8728	2,382	1,6865	1,3165

a – nagib kalibracione krive

b – odsečak na y osi

r – koeficijent korelacije

S_a – standardna devijacija nagiba

S_b – standardna devijacija odsečka

$t_{\text{tab}} = 2,998$ ($n = 7$, $p = 0,02$)

Statistički parametri potvrđuju linearnost kalibracionih krivih za ispitivanu oblast koncentracija.

Za procenu preciznosti metode injektovani su rastvori laboratorijske smeše pod uslovima prikazanim u poglavlju 3.6.3. Rezultati su dati u tabeli 27.

Tabela 27. Rezultati za procenu preciznosti RP–HPLC metode

Supstanca	Injektovano	Nadeno	RSD (%)	R (%)
Perindopril <i>t</i> -butilamin (mg mL ⁻¹)	0,2	0,212 ± 0,001*	0,638	105,80
	0,4	0,409 ± 0,002	0,545	102,48
	0,6	0,628 ± 0,003	0,399	104,60
Perindoprilat (µg mL ⁻¹)	4	4,274 ± 0,071	1,663	106,85
	8	8,296 ± 0,124	1,493	103,70
	12	12,175 ± 0,145	1,187	101,46
Y31 (µg mL ⁻¹)	4	4,05 ± 0,046	1,122	101,28
	8	8,052 ± 0,102	1,268	100,65
	12	11,915 ± 0,103	0,863	99,29
Y32 (µg mL ⁻¹)	2	2,039 ± 0,021	1,045	101,95
	4	4,016 ± 0,035	0,872	100,40
	6	6,121 ± 0,0028	0,452	102,02
Y33 (µg mL ⁻¹)	2	2,029 ± 0,035	1,714	101,47
	4	3,959 ± 0,024	0,601	98,98
	6	5,935 ± 0,077	1,296	98,92

*Standardna devijacija (SD) (n = 10)

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih vrednosti i izračunavanjem standardne devijacije (SD), relativne standardne devijacije (RSD) i *Recovery* vrednosti (R), za ispitivane koncentracije rastvora standarda perindopril *t*-butilamina, perindoprilata, nečistoće Y31, Y32 i Y33 potvrđena je dobra preciznost metode.

Za procenu tačnosti metode injektovani su rastvori laboratorijske smeše pod uslovima prikazanim u poglavlju 3.6.4. Rezultati su dati u tabeli 28.

Tabela 28. Rezultati za procenu tačnosti RP–HPLC metode

Supstanca	Injektovano	Nadeno	RSD (%)	R (%)
Perindopril <i>t</i> -butilamin (mg mL ⁻¹)	0,32 (80 %)	0,332 ± 0,001*	0,222	103,78
	0,4 (100 %)	0,406 ± 0,002	0,566	101,55
	0,48 (120 %)	0,484 ± 0,001	0,308	100,83
Perindoprilat (µg mL ⁻¹)	6,4 (80 %)	6,547 ± 0,103	1,579	102,29
	8 (100 %)	7,953 ± 0,083	1,049	99,54
	9,6 (120 %)	9,824 ± 0,060	0,611	102,33
Y31 (µg mL ⁻¹)	6,4 (80 %)	6,827 ± 0,067	0,974	106,67
	8 (100 %)	8,421 ± 0,123	1,466	105,27
	9,6 (120 %)	9,917 ± 0,038	0,386	103,30
Y32 (µg mL ⁻¹)	3,2 (80 %)	3,125 ± 0,017	0,549	97,66
	4 (100 %)	3,897 ± 0,023	0,581	97,43
	4,8 (120 %)	4,680 ± 0,032	0,676	97,50
Y33 (µg mL ⁻¹)	3,2 (80 %)	3,235 ± 0,038	1,186	101,41
	4 (100 %)	4,033 ± 0,033	0,827	100,83
	4,8 (120 %)	4,836 ± 0,032	0,669	100,75

*Standardna devijacija (SD) (n = 5)

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih vrednosti i izračunavanjem standardne devijacije (SD), relativne standardne devijacije (RSD) i *Recovery* vrednosti (R), za

ispitivane koncentracije rastvora standarda perindopril *t*-butilamina, perindoprilata, nečistoće Y31, Y32 i Y33 potvrđena je dobra tačnost metode.

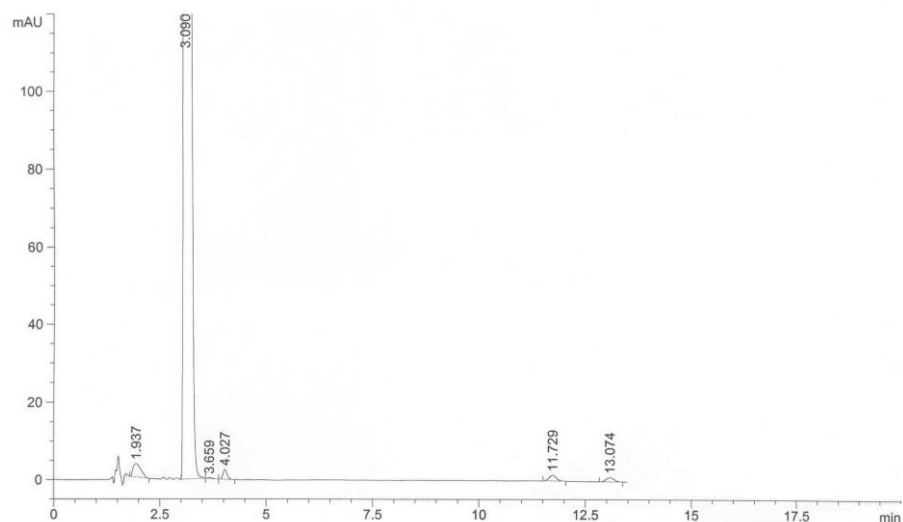
Da bi se metoda primenjivala u kvantitativnoj analizi potrebno je odrediti limite kvantifikacije (LOQ) i limite detekcije (LOD) ispitivanih supstanci (tabela 29). Ako je poznato da odnos signala prema šumu mora biti 3:1 za LOD i 10:1 za LOQ, pripremljeni su rastvori kako je opisano u poglavlju 3.6.5. i injektovani dok dobijeni odgovor (površina pika analiziranih supstanci) nije bio veći 10 puta (za LOQ) odnosno 3 puta (za LOD) od standardne devijacije šuma za šest ponovljenih injektovanja mobilne faze.

Tabela 29. Eksperimentalno određene vrednosti LOD i LOQ

Parametar	Perindopril <i>t</i> -butilamin	Perindoprilat	Y31	Y32	Y33
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,02	0,01	0,05	0,03	0,01
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,04	0,03	0,15	0,06	0,03

Nakon evaluacije kojom je potvrđena pouzdanost njene primene, RP–HPLC metodom je izvršeno određivanje sadržaja aktivne supstance perindopril *t*-butilamina i ispitivanje stepena čistoće u Prexanil[®] tabletama (hromatogram uzorka, slika 19).

Sadržaj aktivne supstance perindopril *t*-butilamina bio je od 103,05 % do 103,83 %, odnosno zahtev specifikacije proizvođača tableta Prexanil[®], *Les Laboratoires Servier*, Francuska: od 90 % do 105 % bio je zadovoljen. Sadržaj nečistoće Y31 od 0,17 % i perindoprilata od 0,30 %, u skladu sa zahtevom specifikacije (ne više od 2 %). Sadržaj nepoznate nečistoće od 0,088 % odgovarao je zahtevu specifikacije za ostale nečistoće, pojedinačno (ne više od 0,25 %). Rezultati kvantitativne analize ispitivanih tableta prikazani su u tabeli 30.



Slika 19. Hromatogram Prexanil® tableta

Tabela 30. Kvantitativna analiza

Supstanca	Injektovano (mg mL ⁻¹)	Nadeno (mg mL ⁻¹)	Nadeno (mg tbl ⁻¹)	RSD (%)	R (%)
Perindopril <i>t</i> -butilamin	0,4	0,414 ± 0,001	4,138 ± 0,009*	0,220	103,45

Supstanca	MDK** (µg mL ⁻¹)	Nadeno (µg mL ⁻¹)	Nadeno (%)
Perindoprilat	8	1,219 ± 0,018*	0,305
Y31	8	0,681 ± 0,024	0,17
Y32	4	Nije detektovana	/
Y33	4	Nije detektovana	/
Nepoznata nečistoća	1	0,351 ± 0,026	0,088

*Standardna devijacija, SD (n = 10)

**MDK – maksimalna dozvoljena koncentracija

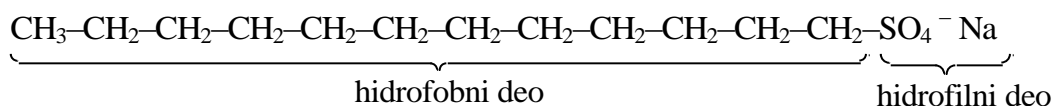
4.2. MIKROEMULZIONA TEČNA HROMATOGRAFIJA ZA FARMACEUTSKU ANALIZU PERINDOPRIL *t*-BUTILAMINA I NJEGOVIH NEČISTOĆA

4.2.1. MIKROEMULZIJE

Mikroemulzije predstavljaju transparentne termodinamički stabilne sisteme, kod kojih je veličina čestica manja ili jednaka 100 nm. U njihov sastav ulaze ulje, voda, surfaktant i kosurfaktant.

Uticaj surfaktanta na formiranje mikroemulzija

Surfaktanti su amfilne supstance i sastoje se od polarne glave i apolarnog repa koji ima veliku molekulsku masu, naročito u slučaju jonskih surfaktanata. Polarni ili hidrofilni deo molekula može biti pozitivno ili negativno naelektrisan, pa shodno tome surfaktanti mogu biti katjonski ili anjonski, ili ga čini polioksietilenski lanac kao u slučaju većine nejonskih surfaktanata. Apolarni ili hidrofobni deo kod većine molekula je fleksibilni ugljovodonični lanac, ali ima i onih kod kojih je taj deo aromatični sistem, kao što je slučaj kod mnogih biološki značajnih jedinjenja sa karakteristikama surfaktanata. Tipičan predstavnik anjonskih surfaktanata je natrijum-dodecilsulfat (eng. *Sodium Dodecil Sulphate* – SDS) – slika 20.



Slika 20. Natrijum-dodecilsulfat

Prisustvo dva dela drastično različite polarnosti u jednom molekulu uzrokuje snižavanje površinskog napona, micelizaciju i solubilizaciju. Do snižavanja površinskog napona u vodenim rastvorima dolazi usled: 1. uticaja molekula surfaktanta na strukturu vode i 2. smanjenja pokretljivosti repa surfaktanta. Molekuli surfaktanta lokalizovaće se na međufazi voda–vazduh ili voda–ulje, tako da će apolarni rep biti orijentisan ka vazduhu, odnosno ulju, a hidrofilna glava ostaje u kontaktu sa vodom. Posledica akumuliranja molekula surfaktanta u vidu jednosloja u međufazi je smanjenje površinskog napona [95].

Prekoračenjem kritične micelarne koncentracije surfaktanta (eng. *Critical Micellar Concentration* – CMC) dolazi do zasićenja međufaze i reorganizacije, tj. molekuli surfaktanta se "samoorganizuju" stvarajući micide. U vodi se formiraju tzv. normalne micide kod kojih je apolarni rep orijentisan ka unutrašnjosti micide, a polarna glava je u kontaktu sa vodom. U apolarnim tečnostima, uljima i alkanima, doći će do stvaranja tzv. reverznih micela kod kojih je polarna glava orijentisana ka unutrašnjosti micide, a apolarni rep je u kontaktu sa rastvaračem.

Surfaktanti koji se koriste za formulaciju i stabilizaciju mogu biti:

- nejonski
- cviterjonski
- katjonski i
- anjonski

Dodatkom surfaktanta u smešu vode i ulja, molekuli surfaktanta lokalizuju se na međufazi voda/ulje, jer je to termodinamički najpovoljnije za postojeći sistem. Mešavina surfaktanta, vode i ulja može da nagradi izotropnu smešu (mikroemulzija, sistem sa strukturom sunđera) ili liotropnu fazu (lamelarna, heksagonalna faza). Na izbor surfaktanta koji će se koristiti za formiranje i stabilizaciju mikroemulzije presudan uticaj ima vrednost hidrofilno–lipofilnog balansa (eng. *Hydrophilic Lipophilic Balance* – HLB) [96]. Opšte je prihvaćeno da surfaktanti čije su HLB vrednosti male (3–6) treba koristiti za formiranje *v/u* mikroemulzija, a surfaktante kod kojih je HLB vrednost velika (8–18) za formiranje *u/v* mikroemulzija.

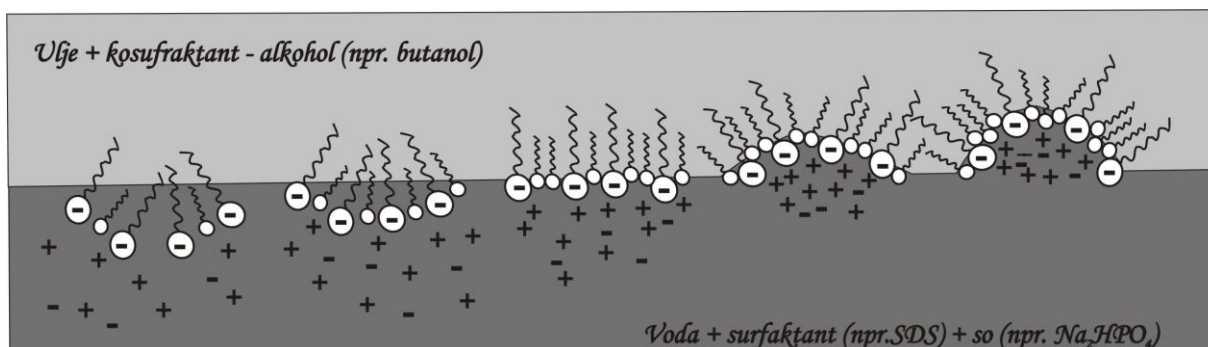
Surfaktanti sa jednim repom najčešće ne mogu sami dovoljno da smanje površinski napon između vode i ulja. U tom slučaju, neće doći do formiranja mikroemulzije [97–102]. Tada se smeši voda, ulje i surfaktant mora dodati kosurfaktant. Najčešće se kao kosurfaktanti dodaju niži alkoholi (dužina alkil lanca do C₅).

Uticaj kosurfaktanta na formiranje mikroemulzije

Veliki broj jedinjenja različitih struktura imaju osobine amfifila. Nemoguće je postaviti jasnu granicu između jedinjenja koja se koriste kao surfaktanti i onih koji se nazivaju kosurfaktanti ili kosolventi. To su obično jedinjenja male molekulske mase koja nikada sama ne bi mogla da formiraju mikroemulziju zbog svoje slabe rastvorljivosti. Kao kosurfaktanti korišćeni su nejonski surfaktanti [103, 104], alkoholi [105], organske kiseline, alkandoli i

alkil amini [106]. Kao model za praćenje ponašanja uzeti su alkoholi, jer su oni najčešći kosurfaktanti kod mikroemulzija koje se koriste u analitici lekova.

Surfaktant i kosurfaktant omogućavaju formiranje stabilnih mikroemulzija, ne samo zbog smanjenja međufaznog napona (γ), nego i zbog uticaja strukture njihovih molekula na zakrivljenost same međufaze, što je shematski prikazano na slici 21.



Slika 21. Uticaj strukture surfaktanta i kosurfaktanta na zakrivljenost međufaze

Ugljovodonični nizovi su veoma blizu "spakovani" u međufazi, dolazi do njihovog međusobnog odbijanja, pa je tendencija da se međufaza savija ka vodenoj fazi. Jonizovane polarne glave jonskih ili nejonskih surfaktanata takođe se odbijaju, pa se javlja tendencija savijanja međufaze ka uljanoj fazi. Dodatak alkohola dovodi do smanjenja odbijanja između polarnih glava surfaktanata. Iz tog razloga, struktura i zakrivljenost međufaze direktno je povezana sa sastavom sistema. Zakrivljenost međufaze mora biti takva da vrednost γ bude najmanja moguća.

Kao što je već rečeno, HLB vrednost surfaktanata ima bitan uticaj na formiranje određenog tipa mikroemulzije. HLB vrednost jonskih surfaktanata (za SDS je veća od 20) pokazuje da su oni veoma hidrofilni. Zato se HLB vrednost surfaktanta mora menjati kako bi se postiglo što veće, odnosno potpuno mešanje uljane i vodene faze sa što manjom količinom surfaktanta. Dodatkom kosurfaktanta efektivna HLB vrednost dovodi se do vrednosti potrebne za formiranje stabilne mikroemulzije.

Polarnost alkohola koji se koristi kao kosurfaktant može direktno uticati na vodenu i uljanu fazu menjajući njihove karakteristike u pogledu sposobnosti solubilizacije, što je veoma značajno za primenu mikroemulzija u separacionim tehnikama u analitici lekova. Alkoholi sa dužim alkil lancem, kao što je *n*-pentanol prodiru u kapi mikroemulzija dublje

dovodeći do povećanja zapremine kapi [107]. Prisustvo *n*-pentanola uglavnom u uljanoj fazi čini mešavina ulja i alkohola ("*pseudocomponent A*") manje hidrofobnom. Kako je delimično rastvoran i u vodi mešavina alkohola i surfaktanta ("*pseudocomponent B*") biće manje hidrofilna. S druge strane *n*-propanol koji se potpuno meša sa vodom dovodi do toga da mešavina alkohola i surfaktanta ("*pseudocomponent B*") postaje hidrofilnija [108]. Ovakvo ponašanje kosurfaktanta ima veliki uticaj na selektivnost kod upotrebe mikroemulzija kao mobilnih faza u tečnoj hromatografiji.

Primena mikroemulzione tečne hromatografije u analitici lekova

U odnosu na konvencionalnu tečnu hromatografiju, mikroemulziona tečna hromatografija (MELC) ima sledeće prednosti:

1. mogućnost istovremene analize jedinjenja i hidrofилnog i hidrofobnog karaktera, zbog velike solubilizirajuće moći mikroemulzije. Za razvoj metode kao početni hromatografski uslovi mogu poslužiti *standardna* mikroemulziona smeša [109, 110] koju čini SDS–*n*-butanol –*n*-oktan–TFA (3,3 % : 6,6 % : 0,8 % : 0,05 % w/v), C18 RP–HPLC kolona kao stacionarna faza, uz brzinu protoka mobilne faze 1 mL min⁻¹ i detekciju na 254 nm.
2. brzu pripremu uzorka i uglavnom kratko vreme trajanja analize. Usled velike solubilizirajuće moći, mikroemulzije daju mogućnost direktne i istovremene solubilizacije hidrofobnih uzoraka i različitih matriksa, kao što su kremovi i masti bez prethodne pripreme uzorka primenom tečno–tečne ekstrakcije ili čvrsto–tečne ekstrakcije [109–112]; surfaktanti imaju sposobnost solubilizacije proteina iz bioloških tečnosti [113, 114].
3. mogućnost analize komponenti koje nemaju jake hromofore i koje zahtevaju detekciju na niskim talasnim dužinama [115]. Većina rastvarača koji se koriste kod konvencionalne tečne hromatografije pokazuju znatnu apsorpciju na niskim talasnim dužinama što zahteva razvoj novih metoda analize ili derivatizaciju ispitivanih komponenti kako bi se obezbedila adekvatna kvantitativna analiza. S druge strane, MELC se može koristiti za analizu jedinjenja čak i na 190 nm.

U slučaju mikroemulzione tečne hromatografije pored uobičajenih retencionih mehanizama, svojstvenih RP–HPLC analizi, do izražaja dolaze i alternativni mehanizmi raspodele. Naime, raspodela analiziranih supstanci između naelektrisanih uljanih kapi i vodene faze, koja je najčešće neki pufer, imaće veliki uticaj na razdvajanje i mora se uvek uzeti u obzir prilikom definisanja sastava mikroemulzionog eluenta. Lipofilne supstance rastvaraće se u uljanoj fazi i naći će se unutar uljanih kapi, dok će supstance rastvorne u vodi

imati afinitet za vodenu fazu. Zbog toga će razdvajanje lipofilnih supstanci biti pod velikim uticajem njihove raspodele između međufaznog filma mikroemulzionih kapi i uljane faze locirane u središtu kapi, a na razdvajanje hidrofilnih supstanci veliki uticaj će, pored osobina vodene faze, imati tip i polarnost stacionarne faze. Čest je slučaj da je stacionarna faza RP–HPLC kolone obložena molekulima surfaktanta prisutnog u mikroemulzionom eluentu što dodatno može uticati na mehanizam raspodele ispitivanih jedinjenja, pre svega hidrofilnog karaktera, sa stacionarnom fazom. Imajući u vidu da i hidrofobni organski rastvarači, koji predstavljaju unutrašnju fazu mikroemulzionog eluenta, mogu u izvesnom stepenu da se vezuju za stacionarnu fazu dovodeći do značajnih promena u njenim karakteristikama, predviđanje hromatografskog ponašanja ispitivanih supstanci i selektivnosti, razdvajanje se u velikoj meri komplikuje.

Jedan od glavnih nedostataka mikroemulzione tečne hromatografije je visok pritisak pri hromatografskoj analizi koji je posledica velike viskoznosti mikroemulzija. Iz tog razloga, kod razdvajanja na C18 RP–HPLC kolonama, protok mobilne faze je limitiran na 1 – 1,5 mL min⁻¹. Ovaj problem može se rešiti upotrebom monolitnih kolona [116] sa kojima se postižu protoci i do 4 mL min⁻¹.

Drugi nedostatak ove tehnike u odnosu na klasičnu RP–HPLC analizu predstavlja dug vremenski period potreban za uspostavljanje ravnoteže u sistemu. U praksi se stabilna bazna linija postiže za oko 1 h pri protoku od 1 mL min⁻¹. Još duže vreme kondicioniranja je potrebno ukoliko se menja neki od parametara, npr. sastav mikroemulzionog eluenta ili temperatura kolone.

4.2.2 OPTIMIZACIJA METODE PRIMENOM MULTIKRITERIJUMSKOG PRISTUPA

Za hromatografsku analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća: perindoprilata, nečistoće Y31, Y32 i Y33 kao mobilna faza izabrana je mikroemulzija ulje u vodi (*o/w*) – L₁. Na osnovu preliminarnih eksperimenata hromatografsko razdvajanje epimera (nečistoće Y32 i Y33) pokazalo se kao moguć problem u postavljanju metode. Iako je osnovni cilj u optimizaciji metode hromatografske analize bio dobijenje adekvatnog faktora rezolucije između navedenog para ispitivanih supstanci, analizirano je i retenciono ponašanje ostalih ispitivanih supstanci. S obzirom na specifične prednosti mikroemulzije kao mobilne faze u tečnoj hromatografiji, očekivalo se da će postizanje definisanih ciljeva – odgovarajući

faktor rezolucije uz adekvatno vreme trajanja analize – biti omogućeno primenom mikroemulzionog eluenta.

Izvedena je serija preliminarnih eksperimenata s ciljem definisanja sastava mikroemulzionog eluenta. Variranje polarnosti unutrašnje faze (oktan, heptan, cikloheksan, diizopropiletar, butilacetat i etilacetat), promena vrste i koncentracije surfaktanata (SDS, AOT, Tween 21 i Brij 35) i kosurfaktanata (*n*-butanol, *n*-pentanol, *n*-propanol, tetrahidrofuran i acetonitril) uticali su na retenciono ponašanje svih ispitivanih supstanci, ali nisu omogućili odgovarajuću rezoluciju kritičnog para (epimerne nečistoće Y32 i Y33). Naime, povećanje lipofilnosti unutrašnje faze ili kosurfaktanta dovelo je do smanjenog zadržavanja ispitivanih analita na koloni, odnosno do smanjenja vrednosti retencionih faktora svih ispitivanih komponenata naročito nečistoće Y31 kao najlipofilnije. Promene vrste i koncentracije surfaktanata imale su isti efekat na hromatografsko ponašanje ispitivanih komponenti. Navedene promene veoma su značajno uticale na smanjenje faktora rezolucije između epimera i u najvećem broju slučajeva dolazilo je do koeluiranja ove dve komponente.

Dalja istraživanja vršena su u smislu izmena unutrašnje faze mikroemulzionog eluenta, tačnije strukture mikroemulzionih kapljica. Istovremeno prisustvo etil-acetata i butil-acetata u unutrašnjoj fazi imalo je pozitivan efekat na razdvajanje epimera. Pretpostavlja se da je to posledica male veličine molekula ovih organskih rastvarača tako da oni ne formiraju jezgro u centru mikroemulzionih kapljica, već prodiru u sloj surfaktanta i na taj način menjaju način vezivanja molekula nečistoća Y32 i Y33 u međufazi. Navedena izmena u strukturi mikroemulzionog eluenta bila je od presudnog značaja za postizanje adekvatnog hromatografskog razdvajanja kritičnog para ispitivanih supstanci.

Na osnovu preliminarnih eksperimenata čiji je cilj bio utvrđivanje odgovarajućeg sastava mikroemulzionog eluenta, zaključeno je sledeće:

- prisustvo etilacetata i butilacetata u unutrašnjoj fazi mikroemulzionog eluenta je od presudnog značaja za hromatografsko razdvajanje epimera, odnosno nečistoća Y32 i Y33
- odgovarajući odnos SDS-a i *n*-butanola obezbediće odgovarajuće razdvajanje između kritičnog para pikova, a da pri tome analiza ne traje predugo, odnosno, da reticioni faktor k_{Y31} ima što manju vrednost
- pH mobilne faze ima značajan uticaj na retenciono ponašanje analita kiselih osobina (perindoprilat, nečistoće Y32 i Y33)

Vodenu fazu činio je 20 mmol L⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata i tokom faze optimizacije sastav vodene faze nije se menjao. Na ovaj način, odabirom nezavisnih faktora postignut je prvi korak u fazi optimizacije metode. Odgovori sistema koje je bilo potrebno istovremeno optimizirati su retencioni faktor perindoprilata - k_{PLAT} , faktor rezolucije između nečistoća Y32 i Y33 – $R_{\text{Y32/Y33}}$ i retencioni faktor nečistoće Y31 – k_{Y31} , s obzirom da su najbolji prikaz karakteristika ispitivanog MELC sistema. Cilj optimizacije metode mikroemulziona tečne hromatografije bio je, kao i kod RP–HPLC metode, da se postigne odgovarajuće razdvajanje kritičnog para pikova, odnosno da vrednost faktora rezolucije $R_{\text{Y32/Y33}}$ bude veća od 1,5, a da pri tome analiza ne traje predugo, odnosno da retencioni faktor k_{Y31} ima što manju vrednost. Takođe, potrebno je optimizacijom metode obezbediti odgovarajuće retenciono ponašanje perindoprilata, odnosno obezbediti da vrednost k_{PLAT} bude što veća.

Sledeća faza ispitivanja bila je odabir odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna kojim će se definisati eksperimenti važni za definisano eksperimentalno područje. Kao najpogodniji izabran je centralni kompozicioni dizajn (CCD) uz primenu 2⁵⁻¹ frakcionog faktorskog dizajna, zvezda dizajna sa nivoima $\alpha = \pm 0,5$ i sa četiri replikacije u centralnoj tački. Imajući u vidu ograničenja kada je u pitanju stabilnost mikroemulzionog eluenta, nije bilo moguće insistirati na pojedinim graničnim vrednostima i postavljanju zvezda dizajna na vrednostima $\alpha > 0,5$. Faktori koji se ispituju, njihovi nivoi kao i matrica eksperimenata za CCD prikazani su u poglavlju 3.7.3. Vrednosti za odgovore sistema koji su praćeni prikazani su u tabeli 31.

Tabela 31. Dobijene vrednosti za izabrane odgovore sistema (hromatografske parametre)

№	Odgovori sistema		
	k_{PLAT}	$R_{Y32/Y33}$	k_{Y31}
1	0,082	0,112	12,80
2	0,836	2,563	12,48
3	0,852	2,605	12,68
4	0,054	0,123	12,42
5	0,794	2,353	10,76
6	0,104	0,067	9,84
7	0,105	0,100	10,17
8	0,835	1,820	9,34
9	0,563	1,142	6,47
10	0,121	0,056	6,35
11	0,130	0,066	6,57
12	0,567	1,115	6,60
13	0,155	0,068	5,71
14	0,566	1,053	5,55
15	0,550	1,012	5,24
16	0,145	0,089	5,54
17	0,271	0,853	8,27
18	0,283	0,807	8,07
19	0,341	0,850	8,22
20	0,334	0,800	8,14
21	0,209	0,870	8,79
22	0,379	0,780	7,79
23	0,396	0,990	9,40
24	0,351	0,660	7,07
25	0,430	1,260	8,32
26	0,194	0,135	8,32
27	0,384	0,886	8,19
28	0,332	0,876	8,14
29	0,349	0,858	8,09
30	0,348	0,795	8,13

k_{PLAT} – retencioni faktor perindoprilata; k_{Y31} – retencioni faktor nečistoće Y31

$R_{Y32/Y33}$ – faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33

Primenom softvera Design–Expert 7.0, a na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti za retencione faktore perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}), izračunati su koeficijenti kvadratnog modela (tabela 32).

Tabela 32. Koeficijenti kvadratnog modela za k_{PLAT} i k_{Y31}

	k_{PLAT}	p -vrednost	k_{Y31}	p -vrednost
b_0	0,33	<0,0001*	8,19	<0,0001*
b_1	0,00019	0,9881	-0,14	0,0002*
b_2	0,00082	0,9464	-0,087	0,0064*
b_3	0,0081	0,5098	-0,89	<0,0001*
b_4	-0,054	0,0014*	-2,64	<0,0001*
b_5	-0,29	<0,0001*	0,017	0,5101
b_{12}	-0,0043	0,7280	0,048	0,0913
b_{13}	0,0059	0,6331	-0,059	0,0441*
b_{14}	0,00031	0,9798	0,15	0,0002*
b_{15}	-0,0058	0,6402	0,005	0,8467
b_{23}	0,00094	0,9395	-0,11	0,0019*
b_{24}	-0,0027	0,8280	0,071	0,0195*
b_{25}	-0,0046	0,7130	0,087	0,0069*
b_{34}	0,0013	0,9154	0,40	<0,0001*
b_{35}	0,012	0,3370	0,029	0,2820
b_{45}	0,08	<0,0001*	0,021	0,4196
b_{11}	-0,15	0,2437	-0,18	0,4941
b_{22}	0,090	0,4773	-0,14	0,5922
b_{33}	-0,084	0,5084	0,30	0,2704
b_{44}	0,23	0,0864	0,077	0,7640
b_{55}	-0,012	0,9249	0,42	0,1342
Model	–	<0,0001*	–	<0,0001*

*značajni članovi modela za nivo pouzdanosti od 95 %

Matematički modeli koji opisuju zavisnost retencionih faktora perindoprilata (k_{PLAT}) i nečistoće Y31 (k_{Y31}) od kodiranih vrednosti faktora x_1 , x_2 , x_3 i x_4 su:

$$\begin{aligned}
 k_{PLAT} = & 0,33 + 0,00019x_1 + 0,00082x_2 + 0,0081x_3 - 0,054x_4 - 0,29x_5 - \\
 & - 0,0043x_1x_2 + 0,0059x_1x_3 + 0,00031x_1x_4 - 0,0058x_1x_5 + 0,00094x_2x_3 - \\
 & - 0,0027x_2x_4 - 0,0046x_2x_5 + 0,0013x_3x_4 + 0,012x_3x_5 + 0,08x_4x_5 - 0,15x_1^2 + \\
 & + 0,09x_2^2 - 0,084x_3^2 + 0,23x_4^2 - 0,012x_5^2
 \end{aligned} \quad (41)$$

$$\begin{aligned}
 k_{31} = & 8,19 - 0,14x_1 - 0,087x_2 - 0,89x_3 - 2,64x_4 + 0,017x_5 + \\
 & + 0,048x_1x_2 - 0,059x_1x_3 + 0,15x_1x_4 + 0,005x_1x_5 - 0,11x_2x_3 + \\
 & + 0,071x_2x_4 + 0,087x_2x_5 + 0,4x_3x_4 + 0,029x_3x_5 + 0,021x_4x_5 - \\
 & - 0,18x_1^2 - 0,14x_2^2 + 0,3x_3^2 + 0,077x_4^2 + 0,42x_5^2
 \end{aligned} \quad (42)$$

Primenom softvera Design–Expert 7.0, a na osnovu eksperimentalno dobijenih vrednosti za faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{Y32/Y33}$), izračunati su koeficijenti polinoma drugog reda (tabela 33).

Tabela 33. Koeficijenti polinoma drugog reda za $R_{Y32/Y33}$

	$R_{Y32/Y33}$	p -vrednost
b_0	0,86	<0,0001*
b_1	-0,036	0,1601
b_2	-0,031	0,2250
b_3	-0,077	0,0070*
b_4	-0,32	<0,0001*
b_5	-0,82	<0,0001*
b_{12}	-0,044	0,0980
b_{13}	-0,027	0,2882
b_{14}	0,039	0,1376
b_{15}	0,034	0,1854
b_{23}	-0,035	0,1810
b_{24}	0,026	0,3168
b_{25}	0,040	0,1307
b_{34}	0,057	0,0378*
b_{35}	0,072	0,0111*
b_{45}	0,31	<0,0001*
Model	–	<0,0001*

*značajni članovi modela za nivo pouzdanosti od 9 5%

Matematički modeli koji opisuju zavisnost faktora rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 ($R_{Y32/Y33}$) od kodiranih vrednosti faktora x_1 , x_2 , x_3 , x_4 i x_5 je:

$$\begin{aligned}
 R_{Y32/Y33} = & 0,86 - 0,036x_1 - 0,031x_2 - 0,077x_3 - 0,32x_4 - 0,82x_5 - \\
 & - 0,044x_1x_2 - 0,027x_1x_3 + 0,039x_1x_4 + 0,034x_1x_5 - 0,035x_2x_3 + \\
 & + 0,026x_2x_4 + 0,04x_2x_5 + 0,057x_3x_4 + 0,072x_3x_5 + 0,31x_4x_5
 \end{aligned} \quad (43)$$

Analizom uticaja ispitivanih faktora (butilacetata, etilacetata, SDS, n -butanola i pH mobilne faze) na posmatrane odgovore sistema moglo se zaključiti da:

① sadržaj butilacetata (faktor x_1 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_1) i etilacetata (faktor x_2 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_2) imaju značajan uticaja na odgovor k_{Y31} . Vrednosti efekata ovih faktora imaju negativan predznak što ukazuje da povećanje ovih faktora dovodi do smanjenja vrednosti k_{Y31} , što je u skladu sa postavljenim ciljevima optimizacije. Ova dva faktora nemaju značajan uticaj na $R_{Y32/Y33}$, odnosno odnos butilacetata i etilacetata neće povećati vrednost ovog odgovora. Njihovo istovremeno prisustvo je bitno za postizanje odgovarajuće vrednosti $R_{Y32/Y33}$, ali promena odnosa ova dva faktora nema nikakvog daljeg uticaja.

② sadržaj SDS (faktor x_3 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_3) i sadržaj n -butanola (faktor x_4 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_4) značajno utiče na sva tri

posmatrana odgovora sistema (k_{PLAT} , k_{Y31} i $R_{\text{Y32/Y33}}$) i veoma je teško proceniti koje vrednosti ovih faktora treba odabrati kako bi se zadovoljili svi postavljeni ciljevi optimizacije. Naime, povećanjem sadržaja SDS dolazi do poželjnog povećanja vrednosti za k_{PLAT} (vrednost efekta ovog faktora ima pozitivan predznak) i smanjenja vrednosti za k_{Y31} (vrednost efekta ovog faktora ima negativan predznak), ali istovremeno i do nepoželjnog smanjenja vrednosti za $R_{\text{Y32/Y33}}$ (vrednost efekta ovog faktora ima negativan predznak). S druge strane, vrednost efekta ovog faktora ima negativan predznak što ukazuje da se smanjenjem sadržaja *n*-butanola postiže poželjno povećanje vrednosti za k_{PLAT} i vrednosti faktora rezolucije kritičnog para ispitivanih jedinjenja ($R_{\text{Y32/Y33}}$), ali ujedno dolazi i do nepoželjnog povećanja vrednosti za k_{Y31} .

③ pH mobilne faze (faktor x_5 a efekat je predstavljen sa koeficijentom b_5) je faktor koji ima značajan uticaj na k_{PLAT} i $R_{\text{Y32/Y33}}$. Povećanje vrednosti ovog faktora dovešće do smanjenja vrednosti ova dva odgovora, što je u suprotnosti sa definisanim ciljevima optimizacije (vrednost efekta ovog faktora ima negativan predznak).

Kako bi se definisali optimalni uslovi za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća potrebno je istovremeno pratiti više odgovora koji imaju suprotne ciljeve (povećanje rezolucije kritičnog para – $R_{\text{Y32/Y33}}$) za što je moguće kraće vreme (smanjenje k_{Y31}). Definisani optimum mora biti kompromis, odnosno kombinacija ispitivanih faktora mora biti takva da analizirani odgovori imaju zadovoljavajuću vrednost. Zato je za istovremenu optimizaciju vrednosti faktora u cilju dobijanja zadovoljavajućih vrednosti više odabranih odgovora primenjena metoda multikriterijumske optimizacije i to Deringerova funkcija poželjnih odgovora.

U tabeli 34 prikazani su definisani: 1. prihvatljivi opsezi za ispitivane faktore, 2. za izabrane odgovore ciljevi koje treba postići multikriterijumskom optimizacijom. Oblik funkcije poželjnih odgovora za svaki od posmatranih odgovora sistema definisan je odabranim vrednostima težinskih koeficijenata. Utvrđene su i vrednosti koeficijenata značajnosti jer se koriste za izračunavanje globalnog optimuma (tabela 34).

Tabela 34. Usvojene granične vrednosti za određivanje globalnog optimuma

		Cilj	Opseg		Težinski koeficijenti	Koeficijent značajnosti
Faktori	Butilacetat (% w/v)	u opsegu	0,2	0,3	–	3
	Etilacetat (% w/v)	u opsegu	0,3	0,5	–	3
	SDS (% w/v)	minimizirati	2	2,5	–	3
	<i>n</i> -butanol (% w/v)	u opsegu	7	8	–	4
	pH mobilne faze	u opsegu	3,7	4,7	–	5
Odgovori	k_{PLAT}	maksimizirati	0,5	0,852	$s = 0,1$	3
	$R_{Y32/Y33}$	maksimizirati	1,2	1,5	$s = 0,3$	5
	k_{Y31}	minimizirati	6	8	$s = 0,1$	4

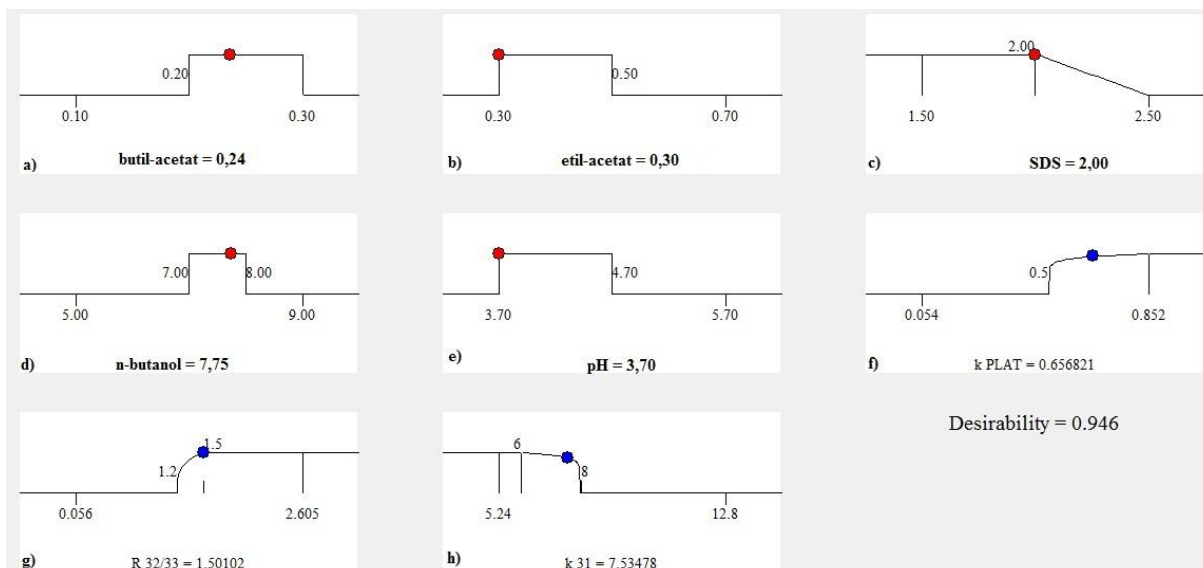
Za odgovor k_{PLAT} kao cilj postavljena je maksimizacija. Limiti su postavljeni tako da je svaka vrednost manja od 0,5 potpuno neprihvatljiva i njoj se dodeljuje vrednost $d_i = 0$. Svako povećanje vrednosti k_{PLAT} u odnosu na minimalnu vrednost 0,5 poboljšavaće globalni optimum.

Za odgovor $R_{Y32/Y33}$ limiti su definisani tako da svaka vrednost faktora rezolucije kritičnog para koja je manja od 1,2 dobija vrednost $d_i = 0$ a svaka vrednost veća od 1,5 dobija vrednost 1. Vrednosti faktora rezolucije kritičnog para između 1,2 i 1,5 imaju d_i vrednosti između 0 i 1.

Za odgovor k_{Y31} kao cilj je postavljena minimizacija, tako da se svaka vrednost veća od 8 smatra neprihvatljivom i dodeljuje joj se vrednost $d_i = 0$. Vrednosti za odgovor k_{Y31} koje su manje od 6 smatraju se zadovoljavajućim i njima se dodeljuje vrednost $d_i = 1$. Vrednosti ovog odgovora između 8 i 6 imaju d_i vrednosti između 0 i 1.

Definisani limiti, težinski koeficijenti i koeficijenti značajnosti za ispitivane faktore i posmatrane odgovore sistema obrađeni su Design–Expert[®] softverom i na taj način utvrđena kombinacija faktora koja daje najbolji globalni optimum $D = 0,946$. Predviđen optimalni sastav mobilne faze je: 0,24 % m/V butilacetat, 0,30 % m/V etilacetat, 2 % m/V SDS, 7,75 % m/V *n*-butanol i 20 mol L⁻¹ rastvor kalijum-dihidrogenfosfata. pH mobilne faze treba podesiti na 3,70. Za navedene uslove, softverom predviđene vrednosti posmatranih odgovora sistema iznosile su: $k_{PLAT} = 0,656$; $R_{Y32/Y33} = 1,5$ i $k_{Y31} = 7,5$.

Grafički prikaz dobijenih optimalnih uslova, kao i softverom predviđenih odgovora dat je na slici 22.



Slika 22. Grafički prikaz optimalnih hromatografskih uslova: a) sadžaj butilacetata, b) sadržaj etilacetata; c) sadržaj SDS-a, d) sadržaj *n*-butanola i e) pH mobilne faze, kao i predviđenih odgovora sistema: f) k_{PLAT} ; g) $R_{Y32/Y33}$ h) k_{Y31}

Imajući u vidu da funkcija poželjnih odgovora uključuje subjektivne parametre kao što su *i*) koeficijenti značajnosti za odgovore sistema koji se prate (k_{PLAT} , $R_{Y32/Y33}$ i k_{Y31}) i koji se koriste za izračunavanje globalnog optimuma, *ii*) težinske koeficijente koji određuju oblik individualnih odgovora i *iii*) opsege odgovora sistema, koje specificira analitičar (eng. *user specified*), neophodno je ispitati prihvatljivost i osetljivost ovih parametara kada su u pitanju željene vrednosti odgovora sistema. Za ispitivanje prihvatljivosti i osetljivosti navedenih parametara u odnosu na željene vrednosti odgovora sistema, primenjena je analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora koja uz statističku podršku pruža uvid u efekat promena parametara na robusnost globalnog optimuma.

Odabrano je devet faktora kojima su dodeljene granične vrednosti (tabela 35), a plan eksperimenata za analizu osetljivosti funkcije poželjnih odgovora definisan je primenom *Plackett–Burman* dizajna (tabela 36). U tabeli 37 prikazane su dobijene vrednosti za globalni optimum, kao i odgovarajuće vrednosti ulaznih faktora i odgovora sistema.

Tabela 35. Analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora – faktori i njihovi nivoi

Faktor	Nivoi	
	niži	viši
Koeficijent značajnosti za k_{PLAT}	1	5
Koeficijent značajnosti za $R_{Y32/Y33}$	1	5
Koeficijent značajnosti za k_{Y31}	1	5
<i>Dummy 1</i>	-1	+1
Težina za k_{PLAT}	0,1	0,5
Težina za $R_{Y32/Y33}$	0,1	0,5
Težina za k_{Y31}	0,1	0,5
<i>Dummy 2</i>	-1	+1
Opseg za k_{PLAT}	0,6 – 0,852	0,5 – 0,852
Opseg za $R_{Y32/Y33}$	1,3 – 1,5	1,2 – 1,5
Opseg za k_{Y31}	7 – 8	6 – 8

S obzirom na veliki broj faktora koje je potrebno ispitati analizom osetljivosti funkcije poželjnih odgovora, primenjen je dizajn koji ispituje faktore na dva nivoa. U ovom radu odabran je *Plackett–Burman* dizajn koji daje mogućnost ispitivanja velikog broja faktora kroz relativno mali broj eksperimenata. Plan eksperimenta definisan primenom softvera Design–Expert 7.0 i dvanaest eksperimenata je prikazano u tabeli 36.

Tabela 36. Analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora – Plan *Plackett–Burman* dizajna

Broj	Kodirane vrednosti za ispitivane faktore										
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

A – koeficijent značajnosti za k_{PLAT} ; B – koeficijent značajnosti za $R_{Y32/Y33}$; C – koeficijent značajnosti za k_{Y31} ;

D – *Dummy* 1; E – težina za k_{PLAT} ; F – težina za $R_{Y32/Y33}$; G – težina za k_{Y31} ; H – *Dummy* 2; J – opseg za k_{PLAT} ; K – opseg za $R_{Y32/Y33}$; L – opseg za k_{Y31}

Tabela 37. Vrednosti faktora i odgovora sistema, kao i odgovarajućeg globalnog optimuma (D)

№	D	Dobijene vrednosti								
		Ulazni faktori					Odgovori			
		1	2	3	4	5	k_{PLAT}	$R_{Y32/Y33}$	k_{Y31}	
1	0,796	0,20	0,30	2,0	7,76	3,70	0,673	1,500	7,580	
2	0,744	0,24	0,30	2,0	7,91	3,70	0,661	1,450	7,328	
3	0,898	0,23	0,30	2,0	8,0	3,70	0,670	1,420	7,215	
4	0,930	0,23	0,30	2,0	7,88	3,70	0,664	1,459	7,369	
5	0,939	0,21	0,30	2,0	8,0	3,70	0,681	1,423	7,261	
6	0,894	0,27	0,30	2,0	8,0	3,70	0,605	1,418	7,082	
7	0,716	0,20	0,30	2,0	8,0	3,70	0,682	1,423	7,273	
8	0,963	0,20	0,30	2,0	7,72	3,70	0,673	1,514	7,642	
9	0,947	0,28	0,30	2,0	8,0	3,70	0,599	1,418	7,070	
10	0,948	0,23	0,30	2,0	8,0	3,70	0,674	1,422	7,231	
11	0,853	0,22	0,30	2,0	8,0	3,70	0,679	1,422	7,247	
12	0,968	0,22	0,30	2,0	7,92	3,70	0,673	1,448	7,343	

1 – butilacetat (% w/v); 2 – etilacetat (% w/v); 3 – SDS (% w/v); 4 – *n*-butanol (% w/v); 5 – pH mobilne faze; k_{PLAT} – retencioni faktor perindoprilata; k_{Y31} – retencioni faktor nečistoće Y31; $R_{Y32/Y33}$ – faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33

Rezultati dobijenih standardizovanih efekata prikazani su u tabeli 38.

Tabela 38. Izračunati standardizovani efekti

Faktori	Standardizovani efekti
Koeficijent značajnosti za k_{PLAT}	-0,042
Koeficijent značajnosti za $R_{Y32/Y33}$	0,01
Koeficijent značajnosti za k_{Y31}	0,01
<i>Dummy 1</i>	0,007
Težina za k_{PLAT}	-0,11
Težina za $R_{Y32/Y33}$	-0,021
Težina za k_{Y31}	-0,056
<i>Dummy 2</i>	0,032
Opseg za k_{PLAT}	0,076
Opseg za $R_{Y32/Y33}$	-0,019
Opseg za k_{Y31}	-0,060

Uvidom u izračunate vrednosti standardizovanih efekata, može se zaključiti da je najosetljiviji parametar težinski koeficijent za maksimizaciju retencionog faktora perindoprilata (k_{PLAT}). Negativni predznak ovog efekta ukazuje da povećanje vrednosti težinskog koeficijenta za k_{PLAT} dovodi do smanjenja vrednosti globalnog optimuma, što ukazuje da je postavljanje vrednosti za ovaj koeficijent na 0,1 u fazi optimizacije pri definisanju globalnog optimuma bilo ispravno. Takođe, pokazalo se da su koeficijenti značajnosti za $R_{Y32/Y33}$ i k_{Y31} najmanje osetljivi, kao i da ostali ispitivani faktori imaju veoma slične osetljivosti.

Predloženi postupak analize osetljivosti funkcije poželjnih odgovora karakterističnih parametara funkcije poželjnih odgovora i njihovog uticaja na globalni optimum hromatografskog sistema pokazao se kao veoma koristan. U skladu sa vrednostima izračunatih standardizovanih efekata prikazanih u tabeli 38 i usvojenih graničnih vrednosti za određivanje globalnog optimuma (tabela 34) može se zaključiti da su prioriteti u fazi optimizacije metode adekvatno postavljeni. Sprovedena analiza osetljivosti funkcije poželjnih odgovora potvrdila je da veće vrednosti globalnog optimuma ne znače uvek i bolje rešenje u postavljanju optimalnih hromatografskih uslova (tabela 37). Tačnost predviđanja se može dovesti u pitanje ukoliko se za optimalne nivoe ulaznih faktora, dobijenih za različite eksperimente definisanog eksperimentalnog dizajna, dobiju jednake vrednosti odgovora uz istovremeno različite vrednosti globalnog optimuma [37], što nije bio slučaj kod optimizacije MELC metode za hromatografsku analizu perindorpil *t*-butilamina i njegovih nečistoća, čime je potvrđena adekvatnost u predviđanju optimalnih hromatografskih uslova. Optimalni uslovi primenjeni za mikroemulzionu hromatografsku analizu perindorpil *t*-butilamina i njegovih nečistoća su:

<i>Hromatografski sistem</i>	Waters Breeze, SAD
<i>Kolona</i>	Nucleosil 120–5 C ₄ , 250 mm x 4,0 mm, 5 μm
<i>Mobilna faza</i>	butilacetat–etilacetat–SDS– <i>n</i> -butanol–20 mmol L ⁻¹ kalijum-dihidrogenfosfat pH 3,70 (0,24 m/V : 0,30 m/V : 2,00 m/V : 7,75 m/V : 89,71 m/V)
<i>Temperatura</i>	40 °C
<i>Talasna dužina</i>	254 nm
<i>Protok</i>	1,25 mL min ⁻¹
<i>Injekciona zapremina</i>	20 μL
<i>Rastvarač</i>	mobilna faza

4.2.3. PROCENA ROBUSNOSTI METODE PRIMENOM

PLACKETT–BURMAN DIZAJNA

Za procenu robusnosti MELC metode za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća primenjen je *Plackett–Burman* dizajn koji omogućava istovremeno praćenje i procenu većeg broja hromatografskih faktora izvođenjem malog broja eksperimenata, kao i odgovarajuću grafičku i statističku podršku.

Izabrano je osam realnih faktora (butilacetat (% m/V); etilacetat (% m/V); SDS (% m/V); butanol (% m/V); rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L⁻¹); pH mobilne faze; protok (mL min⁻¹); temperatura (°C)) čiji je uticaj na hromatografski sistem ispitivan, a tri veštačka faktora su dodata kako bi se kompletirali podaci potrebni za pravljenje plana eksperimenta, kao i za dalja izračunavanja. Faktori koji se ispituju i njihovi nivoi prikazani su u poglavlju 3.8.3 u tabeli 12. Plan eksperimenta definisan je primenom softvera Design Expert 7.0 i dvanaest eksperimenata je prikazano u poglavlju 3.8.4 u tabeli 13.

Kao odgovori sistema praćeni su parametri koji karakterišu razdvajanje ispitivanih supstanci, zadržavanje ispitivanih jedinjenja na stacionarnoj fazi kolone (retencioni faktor – *k*; faktor selektivnosti – *α*; faktor rezolucije – *R*; simetrija pika – *S_y*), kao i kvantifikaciju (površina pika – *A*). Izvršena je analiza 28 odgovora sistema čije su vrednosti prikazane u tabeli 39.

Tabela 39. Dobijene vrednosti za izabrane odgovore sistema*

Eksperiment / Odgovor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
k₁	0,66	0,75	0,77	0,76	0,64	0,59	0,58	0,71	0,63	0,59	0,94	0,75
k₂	1,57	1,72	1,63	1,85	1,47	1,32	1,54	1,75	1,68	1,56	1,71	1,59
k₃	2,51	2,73	2,80	2,73	2,42	2,24	2,30	2,69	2,69	2,39	2,52	2,94
k₄	2,69	2,95	3,01	2,92	2,62	2,50	2,53	2,89	2,91	2,62	2,71	3,12
k₅	4,40	4,74	4,97	4,77	4,48	4,15	4,04	4,42	4,71	3,98	4,45	4,89
k₆	6,37	6,87	7,11	7,08	6,66	5,68	5,86	6,53	6,67	5,73	6,17	6,99
Sy₁	1,03	1,04	1,12	1,10	1,16	1,26	1,01	1,20	1,22	1,14	1,19	1,20
Sy₂	1,12	0,99	0,94	1,10	0,92	1,15	0,97	0,94	0,94	1,12	0,98	1,08
Sy₃	0,90	0,93	0,92	0,95	0,94	1,01	0,92	0,94	0,94	0,90	0,95	0,96
Sy₄	0,96	0,94	0,98	1,04	0,99	1,05	0,94	0,93	0,98	1,07	0,92	0,97
Sy₅	1,35	1,46	1,48	1,42	1,35	1,32	1,36	1,46	1,39	1,41	1,42	1,47
Sy₆	1,20	1,13	1,27	1,15	1,25	1,02	1,06	1,11	1,12	1,13	1,04	1,05
R₁	7,23	6,65	6,56	6,79	5,88	5,99	6,36	6,90	7,53	7,41	6,34	6,99
R₂	5,07	5,19	5,06	5,71	6,35	5,78	5,11	5,57	5,60	5,52	5,12	5,31
R₃	1,13	1,22	1,29	1,28	1,39	1,34	1,46	1,27	1,15	1,13	1,22	1,26
R₄	3,26	4,06	3,03	3,74	3,99	4,12	4,24	4,12	3,82	4,03	4,50	4,56
R₅	2,93	3,42	2,79	3,52	3,22	2,99	3,55	3,58	3,56	3,59	3,63	2,99
a₁	2,38	2,29	2,12	2,43	2,30	2,24	2,66	2,46	2,67	2,64	1,82	2,12
a₂	1,60	1,59	1,72	1,48	1,65	1,70	1,49	1,54	1,60	1,53	1,47	1,85
a₃	1,07	1,08	1,08	1,07	1,08	1,12	1,10	1,07	1,08	1,10	1,08	1,06
a₄	1,64	1,61	1,65	1,63	1,71	1,66	1,60	1,53	1,62	1,52	1,64	1,57
a₅	1,45	1,45	1,43	1,48	1,49	1,37	1,45	1,48	1,42	1,44	1,39	1,43
A₁	58976	57665	62734	64562	59234	57890	56432	63121	51239	59753	64321	60985
A₂	1238	1256	1353	1426	1264	1274	1206	1402	1176	1242	1467	1286
A₃	1804	1726	1874	1991	1826	1761	1698	1921	1567	1824	1987	1812
A₄	9876	9321	10125	10751	10024	9439	8982	10268	8399	10113	10874	9978
A₅	5235468	5123567	5330559	5565385	5284201	5121209	5072681	5437372	4750769	5254202	5601020	5234567
A₆	19560	19324	20213	21664	19782	19784	18456	20964	17331	19123	21345	19876

k₁ – retencioni faktor perindoprilata, k₂ – retencioni faktor nepoznate nečistoće, k₃ – retencioni faktor nečistoće Y32, k₄ – retencioni faktor nečistoće Y33,

k₅ – retencioni faktor perindopril t-butlamina, k₆ – retencioni faktor nečistoće Y31; Sy₁ – faktor simetrije perindoprilata, Sy₂ – faktor simetrije nepoznate nečistoće,

Sy_3 – faktor simetrije nečistoće Y32, Sy_4 – faktor simetrije nečistoće Y33, Sy_5 – faktor simetrije perindopril *t*-butlamina, Sy_6 – faktor simetrije nečistoće Y31;
 R_1 – rezolucija između nepoznate nečistoće i perindoprilata, R_2 – rezolucija između nepoznate nečistoće i nečistoće Y32, R_3 – rezolucija između nečistoće Y32 i nečistoće Y33, R_4 – rezolucija između nečistoće Y33 i perindopril *t*-butlamina, R_5 – rezolucija između perindopril *t*-butlamina i nečistoće Y31; α_1 – faktor selektivnosti između nepoznate nečistoće i perindoprilata, α_2 – faktor selektivnosti između nepoznate nečistoće i nečistoće Y32, α_3 – faktor selektivnosti između nečistoće Y32 i nečistoće Y33, α_4 – faktor selektivnosti između nečistoće Y33 i perindopril *t*-butlamina, α_5 – faktor selektivnosti između perindopril *t*-butlamina i nečistoće Y31; A_1 – površina pika perindoprilata, A_2 – površina pika nepoznate nečistoće, A_3 – površina pika nečistoće Y32, A_4 – površina pika nečistoće Y33, A_5 – površina pika perindopril *t*-butlamina, A_6 – površina pika nečistoće Y31.

Efekti ispitivanih faktora izračunati su primenom softvera Design-Expert 7.0, i njihove vrednosti prikazane su u tabeli 40.

Tabela 40. Vrednosti dobijenih faktorskih efekata, kritičnog efekta ($E_{kritično}$) i granice greške (*margin of error* – ME)

Faktor / Odgovor*	Butilacetat (% w/v)	Etilacetat (% w/v)	SDS (% w/v)	Dummy 1	Butanol (% w/v)	Pufer (mM)	Dummy 2	pH mobilne faze	Protok (mL min ⁻¹)	T (°C)	Dummy 3	E _{critical} (α=0,05)	E _{critical} (α=0,01)	ME (0,975, m)	ME (0,975, m)
k₁	0,035	-0,028	0,042	0,045	0,048	-0,035	-0,022	-0,045	-0,16	-0,0083	0,028	0,0780	0,1475	0,0794	0,1129
k₂	0,062	0,15	-0,018	0,025	0,055	0,015	-0,078	0,035	-0,18	-0,032	0,028	0,1176	0,2224	0,0988	0,1419
k₃	0,010	0,087	-0,097	0,023	-0,090	0,003333	-0,030	-0,050	-0,31	-0,20	-0,063	0,0998	0,1888	0,1905	0,2709
k₄	0,001667	0,082	-0,095	0,028	-0,10	0,028	-0,025	-0,048	-0,29	-0,18	-0,062	0,0985	0,1863	0,1817	0,2584
k₅	-0,003333	0,006667	-0,093	0,11	-0,040	0,13	0,053	-0,11	-0,41	-0,41	-0,006667	0,1661	0,3142	0,1756	0,2523
k₆	-0,050	0,13	-0,24	0,12	0,050	0,14	0,12	0,037	-0,63	-0,67	-0,023	0,2327	0,4401	0,2716	0,3903
Sy₁	0,052	0,24	-0,14	0,11	0,13	-0,018	-0,32	0,12	-0,015	0,29	0,20	0,5340	1,0101	0,3928	0,5543
Sy₂	0,015	0,27	-0,14	-0,075	-0,062	0,11	-0,092	0,18	0,28	0,015	-0,048	0,1739	0,3290	0,3224	0,4550
Sy₃	-0,063	-0,090	-0,037	-0,017	-0,11	-0,010	0,063	-0,067	-0,013	-0,097	-0,057	0,1177	0,2227	0,1442	0,2035
Sy₄	-0,005	-0,008333	0,008333	0,001667	-0,005	0,012	0,001667	0,001667	0,018	0,018	0,001667	0,0039	0,0074	0,0209	0,0295
Sy₅	-0,003333	-0,047	0,017	0,020	0,047	0,027	0,037	-0,017	0,020	-0,043	0,033	0,0726	0,1374	0,0691	0,0975
Sy₆	-0,006667	0,027	-0,027	-0,006667	0,023	-0,013	0,010	0,043	-0,006667	-0,020	-0,003333	0,0169	0,0321	0,0453	0,0639
R₁	0,012	0,025	0,015	0,058	0,022	-0,005	0,072	0,068	0,005	-0,092	-0,025	0,1301	0,2461	0,1024	0,1444
R₂	0,20	0,73	0,001667	0,018	-0,35	-0,15	-0,37	-0,14	0,028	-0,22	-0,30	0,6476	1,2250	0,6682	0,9430
R₃	-0,39	-0,012	-0,14	0,048	-0,048	-0,082	0,11	0,21	0,25	-0,14	0,48	0,6722	1,2715	0,4930	0,6957
R₄	-0,017	-0,13	-0,060	-0,057	0,043	0,057	0,023	0,083	0,010	0,023	0,027	0,0912	0,1725	0,1292	0,1823
R₅	-0,25	-0,23	-0,35	-0,10	0,018	-0,24	-0,38	-0,20	-0,092	0,44	0,18	0,5872	1,1107	0,5649	0,7972
α₁	-0,022	-0,035	0,001667	0,012	-0,10	-0,028	-0,008333	-0,035	-0,005	0,001667	0,098	0,1346	0,2546	0,0473	0,0680
α₂	-0,078	0,028	0,095	-0,078	-0,015	-0,012	-0,022	-0,045	0,032	0,008333	-0,032	0,1184	0,2239	0,1090	0,1538
α₃	-0,020	-0,023	0,000	-0,017	0,013	0,013	0,003333	-0,020	-0,006667	0,006667	0,033	0,0506	0,0958	0,0372	0,0525
α₄	-0,058	0,012	0,045	-0,001667	-0,032	0,015	-0,012	0,022	0,035	-0,012	0,008333	0,020	0,0378	0,0522	0,0742
α₅	0,005	0,015	-0,015	0,022	-0,028	-0,005	-0,008333	0,012	-0,088	-0,005	-0,028	0,0497	0,0940	0,0372	0,0529
A₁	-544,33	-1046,67	3260,00	-1170,00	911,33	-2644,67	388,00	2460,00	-4977,33	242,00	637,00	1884,95	3565,63	3720,13	5291,34
A₂	15,67	-18,33	68,33	-12,33	20,67	-34,67	-2,67	32,67	-131,67	17,33	71,33	98,41	186,15	81,85	116,41
A₃	-14,83	-20,83	115,17	-30,50	45,50	-92,83	5,50	79,50	-138,50	7,17	52,50	82,82	156,67	154,04	217,37
A₄	-183,67	-115,67	701,00	-73,00	251,00	-686,00	-7,33	396,00	-747,33	-26,00	226,67	323,66	612,25	901,38	1272,0
A₅	-25877,00	-46245,67	200800,0	-53727,33	125600,0	-180400,0	8958,67	146300,0	-262300,0	34850,33	84818,67	136897,5	258959,2	79089,08	111608,67
A₆	-280,67	-248,33	992,67	-531,00	473,33	-646,33	305,33	497,00	-1558,33	95,00	719,67	1283,85	2428,57	1534,28	2165,14

*Odgovori sistema su objašnjeni u fusnoti za tabelu 39.

Statistička procena faktorskih efekata je preciznija i omogućava definisanje limita za pojedine faktore. Zasniva se na statističkom t -testu. Za izračunavanje standardne greške efekata, neophodne za određivanje t vrednosti, opisane su različite metode (v. poglavlje 1.3.6.2.2), od kojih su u radu primenjene metoda kod koje se procena vrši na osnovu beznačajnih efekata (efekata veštačkih faktora) i metoda koja se bazira na primeni *Dong*-ovog algoritma [58]. U oba slučaja su za izračunavanje eksperimentalnih t vrednosti primenjivani nivoi značajnosti $\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$. Značajni efekti izračunati na opisan način prikazani su u tabeli 41.

Tabela 41. Procena faktorskih efekata

Odgovor*	značajni efekti za $\alpha = 0,05$ (dobijeni poređenjem sa kritičnim efektom izračunatim na osnovu beznačajnih efekata)	značajni efekti za $\alpha = 0,01$ (dobijeni poređenjem sa kritičnim efektom izračunatim na osnovu beznačajnih efekata)	značajni efekti za $\alpha = 0,05$ (na osnovu Dong-ovog algoritma)	značajni efekti za $\alpha = 0,01$ (na osnovu Dong-ovog algoritma)	značajni efekti na osnovu <i>half-normal probability</i> grafikona	značajni efekti na osnovu <i>Pareto</i> dijagrama
k_1	K	K	K	K	K	K
k_2	B + K	–	B + K	–	B + K	B + K
k_3	K + L	K + L	K + L	K	K + L	K + L
k_4	E + K + L	K	K	K	K + L	K + L
k_5	K + L	K + L	K + L	K + L	K + L	K + L
k_6	D + K + L	K + L	K + L	K + L	K + L	K + L
Sy_1	–	–	–	–	–	–
Sy_2	B + H + K	–	–	–	B + K	B + K
Sy_3	–	–	–	–	–	–
Sy_4	A + B + D + E + G + K + L	B + D + G + K + L	–	–	K + L	K + L
Sy_5	–	–	–	–	–	–
Sy_6	B + D + E + H + L	H	–	–	H	H
R_1	–	–	–	–	L	L
R_2	B	–	B	–	B	B
R_3	–	–	–	–	–	–
R_4	B	–	B	–	B	B
R_5	–	–	–	–	–	–
α_1	–	–	E + J	E + J	E	E
α_2	–	–	–	–	A + C + D	A + C + D
α_3	–	–	–	–	–	–
α_4	A + D + E + H + K	A + D	A	–	A	A
α_5	K	–	K	K	K	K
A_1	D + G + H + K	K	K	–	D + K	D + K
A_2	K	–	K	K	K	K
A_3	D + G + K	–	–	–	D + G + H + K	D + G + H + K
A_4	G + H + K	G + K	–	–	D + G + H + K	D + G + H + K
A_5	D + G + H + K	K	D + E + G + H + J + K	D + E + G + H + K	D + E + G + H + K	D + E + G + H + K
A_6	K	–	K	–	K	K

*Odgovori sistema su objašnjeni u fusnoti za tabelu 39.

Nakon procene značajnosti efekata, postavlja se pitanje u kom intervalu nivoa faktor čiji je efekat značajan na ponašanje hromatografskog sistema, treba kontrolisati da bi se faktorski efekat eliminisao. Intervali "neznačajnosti" za značajne efekte [44], izračunati su osim za kvantitativne faktore (koncentracija pufera, pH mobilne faze i temperatura kolone), za faktore smeše (koncentracija etilacetata, butilacetata, butanola i SDS-a), kao i za procesne faktore (brzina protoka mobilne faze), za koji je prethodnim istraživanjem utvrđena značajnost. Rezultati su prikazani u tabeli 42.

Tabela 42. Intervali "neznačajnosti" za značajne faktore

Odgovor*	Značajan faktor	Interval "neznačajnosti" dobijen na osnovu kritičnog efekta za $\alpha = 0,05$
k ₁	K	1,23 – 1,27
k ₂	B	0,27 – 0,33
	K	1,22 – 1,28
k ₃	L	37,5 – 42,5
	K	1,23 – 1,27
k ₄	E	7,65 – 7,85
	K	1,23 – 1,27
	L	37,26 – 42,74
k ₅	K	1,23 – 1,27
	L	37,97 – 42,03
k ₆	D	1,9 – 2,1
	K	1,23 – 1,27
	L	38,26 – 41,74
Sy ₁	–	–
Sy ₂	B	0,27 – 0,33
	H	3,6 – 3,8
Sy ₃	K	1,22 – 1,28
	–	–
Sy ₄	A	0,21 – 0,27
	B	0,28 – 0,32
	D	1,95 – 2,05
	E	7,67 – 7,83
	G	19,8 – 20,2
	K	1,24 – 1,26
Sy ₅	L	38,9 – 41,1
	–	–
Sy ₆	B	0,27 – 0,33
	D	1,94 – 2,06
	E	7,68 – 7,82
	H	3,66 – 3,74
	L	35,8 – 44,2
R ₁	–	–
R ₂	B	0,26 – 0,34
R ₃	–	–
R ₄	B	0,27 – 0,33
R ₅	–	–
a ₁	E	7,74 – 7,76
a ₂	–	–
a ₃	–	–
a ₄	–	–
a ₅	–	–
A ₁	D	1,94 – 2,06
	G	19,6 – 20,4
	H	3,62 – 3,78
	K	1,23 – 1,27
A ₂	K	1,21 – 1,29
A ₃	D	1,92 – 2,08
	G	19,6 – 20,4
	K	1,22 – 1,28
A ₄	G	19,8 – 20,2
	H	3,62 – 3,78
	K	1,23 – 1,27
A ₅	D	1,93 – 2,07
	E	7,65 – 7,85
	G	19,6 – 20,4
	H	3,61 – 3,79
A ₆	K	1,22 – 1,28
A ₆	–	–

*Odgovori sistema su objašnjeni u fusnoti za tabelu 39.

* A – butilacetat (% m/V); B – etilacetat (% m/V); D – SDS (% m/V); E – *n*-butanol (% m/V); G – rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (mmol L⁻¹); H – pH mobilne faze; K – protok (mL min⁻¹); L – temperatura (°C)

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je metoda osetljiva na promene sadržaja butilacetata, etilacetata, SDS-a, butanola i rastvora kalijum-dihidrogenfosfata u mobilnoj fazi kao i vrednosti pH mobilne faze. Vrednosti navedenih faktora moraju se održavati u uskim intervalima da bi se vrednosti hromatografskih parametara održavale u granicama prihvatljivosti.

Konačni cilj istraživanja bio je definisanje limita za procenu pogodnosti sistema. Kod postavljene MELC metode za kvantitativnu analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća ispitan je uticaj velikog broja faktora na odgovore sistema. Za hromatografsko razdvajanje ispitivanih supstanci, naročito u slučaju strukturno sličnih supstanci, najvažniji kriterijum je faktor rezolucije. S tim u vezi, definisani su uslovi najgoreg slučaja za sve dobijene vrednosti faktora rezolucije (od R₁ do R₅) – tabela 43.

Tabela 43. Faktorski nivoi za situaciju *najgoreg slučaja*

Faktor	Odgovori				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
A	-1	+1	+1	+1	+1
B	+1	-1	+1	-1	-1
D	-1	+1	+1	+1	+1
E	+1	-1	+1	-1	-1
G	-1	+1	-1	+1	+1
H	+1	+1	-1	+1	+1
K	+1	-1	+1	-1	-1
L	-1	-1	-1	-1	-1

Za izračunavanje SST limita koriste se samo značajni faktori i u skladu sa tim a na osnovu rezultata procene faktorskih efekata (tabela 41) može se zaključiti da su odgovori R₁, R₃ i R₅ robusni u ispitivanom opsegu faktora. S druge strane, za faktore R₂ i R₄ značajan je samo faktor B (sadržaj etilacetata u mobilnoj fazi) za nivo značajnosti $\alpha = 0,05$, dobijeni poređenjem sa kritičnim efektom izračunatim na osnovu beznačajnih efekata.

Korišćenjem izraza (37) izračunate su vrednosti najgoreg odgovora pod najgorim eksperimentalnim uslovima za faktor rezolucije kritičnog para ispitivanih jedinjenja:

$$R_2 = 5,08$$

$$R_4 = 4,02$$

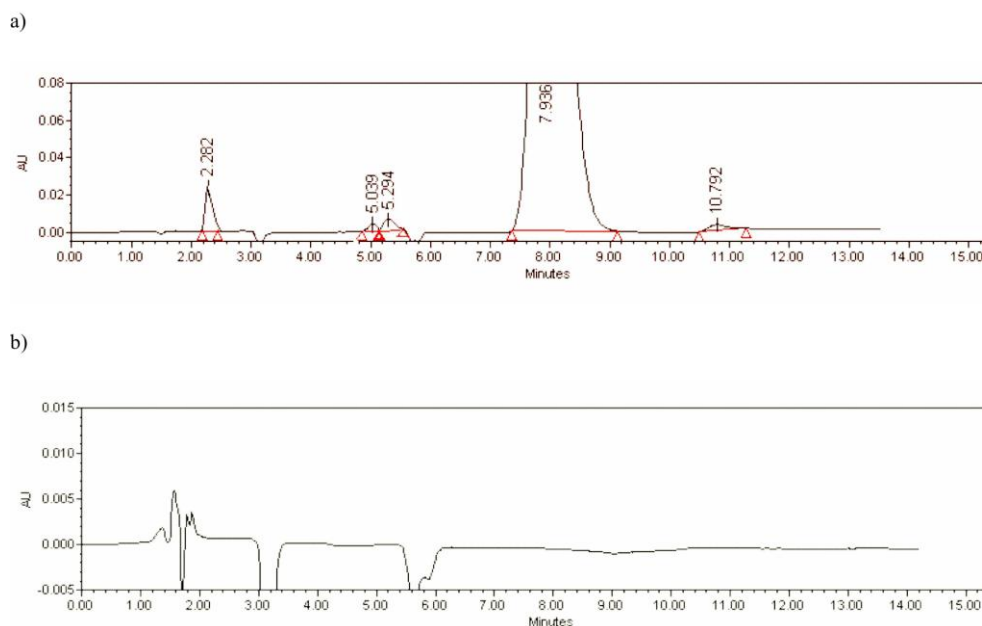
Kako su dobijene vrednosti značajno veće od 2, koja se može smatrati graničnom, može se zaključiti da je postavljena metoda robusna u ispitivanom opsegu faktora.

4.2.4. VALIDACIJA METODE MIKROEMULZIONE TEČNE HROMATOGRAFIJE

Pouzdanost primene optimizirane MELC metode za hromatografsku analizu perindorpil *t*-butilamina i njegovih nečistoća potvrđena je njenom validacijom, odnosno dodatnom evaluacijom kroz ispitivanje selektivnosti, linearnosti, preciznosti, tačnosti, limita kvantifikacije (LOQ) i limita detekcije (LOD).

Potvrđeno je da je metoda selektivna što znači da se na retencionim vremenima perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća nisu javljali interferirajući pikovi.

Pomoćne materije iz analiziranih tableta nisu uticale na razdvajanje ispitivanih komponenti. Reprezentativni hromatogrami laboratorijske a) i *placebo smeše* b) smeše prikazani su na slici 23.



Slika 23. a) Reprezentativni hromatogram laboratorijske smeše perindoprila ($t_R = 7,936$ min.) i njegovih nečistoća: perindoprilata ($t_R = 2,282$ min.), Y32 ($t_R = 5,039$ min.), Y33 ($t_R = 5,294$ min.) i Y31 ($t_R = 10,792$ min.).

(Mobilna faza: butilacetat (0,24 % w/v), etilacetat (0,30 % w/v), SDS (2 % w/v), *n*-butanol (7,75 % w/v), kalijum-dihidrogenfosfatni pufer (20 mM), pH 3,7; protok mobilne faze $1,25 \text{ mL min}^{-1}$; talasna dužina detekcije $\lambda = 254 \text{ nm}$; T kolone = $40 \text{ }^\circ\text{C}$)

b) Hromatogram *placebo* smeše (v. poglavlje 3.9.1)

Za procenu linearnosti metode analizirana je zavisnost površine pikova ispitivanih jedinjenja u funkciji koncentracije. Kalibracione krive konstruisane su metodom najmanjih kvadrata, a svaka tačka dobijena je kao rezultat tri injektovanja odgovarajućih rastvora. Kako su koeficijenti korelacije (r) za kalibracione krive perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća veći od 0,990 i kako je vrednost statističkog parametra (t_b) manja od tabelarne vrednosti (t_{tab}), može se zaključiti da dobijene kalibracione krive odgovaraju zahtevima regulative ICH [43], odnosno smernice ICH Q2 (R1) – *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Značajni parametri za procenu linearnosti kalibracione krive perindopril *t*-butilamina kao i kalibracionih kriva perindoprilata, nečistoća Y31, Y32 i Y33, prikazani su u tabeli 44.

Tabela 44. Rezultati za regresionu analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća

Parametri	Perindopril <i>t</i> -butilamin	Perindoprilat	Nečistoća Y31	Nečistoća Y32	Nečistoća Y33
Opseg koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,00 – 1000	0,200 – 20,00	0,200 – 20,00	0,200 – 10,00	0,200 – 10,00
$y = ax + b$	$12589x + 62875$	$15833x - 3212,1$	$4946,4x + 258,18$	$2508,4x - 331,38$	$4602,02x - 539,0$
r	0,9999	0,9999	0,9997	0,9993	0,9990
S_b	36628,6	1381,06	442,84	148,78	232,55
S_a	73,867	139,25	44,65	28,29	44,22
t_b	1,717	2,326	0,5830	2,227	2,318

a – nagib kalibracione krive

b – odsečak na y osi

r – koeficijent korelacije

S_a – standardna devijacija nagiba

S_b – standardna devijacija odsečka

t_{tab} = 2,365 (n = 7, p = 0,05)

t_{tab} = 2,447 (n = 6, p = 0,05) – nečistoće Y32 i Y33

Dobijenim statistički parametrima potvrđena je linearnost kalibracionih krivih za navedenu oblast koncentracija.

Za procenu preciznosti metode injektovani su rastvori analize pod uslovima prikazanim u poglavlju 3.9.3. Rezultati su dati u tabeli 45.

Tabela 45. Rezultati za procenu preciznosti MELC metode

Ispitivana supstanca	Injektovano (mg mL ⁻¹)	Nađeno ± SD (mg mL ⁻¹)	RSD (%)
Perindopril <i>t</i> -butilamin	0,32 (80 %)	0,315 (± 0,005)*	1,8
	0,40 (100 %)	0,403 (± 0,003)	0,77
	0,48 (120 %)	0,490 (± 0,003)	0,69
Ispitivana supstanca	Maksimalna dozvoljena koncentracija (µg mL ⁻¹)	Nađeno ± SD (µg mL ⁻¹)	RSD (%)
perindoprilat	6,4 (80 %)	0,438 (± 0,007)	1,6
	8,0 (100 %)	0,534 (± 0,003)	0,55
	9,6 (120 %)	0,641 (± 0,005)	0,71
Y31	6,4 (80 %)	nije detektovana	
	8,0 (100 %)		
	9,6 (120 %)		
Y32	3,2 (80 %)	0,569 (± 0,011)	1,9
	4,0 (100 %)	0,701 (± 0,005)	0,78
	4,8 (120 %)	0,852 (± 0,016)	1,9
Y33	3,2 (80 %)	nije detektovana	
	4,0 (100 %)		
	4,8 (120 %)		
Nepoznata nečistoća	0,8 (80 %)	0,0807 (± 0,0012)	1,5
	1,0 (100 %)	0,103 (± 0,002)	1,7
	1,2 (120 %)	0,122 (± 0,001)	1,1

* SD (n = 3)

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih vrednosti i izračunavanjem standardne devijacije (SD) i relativne standardne devijacije (RSD) za ispitivane koncentracije rastvora analize potvrđena je dobra preciznost metode.

Za procenu tačnosti metode injektovani su rastvori laboratorijske smeše pod uslovima prikazanim u poglavlju 3.9.4. Rezultati su dati u tabeli 46.

Tabela 46. Rezultati za procenu tačnosti MELC metode

Supstanca	Injektovano	Nađeno	RSD (%)	R (%)
Perindopril <i>t</i> -butilamin (mg mL ⁻¹)	0,32 (80 %)	0,333 ± 0,003*	1,0	104,2
	0,4 (100 %)	0,419 ± 0,001	0,24	104,7
	0,48 (120 %)	0,496 ± 0,004	0,82	103,3
Perindoprilat (µg mL ⁻¹)	6,4 (80 %)	6,57 ± 0,11	1,6	103,0
	8 (100 %)	7,77 ± 0,10	1,3	97,1
	9,6 (120 %)	9,87 ± 0,10	1,0	103,0
Y31 (µg mL ⁻¹)	6,4 (80 %)	6,22 ± 0,04	0,61	97,3
	8 (100 %)	7,86 ± 0,06	0,82	98,3
	9,6 (120 %)	9,40 ± 0,10	1,1	98,0
Y32 (µg mL ⁻¹)	3,2 (80 %)	3,16 ± 0,06	1,8	98,8
	4 (100 %)	3,94 ± 0,07	1,9	98,5
	4,8 (120 %)	4,82 ± 0,09	1,9	100,0
Y33 (µg mL ⁻¹)	3,2 (80 %)	3,17 ± 0,02	0,78	99,1
	4 (100 %)	3,97 ± 0,08	1,9	99,3
	4,8 (120 %)	4,68 ± 0,05	1,1	97,5

*Standardna devijacija (SD) (n = 3)

Statističkom obradom eksperimentalno dobijenih vrednosti i izračunavanjem standardne devijacije (SD), relativne standardne devijacije (RSD) i *Recovery* vrednosti (R), za ispitivane koncentracije rastvora standarda perindopril *t*-butilamina, perindoprilata, nečistoće Y31, Y32 i Y33 potvrđena je dobra tačnost metode.

Da bi se metoda primenjivala u kvantitativnoj analizi potrebno je definisati limit kvantifikacije (LOQ) i limit detekcije (LOD) (tabela 47). Vrednosti ovih limita izračunate su statistički imajući u vidu da je odnos signala prema šumu 3:1 za LOD i 10:1 za LOQ.

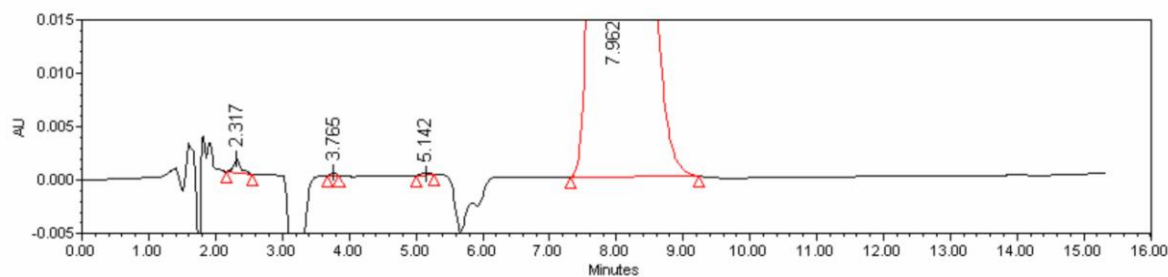
Tabela 47. Statistički određene vrednosti LOD i LOQ

Parametar	Perindopril <i>t</i> -butilamin	Perindoprilat	Y31	Y32	Y33
LOD (µg mL ⁻¹)	0,0935	0,0163	0,0573	0,0331	0,0348
LOQ (µg mL ⁻¹)	0,2832	0,0494	0,174	0,1002	0,106

Nakon evaluacije kojom je potvrđena pouzdanost primene, MELC metodom je određen sadržaj aktivne supstance perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u Prexanil[®] tabletama (hromatogram uzorka, slika 24).

Sadržaj aktivne supstance perindopril *t*-butilamina bio je od 103,05 % do 103,83 %, odnosno specifikacijski zahtev proizvođača tableta Prexanil[®], *Les Laboratoires Servier*, Francuska: od 90 % do 105 % bio je zadovoljen. Sadržaj nečistoće Y31 od 0,17 % i perindoprilata od 0,30 %, u skladu sa specifikacijskim zahtevom (ne više od 2 %). Sadržaj nepoznate nečistoće od 0,088 % odgovarao je specifikacijskom zahtevu za ostale nečistoće,

pojedinačno (ne više od 0,25 %). Rezultati kvantitativne analize ispitivanih tableta prikazani su u tabeli 48.



Slika 24. Hromatogram Prexanil® tableta

Tabela 48. Kvantitativna analiza

Supstanca	Nadeno \pm SD	Maksimalna dozvoljena koncentracija	RSD (%)	Sadržaj (%)
Perindopril <i>t</i> -butilamin (mg mL^{-1})	0,403 (\pm 3,1)	0,4	0,77	100,8
Perindoprilat ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,534 (\pm 0,003)	8,0	0,55	0,133
Y31 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	nije detektovana	8,0	/	/
Y32 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,701 (\pm 0,005)	4,0	0,78	0,175
Y33 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	nije detektovana	4,0	/	/
Nepoznata nečistoća ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,103 (\pm 0,002)	1,0	1,7	0,026

5. ZAKLJUČAK

1. Izvršena je procena hromatografskog ponašanja perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća (perindoprilat, Y31, Y32 i Y33) u hromatografskim sistemima sa reverzno-faznim eluentima uz hemometrijsku podršku. Na osnovu preliminarnih eksperimenata, definisani su faktori koji mogu imati uticaj na hromatografsko ponašanje perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća. Kao značajni faktori odabrani su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH mobilne faze, temperatura kolone i brzina protoka mobilne faze, dok su ostali hromatografski faktori održavani na konstantnom nivou. Odgovori sistema koje je bilo potrebno istovremeno optimizirati su retencioni faktor perindoprilata – k_{PLAT} , faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 – $R_{\text{Y32/Y33}}$ i retencioni faktor nečistoće Y31 – k_{Y31} . Matrica eksperimenta definisana je centralnim kompozicionim dizajnom sastavljenim iz punog faktorskog dizajna 2^4 , zvezda dizajna sa tačkama $\alpha \pm 0,5$ sa 4 ponavljanja u centralnoj tački. Na osnovu rezultata eksperimenata kreirani su matematički modeli uz odgovarajuću statističku procenu rezultata i analizu ponašanja hromatografskih odgovora.

Izvršena je procena hromatografskog ponašanja perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u hromatografskim sistemima sa mikroemulzionim eluentima uz hemometrijsku podršku. Na osnovu preliminarnih eksperimenata definisani su faktori koji mogu imati uticaj na hromatografsko ponašanje perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća. Kao značajni faktori odabrani su sadržaj etilacetata i butilacetata u unutrašnjoj fazi mikroemulzionog eluenta, kombinacija surfaktanta i ko-surfaktanta, odnosno sadržaj SDS-a i *n*-butanola i pH mobilne faze, dok su ostali hromatografski faktori održavani na konstantnom nivou. Odgovori sistema koje je bilo potrebno istovremeno optimizirati su retencioni faktor perindoprilata – k_{PLAT} , faktor rezolucije za nečistoće Y32 i Y33 – $R_{\text{Y32/Y33}}$ i retencioni faktor nečistoće Y31 – k_{Y31} . Matrica eksperimenta definisana je centralnim kompozicionim dizajnom sastavljenim iz frakcionog faktorskog dizajna 2^{5-1} , zvezda dizajna sa tačkama $\alpha \pm 0,5$ sa 4 ponavljanja u centralnoj tački. Na osnovu rezultata eksperimenata kreirani su matematički modeli uz odgovarajuću statističku procenu rezultata i analizu ponašanja hromatografskih odgovora.

2. U cilju dobijanja optimalnih hromatografskih uslova za RP–HPLC hromatografsku analizu perindorpil *t*-butilamina i njegovih nečistoća primenjen je multikriterijumski pristup optimizaciji metode uz korišćenje Derringer funkcije poželjnih odgovora. Primenom Design–Expert® softvera utvrđena je kombinacija faktora koja daje globalni optimum u kome je dobijena vrednost $D = 1,000$. Optimalne vrednosti ispitivanih faktora su: sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi 37 % (V/V), pH mobilne faze 2,5, temperatura kolone 50 °C i brzina protoka mobilne faze 1,7 mL min.⁻¹. Imajući u vidu da funkcija poželjnih odgovora uključuje i subjektivne parametre urađena je analiza osetljivosti. Kao faktori koji najviše podležu subjektivnoj proceni praćeni su koeficijent značajnosti za $R_{Y32/Y33}$, težina *s* za $R_{Y32/Y33}$, težina *t* za $R_{Y32/Y33}$ i ciljana vrednost za $R_{Y32/Y33}$. Definisani su njihovi nivoi i ispitani primenom frakcionog faktorskog dizajna 2^{4-1} , tj. kroz 8 eksperimenata ispitan je uticaj 4 faktora na odgovore sistema: retencioni faktor perindoprilata, faktor rezolucije između nečistoća Y32 i Y33 i retencioni faktor nečistoće Y31. Dobijeni rezultati pokazali su da promene u ispitivanom opsegu faktora nemaju uticaj na odgovore sistema.

U cilju dobijanja optimalnih hromatografskih uslova za MELC hromatografsku analizu perindorpil *t*-butilamina i njegovih nečistoća primenjen je multikriterijumski pristup optimizaciji metode uz korišćenje Derringer funkcije poželjnih odgovora. Primenom Design–Expert® softvera utvrđena je kombinacija faktora koja daje najbolji globalni optimum u kome je vrednost $D = 0,946$. Optimalne vrednosti ispitivanih faktora su: 0,24 % m/V butilacetata, 2 % m/V SDS, 0,3 % m/V etilacetata 7,75 % m/V *n*-butanola i pH mobilne faze 3,70. Imajući u vidu da funkcija poželjnih odgovora uključuje i subjektivne parametre urađena je analiza osetljivosti. Kao faktori koji najviše mogu da podležu subjektivnoj proceni praćeni su koeficijent značajnosti za k_{PLAT} , koeficijent značajnosti za $R_{Y32/Y33}$, koeficijent značajnosti za k_{Y31} , težina za k_{PLAT} , težina za $R_{Y32/Y33}$, težina za k_{Y31} , opseg za k_{PLAT} , opseg za $R_{Y32/Y33}$ i opseg za k_{Y31} . Za ispitivanje uticaja izabranih faktora izabran je *Plackett–Burman* dizajn. U cilju dobijanja kompletne matrice dizajna na 9 pravih faktora dodata su 2 veštačka faktora i time dobijen plan od 12 eksperimenata kojima se ispituje uticaj 11 faktora na posmatrane odgovore sistema. Analizom osetljivosti potvrđen je dobar izbor vrednosti parametara koji su pod subjektivnim uticajem.

3. Kao konačna potvrda pogodnosti postavljene i optimizirane RP–HPLC metode za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća, urađena je procena robusnosti postavljenog optimuma. U tom cilju primenjen je *Plackett–Burman* dizajn u kome je ispitano 7 pravih faktora u 12 eksperimenata. Pored 7 pravih faktora (kolona, temperatura kolone, sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, koncentracija kalijum-dihidrogenfosfata, pH mobilne faze, protok mobilne faze i talasna dužina detekcije) u plan eksperimenta dodata su i 4 veštačka faktora. Praćeno je 28 odgovora sistema uključujući kvalitativne (retencioni faktori i faktori simetrije pikova ispitivanih komponenti, faktori rezolucije i faktori selektivnosti između susednih pikova) i kvantitativne odgovore (površina pikova). Analiza rezultata primenom statističkih i grafičkih metoda potvrdila je odgovarajuću robusnost optimuma. Za kvalitativne odgovore najznačajniji faktori su tip hromatografske kolone i sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi. S druge strane, na kvantitativne odgovore, najveći uticaj imali su protok mobilne faze i talasna dužina detekcije. Dalje, na osnovu dobijenih rezultata određeni su i intervali neznačajnosti za značajne faktore, kao i parametri za procenu pogodnosti sistema razvijene metode reverzno–fazne tečne hromatografije za analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća (perindoprilat, Y31, Y32 i Y33).

Kao konačna potvrda pogodnosti postavljene i optimizirane MELC metode za farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća, urađena je procena robusnosti postavljenog optimuma. U tom cilju primenjen je *Plackett–Burman* dizajn u kome je ispitano 8 pravih faktora u 12 eksperimenata. Pored 8 pravih faktora (sadržaj butilacetata, etilacetata, SDS–a i butanola u mobilnoj fazi, zatim koncentracija kalijum-dihidrogenfosfata, pH mobilne faze, protok mobilne faze i temperatura kolone) u plan eksperimenta dodata su i 3 veštačka faktora. Praćeno je 28 odgovora sistema uključujući kvalitativne (retencioni faktori i faktori simetrije pikova ispitivanih komponenti, faktori rezolucije i faktori selektivnosti između susednih pikova) i kvantitativne odgovore (površina pikova). Analiza rezultata primenom statističkih i grafičkih metoda potvrdila je odgovarajuću robusnost optimuma. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je metoda osetljiva na promene sadržaja butilacetata, etilacetata, SDS–a, *n*-butanola i rastvora kalijum-dihidrogenfosfata u mobilnoj fazi kao i na promene vrednosti pH mobilne faze. Vrednosti navedenih faktora moraju se održavati u uskim intervalima da bi se vrednosti hromatografskih

parametara održavale u granicama prihvatljivosti. Dalje, na osnovu dobijenih rezultata određeni su i intervali neznačajnosti za značajne faktore, kao i parametri za procenu pogodnosti sistema razvijene MELC metode za analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća (perindoprilat, Y31, Y32 i Y33).

4. Postavljene RP–HPLC i MELC metode validirane su ispitivanjem selektivnosti, linearnosti, preciznosti, tačnosti, limita detekcije i limita kvantifikacije za aktivnu supstancu perindopril *t*-butilamin, kao i za njegove nečistoće. Statističkom obradom dobijenih podataka potvrđeno je da su rezultati dobijeni predloženim metodama u statistički dozvoljenim granicama, čime je potvrđena i pouzdanost primene RP–HPLC i MELC metode za hromatografsku analizu ispitivanih komponenti.

5. Postavljene RP–HPLC i MELC metode primenjene su za kvantitativnu farmaceutsku analizu perindopril *t*-butilamina i njegovih nečistoća u farmaceutskom doziranom obliku, Prexanil[®] tablete, 4 mg, *Les Laboratoires Servier*, Francuska. Dobijeni rezultati su u okviru specifikacijskih zahteva definisanih od strane proizvođača.

6. LITERATURA

1. Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: The Use of Experimental Design in Separation Science. *Acta Chromatogr* 2009; 21: 161–201.
2. Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Buydens, L. M. C., De Jong, S., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke, J.: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
3. Vander Heyden, Y.: Experimental Design Approaches in Method Optimization. *LCGC Europe* 2006; 19: 469–474.
4. Ryan, T. P.: *Modern Experimental Design*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey 2007.
5. Gabrielsson, J., Lindberg, N. O., Lundstedt, T.: Multivariate methods in pharmaceutical applications. *J Chemometr* 2002; 16: 141–160.
6. Armstrong, A. N.: *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation*, Taylor & Francis Group, USA 2006.
7. Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: Response Surface Designs Part 1 – Types and Properties. *LC GC Eur* 2009; 22: 256–261.
8. Siouffi, A. M., Phan-Tan-Luu, R.: Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2000; 892: 75–106.
9. Ivanović, D., Medenica, M., Jančić, B., Malenović, A.: Reversed-phase liquid chromatography analysis of imatinib mesylate and impurity product in Glivec® capsules. *J Chromatogr B* 2004; 800: 253–258.
10. Ivanović, D., Medenica, M., Jančić, B., Malenović, A., Marković, S.: Chemometrical approach in fosinopril-sodium and its degradation product fosinoprilat analysis. *Chromatographia* 2001; 60: S87–S92.
11. Jančić-Stojanović, B., Popović, I., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Factorial design in optimization of chromatographic separation of ramipril and its impurities. *Chromatographia* 2010; 71: 799–804.

12. Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M., B. Jančić, B., Marković, S.: Retention modelling in liquid chromatographic separation of simvastatin and six impurities using a microemulsion as eluent. *J Sep Sci* 2004; 27: 1087–1092.
13. Jančić, B., Ivanović, D., Medenica, M., Malenović, A.: Experimental design in chromatographic analysis of pramipexole and its impurities. *Acta Chim Slov* 2007; 54: 49–54.
14. Jančić-Stojanović, B., Malenović, A., D. Ivanović, Rakić, T., Medenica, M.: Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 1263–1269.
15. Jančić, B., Medenica, M., Ivanović, D., Janković, S., Malenović, A.: Monitoring of fosinopril sodium impurities by liquid chromatography–mass spectrometry including the neural networks in method evaluation. *J Chromatogr A* 2008; 1189: 366–373.
16. Jančić-Stojanović, B., Ivanović, D., Malenović, A., Medenica, M.: Artificial neural networks in analysis of indinavir and its degradation products retention. *Talanta* 2009; 78: 107–112.
17. Jančić, B., Medenica, M., Ivanović, D., Malenović, A., Popović, I.: Chromatographic behavior of fosinopril sodium and fosinoprilat using neural networks. *Chromatographia* 2008; 67: S123–S127.
18. Havel, J., Madden, J. E., Haddad, P. R.: Prediction of retention times for anions in ion chromatography using artificial neural networks. *Chromatographia* 1999; 49: 481–488.
19. Bolanča, T., Cerjan-Stefanović, Š., Novič, M.: Application of artificial neural network and multiple linear regression retention models for optimization of separation in ion chromatography by using several criteria functions. *Chromatographia* 2005; 61: 181–187.
20. Medenica, M., Ivanović, D., Popović, I., Malenović, A., Jančić, B.: Computer-assisted optimization and validation of LC analysis of trimetazidine dihydrochloride and its impurities. *J Chromatogr Sci* 2008; 46: 430–435.

21. Popović, I., Ivanović, D., Medenica, M., Malenović, A., Jančić, B.: LC determination of lercanidipine and its impurities using drylab software and experimental design procedures. *Chromatographia* 2008; 67: 449–454.
22. Araujo, P. W., Brereton, R. G.: Experimental design II. Optimization, *Trend Anal Chem* 1996; 15: 63–70.
23. Mason, R. L., Gunst, R. F., Hess J. L.: *Statistical Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2003.
24. Deming, S. N., Morgan S. L.: *Experimental design: a chemometric approach*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1993.
25. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., Bergman, R.: Experimental design and optimization. *Chemometr Intell Lab* 1998; 42: 3–40.
26. Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: Response Surface Designs Part 2 – Types and Properties. *LC GC Eur* 2009; 22: 581–585.
27. Martinez, A., Riu, J., Rius, F. X.: Lack of fit in linear regression considering errors in both axes. *Chemometr Intell Lab* 2000; 54: 61–73.
28. Analla, M.: Model Validation Through the Linear Regression Fit to Actual Versus Predicted Values. *Agr Syst* 1998; 57: 115–119.
29. Box, G., Hunter, W., Hunter, J.: *Statistics for Experimenters, an introduction to Design, Data analysis and Model Building*, Wiley, New York, 1978, 306-418.
30. NIST/SEMATECH e - Handbook of Statistical Methods,
<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook> (access date July, 2010).
31. Deming, S.N.: Multiple-criteria optimization. *J Chromatogr A* 1991; 550: 15–25.
32. Keller, H. R., Massart, D. L.: Multicriteria decision making: A case study. *Chemometr Intell Lab* 1991; 11: 175–189.
33. Smilde, A. K., Knevelman, A., Coenegracht, P. M. J.: Introduction of multi-criteria decision making in optimization procedures for high-performance liquid chromatographic separations. *J. Chromatogr A* 1986; 369: 1–10.

34. Bourguignon, B., Massart, D. L.: Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function. *J Chromatogr A* 1991; 586: 11–20.
35. Derringer, G., Suich, R.: Simultaneous optimization of several response variables. *J Qual Technol* 1980; 12: 214–219.
36. Del Castillo, E., Montgomery, D. C., McCarville, D. R.: Modified desirability functions for multiple response optimisation. *J Qual Technol* 1996; 28: 337–345.
37. Aksezer, C. S.: On the sensitivity of desirability functions for multiresponse optimization. *J Ind Manag Optim* 2008; 4: 685–696.
38. Malenović, A., Jovanović, M., Petrović, S., Kostić, N., Vemić, A., Jančić-Stojanović, B.: Optimization of liquid chromatographic method for the separation of folic acid and its two impurities. *Instrum Sci Technol* 2012; 40: 138–149.
39. Safa, F., Hadjmohammadi M. R.: Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function. *J Chromatogr A* 2005; 1078: 42–50.
40. Outinen, K., Haario, H., Vuorela, P., Nyman, M., Ukkonen, E., Vuorela, H.: Optimization of selectivity in high performance liquid chromatography using desirability functions and mixture designs according to PRISMA. *Eur J Pharm Sci* 1998; 6: 197–205.
41. Vera-Candiotti, L., Gil Garcia, M. D., Martinez Galera, M., Goicoechea, H. C.: Chemometric assisted solid-phase microextraction for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography-diode array detection. *J Chromatogr A* 2008; 1211: 22–32.
42. Saiz-Abajo, M. J., Gonzales-Saiz, J. M., Pizarro, C.: Multi-objective optimisation strategy based on desirability functions used for chromatographic separation and quantification of L-proline and organic acids in vinegar. *Anal Chim Acta* 2005; 528: 63–76.
43. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, Topic Q2(R1), Validation of

- Analytical Procedures: Text and Methodology. <http://www.ich.org> (access date July, 2009).
44. Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M., Massart, D. L.: Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J Pharmaceut Biomed* 2001; 24: 723–753.
 45. Vander Heyden, Y., Questier, F., Massart, D.L.: Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels. *J Pharmaceut Biomed* 1998; 18: 43–56.
 46. Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: Screening Designs (Part 1) – Types and Properties. *LC GC Eur* 2007; 20: 526–553.
 47. Plackett, R.L., Burman, J.P.: The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 1946; 33: 305–325.
 48. Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: Screening Designs (Part 2) – Data analysis. *LC GC Eur* 2008; 21: 96–102.
 49. Vander Heyden, Y., Bourgeois, A., Massart, D.L.: Influence of the sequence of experiments in a ruggedness test when drift occurs. *Anal Chim Acta* 1997; 347: 369–384.
 50. Nijhuis, A., Van der Knaap, H.C.M., De Jong, S., Vandeginste, B.G.M.: Strategy for ruggedness test in chromatographic method validation. *Anal Chim Acta* 1999; 391: 187–202.
 51. Hund, E., Vander Heyden, Y., Haustein, M., D.L. Massart, D. L., Smeyers-Verbeke, J.: Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial designs. *J Chromatogr A* 2000; 874: 167–185.
 52. Dejaegher, B., Capron, X., Smeyers-Verbeke, J., Vander Heyden, Y.: Randomization tests to identify significant effects in experimental designs for robustness testing. *Anal Chim Acta* 2006; 564: 184–200.
 53. Morgan, E.: *Chemometrics: experimental design, Analytical Chemistry by Open Learning*, Wiley, Chichester, 1991, 118–188.
 54. Vander Heyden, Y., Massart, D.L.: *Review of the use of robustness and ruggedness in Analytical Chemistry*; in A. Smilde, J. De Boer and M. Hendriks

- (Eds.) *Robustness of analytical methods and pharmaceutical technological products*, Elsevier, Amsterdam, 1996, 79–147.
55. Vander Heyden, Y., Questier, F., Massart, D.L.: A ruggedness test strategy for procedure related factors: experimental set-up and interpretation. *J Pharmaceut Biomed* 1998; 17: 153–168.
56. Vander Heyden, Y., Luypaert, K., Hartmann, C., Massart, D.L., Hoogmartens, J., De Beer, J.: Ruggedness tests on the HPLC assay of the United States Pharmacopeia XXII for tetracycline hydrochloride. A comparison of experimental designs and statistical interpretations. *Anal. Chim. Acta* 1995; 312: 245–262.
57. Sidak, Z.: Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *J Am Stat Assoc* 1967; 62: 626–633.
58. Dong, F.: On the identification of active contrasts in unreplicated fractional factorials. *Stat Sinica* 1993; 3: 209–217.
59. The United States Pharmacopeia, 23th edition, National formulary 18, United States Pharmacopeial Convention, 1995, Rockville, USA.
60. Vander Heyden, Y., Jimidar, M., Hund, E., Niemeijer, N., Peeters, R., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D.L., Hoogmartens, J.: Determination of system suitability limits with a robustness test. *J Chromatogr A* 1999; 845: 145–154.
61. Sun, S. W., Su, H. T.: Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. *J Pharmaceut Biomed* 2002; 29: 881–894.
62. Nguyet, A. N. M., Tallieu, L., Plizier-Vercammen, J. P., Massart, D. L., Vander Heyden, Y.: Validation of an HPLC method on short columns to assay ketokonazole and formaldehyde in shampoo. *J Pharmaceut Biomed* 2003; 32: 1–19.
63. Marini, R. D., Boulanger, B., Vander Heyden, Y., Chiap, P., Crommen, J., Hubert, P. H.: Uncertainty assessment from robustness testing applied on an LC assay for R-timolol and other related substances in S-timolol maleate. *Anal Chim Acta* 2005; 531: 131–140.
64. Waters, R. B., Dovletoglou, A.: Evaluating HPLC assay robustness with experimental design. *J Liq Chromatogr R T* 2003; 26: 2975–2985.

65. Halabi, A., Ferrayoli, C., Palacio, M., Dabbene, V., Palacios, S.: Validation of a chiral HPLC assay for (*R*)-salbutamol sulfate. *J Pharmaceut Biomed* 2004; 34: 45–51.
66. Malenović, A., Jančić-Stojanović, B., Vemić, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Validation of column liquid chromatographic method for the analysis of pramipexole and its five impurities. *J AOAC Int* 2010; 93: 1102–1112.
67. Rakić, T., Malenović, A., Jančić-Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Avoiding the false negative results in LC method robustness testing by modifications of the algorithm of Dong and dummy factor effects approach. *Chromatographia* 2012; 75: 397–401.
68. *European Pharmacopoeia*, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM & HealthCare), Council of Europe, Strasbourg, France, 7th ed., 2011.
69. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J.: *Pharmacology*. Churchill Livingstone Elsevier, 6th Edition, 2007.
70. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. The McGraw-Hill Companies, 12th Edition, 2011.
71. Sažetak karakteristika leka (SPC), Prexanil[®] tablete, 30x4mg, Les Laboratoires Servier Industrie, Francuska (datum revizije teksta Januar 2008).
<http://alims.gov.rs> (access date Maj, 2012).
72. Ozoemena, K. I., Stefan, R. I., J.F. van-Staden, J. F., Aboul-Enein, H. Y.: Utilization of maltodextrin based enantioselective, potentiometric membrane electrodes for the enantioselective assay of *S*-perindopril. *Talanta* 2004; 62(4): 681–685.
73. Stefan, R. I., van-Staden, J. F., Aboul-Enein, H. Y.: *S*-perindopril assay using a potentiometric, enantioselective membrane electrode. *Chirality* 1999; 11(8): 631–634.
74. Stefan, R. I., van-Staden, J. F., Mulaudzi, L. V., Aboul-Enein, H. Y.: On-line simultaneous determination of *S*- and *R*-perindopril using amperometric biosensors as detectors in flow systems. *Anal Chim Acta* 2002; 467: 189–195.

75. van-Staden, J. F., Stefan, R. I., Aboul-Enein, H. Y.: Amperometric biosensor based on D-aminoacid oxidase for the R-perindopril assay. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 2000; 367(2): 178–180.
76. Stefan, R. I., van-Staden, J. F., Aboul-Enein, H. Y.: Determination of S-perindopril using a flow injection system with an amperometric biosensor. *Sensor Actuat B-Chem* 1999; 54: 261–265.
77. Dewani, M. G., Bothara, K. G., Madgulkar, A. R., Damle, M. C.: Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of perindopril and indapamide in combined dosage form by absorbance correction method. *Int. J. PharmTech Res.* 2010; 1: 411–416.
78. Emara, S., El-Gindy, A., El-Shorbaji, A. N., Hadad, G.: Utility of copper(II) oxide as a packed reactor in flow injection assembly for rapid analysis of some angiotensin converting enzyme inhibitors. *Anal Chim Acta* 2003; 489: 115–123.
79. Abdellatef, H. E., Ayad, M. M., Taha, E. A.: Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of ramipril and perindopril through ternary complex formation with eosin and Cu(II). *J Pharmaceut Biomed* 1999; 18: 1021–1027.
80. Rahman, N., Anwar, N., Kashif, M.: Optimized and validated initial-rate method for the determination of perindopril erbumine in tablets. *Chem Pharm Bull* 2006; 54: 33–36.
81. Hillaert, S., Vander-Heyden, Y., van-den-Bossche, W.: Optimisation by experimental design of a capillary electrophoretic method for the separation of several inhibitors of angiotensin-converting enzyme using alkylsulphonates. *J Chromatogr A* 2002; 978: 231–242.
82. Hillaert, S., W. van-den-Bossche, W.: The quantitative determination of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme by CE. *J Pharmaceut Biomed* 2001; 25: 775–783.
83. Hillaert, S., van-den-Bossche, W.: Optimization of capillary electrophoretic separation of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J Chromatogr A* 2000; 895: 33–42.

84. Lin, S. J., Wu, H. L., Chen, S. H., Y.H. Wen, Y. H.: Derivatization-gas chromatographic determination of penndopril. *Anal Lett* 1996; 29: 1751–1762.
85. Sereda, K. M., Hardman, T. C., Dilloway, M. R., Lant, A. F.: Development of a method for the detection of angiotensin converting enzyme inhibitors using electron capture-gas chromatography detection. *Anal. Proc. (London)* 1993; 30: 371–372.
86. Tsaconas, C., Devissaguet, M., Padieu, P.: Gas chromatography-mass spectrometry of perindopril and its active free metabolite, an angiotensin convertase inhibitor: Choice of derivatives and ionization modes. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1989; 80: 249–265.
87. Van Den Berg, H., Resplandy, G., De Bie, A.T.H.J., Floor, W., Bertrand, M., Arts, C.J.M.: A new radioimmunoassay for the determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor Perindopril and its active metabolite in plasma and urine: Advantages of a lysine derivative as immunogen to improve the assay specificity. *J Pharmaceut Biomed* 1991; 9: 517–524.
88. Dewani, M. G., Bothara, K. G., Madgulkar, A. R., Damle, M.: Simultaneous estimation of perindopril erbumine and indapamide in bulk drug and tablet dosage form by HPTLC. *Pharmacie Globale (IJCP)* 2011; 1: 1–4.
89. Rani, P. A., Sekaran, B. C.: A validated RP–HPLC method for the determination of perindopril erbumine in pharmaceutical formulations. *Int. J. PharmTech Res.* 2009; 3: 575–578.
90. Erk, N.: Comparison of spectrophotometric and an LC method for the determination perindopril and indapamide in pharmaceutical formulations. *J Pharmaceut Biomed* 2001; 26: 43–52.
91. Chaudhary, A. B., Patel, R. K., Chaudhary, S. A.: Determination of losartan potassium and perindopril erbumine in tablet formulations by Reversed-Phase HPLC. *Int. J. ChemTech Res.* 2010; 2: 1141–1146.
92. Patel, A. I., Oza, C. K., Prajapati, J. P., Vyas, A. J., Mehta, P.: RP–HPLC method for the determination of losartan potassium and perindopril erbumine in combined tablet dosage form. *Int. J. Pharma Bio Sc.* 2011; 1: 709–715.

93. Elshanawane, A. A., Mostafa, S. M., Elgawish, M. S.: Development and validation of LC method for simultaneous determination of two binary mixtures containing indapamide. *Chromatographia* 2008; 67: 837–840.
94. Jogia, H., Khandelwal, U., Gandhi, T., Singh, S., Darshana, M.: Development and validation of a stability-indicating assay method for simultaneous determination of perindopril and indapamide in combined dosage form by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J AOAC Int* 2010; 93: 108–115.
95. Attwood, D., Florence, A. T.: *Surfactant Systems, Their Chemistry, Pharmacy and Biology*, Chapman and Hall, New York 1985.
96. Carlfors, J., Blute, I., Schmidt, V.: Lidocaine in microemulsion – a dermal delivery system. *J Disper Sci Technol* 1991; 12: 467–482.
97. Bhargava, H. N., Narurkar, A., Lieb, L. M.: Using microemulsions for drug delivery. *Pharm. Technol.* 1987; 11: 46–52.
98. Attwood, D.: Microemulsions. In: Kreuter, J., Editor: *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York 1994; 31–71.
99. Eccleston, J.: Microemulsions. In: Swarbrick, J., Boylan, J. C., Editors: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* Vol. 9, Marcel Dekker, New York 1994; 375–421.
100. Lawrence, J. M.: Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *Eur J Drug Metab Ph* 1994; 3: 257–269.
101. Lawrence, J. M.: Microemulsions as drug delivery vehicles. *Curr Opin Colloid In* 1996; 1: 826–832.
102. Tenjarla, S.: Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. *Crit Rev Ther Drug* 1999; 16: 461–521.
103. Sagitani, H., Friberg, S.: Microemulsion systems with a non-ionic cosurfactant. *J Disper Sci Technol* 1980; 1: 151–164.
104. Osborne, D. W., Middleton, C. A., Rogers, R. L.: Alcohol-free microemulsions. *J Disper Sci Technol* 1988; 9: 15–423.
105. Aboofazeli, R., Patel, N., Thomas, M., Lawrence, M. J.: Investigations into the formation and characterisation of phospholipid microemulsions. IV.

- Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol and oil; the influence of oil. *Int J Pharmaceut* 1995; 125: 107–116.
106. Aboofazeli, R., Lawrence, C. B., Wicks, S. R., Lawrence, M. J.: Investigations into the formation and characterisation of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant. *Int J Pharmaceut* 1994; 111: 63–72.
107. Lawrence, J. M., Rees, G. D.: Microemulsion – based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev* 2000; 45: 89–121.
108. Kahlweit, M., Strey, R., Busse, G.: Effect of alcohols on the phase behavior of microemulsions, *J Phys Chem* 1991; 95: 5344–5352.
109. McEvoy, E., Donegan, S., Power, J., Altria, K.: Optimisation and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. *J Pharmaceut Biomed* 2007; 44: 137–143.
110. Marsh, A., Clark, B., Altria, K.: Oil-in-Water Microemulsion High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. *Chromatographia* 2004; 59: 531–542.
111. Altria, K., Broderick, M., Donegan, S., Power, J.: Preliminary Study on the Use of Water-in-Oil Microemulsion Eluents in HPLC. *Chromatographia* 2005; 62: 341–348.
112. Mahuzier, P. E., Prado, M. S. A., Clark, B. J., Kedor-Hackmann, E. R. M., Altria, K.: An introduction to the theory and application of microemulsion electrokinetic chromatography. *LC GC Eur* 2003; 16(1): 22–29.
113. Jancic, B., Ivanovic, D., Medenica, M., Malenovic, A., Dimkovic, N.: Development of liquid chromatographic method for fosinoprilat determination in human plasma using microemulsion as eluent. *J Chromatogr A* 2005; 1088: 187–192.
114. El-Sherbiny, D. T. M., El-Ashry, S. M., Mustafa, M. A., Abd-El-Rahman El-Emam, A., Hansen, S. H.: Evaluation of the use of microemulsions as eluents in high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci* 2003; 26: 503–509.

115. Ryan, R., Donegan, S., Power, J., McEwoy, E., Altria, K.: Microemulsion HPLC. *LC GC Eur* 2008; 21: 502–513.
116. Altria, K., Marsh, A., Clark, B. J.: High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals Using Oil-In-Water Microemulsion Eluent and Monolithic Column. *Chromatographia* 2006; 63: 309–314.

NAUČNI RADOVI OBJAVLJENI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. Medenica, M., Ivanović, D., **Mašković, M.**, Jančić, B., Malenović, A.:
Evaluation of Impurities level of perindopril *tert*-butylamine in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 44: 1087–1094. **M21**
2. **Mašković, M.**, Jančić–Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of liquid chromatographic method robustness by use of Plackett–Burman design. *Acta Chromatographica* 2010, (22)2: 281–296. **M23**
3. **Mašković, M.**, Dotsikas, Y., Malenović, A., Jančić–Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Validation of an Oil–in–Water Microemulsion Liquid Chromatography Method for Analysis of Perindopril *tert*-Butylamine and Its Impurities. *Journal of AOAC International* 2011, (94)3: 723–734. **M23**
4. Malenović, A., Dotsikas, Y., **Mašković, M.**, Jančić–Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Desirability–based optimization and its sensitivity analysis for the perindopril and its impurities analysis in a microemulsion LC system. *Microchemical Journal* 2011, (99)2: 454–460. **M21**

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI:

1. Ivanović, D., Malenović, A., Jančić, B., Medenica, M., **Mašković, M.**:
Monitoring of impurity level of valsartan and hydrochlorothiazide employing an RP-HPLC gradient mode. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2007, 30:2879–2890. **M23**

**RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG
ZNAČAJA ŠTAMPANI U CELINI:**

1. Jancic-Stojanovic, B., Medenica, M., Ivanovic, D., Malenovic, A., **Maskovic, M.**: Impurity profiling for perindopril *tert*-butylamine during long term and accelerated stability studies. *6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*. Barcelona, Spain, 2008.

**RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG I
NACIONALNOG ZNAČAJA ŠTAMPANI U IZVODU:**

1. **Mašković, M.**, Jančić, B., Malenović, A., Medenica, M.: Evaluation of Impurities Level of Perindopril *tert*-butylamine and its Impurities in Tablets. *6th Balaton Symposium on High Performance Separation Methods*. Hungary, 2005.
2. **Mašković M.**, Malenović, A., Dotsikas Y., Jančić-Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M. :Desirability-based optimization of perindopril and its impurities microemulsion liquid chromatographic separation, *6th International Conference Instrumental Methods of Analysis*, Athens, Greece, 2009.

**RADOVI SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG I NACIONALNOG ZNAČAJA
ŠTAMPANI U IZVODU:**

1. **Mašković M.**, Malešević M., Marković S.: Određivanje kvinaprila i hidrohlorotiazida RP-HPLC metodom u tabletama. *Treći kongres farmaceuta Jugoslavije*. Arhiv za farmaciju, 4/2002.
2. Malešević M., **Mašković M.**, Marković S.: Određivanje kvinaprila i hidrohlorotiazida metodom derivativne spektrofotometrije drugog reda izvoda. *Treći kongres farmaceuta Jugoslavije*. Arhiv za farmaciju, 4/2002.

3. Mihaljica S., Trbojević J., **Mašković M.**, Malešević M.: Determination of acetate in pharmaceutical products by HPLC. *4th Slovenian Symposium on Separation Techniques*, Novo Mesto, Slovenia, 2002.
4. Marković S., Jančić B., **Mašković M.**, Ivanović D.: Validation of RP-HPLC method for determination of lidocaine in some pharmaceuticals. *4th Slovenian Symposium on Separation Techniques*, Novo Mesto, Slovenia, 2002.
5. **Mašković M.**, Letica J., Malešević M.: Kvalitet novih aktivnih supstanci. *Treći seminar udruženja farmaceutskih tehničara Srbije*, Novi Sad, Srbija, 2002.
6. Malešević M., **Mašković M.**, Letica J.: Ispitivanje stabilnosti novih aktivnih supstanci. *Treći seminar udruženja farmaceutskih tehničara Srbije*, Novi Sad, Srbija, 2002.
7. Jančić, B., Ivanović, D., Medenica, M., **Mašković, M.**: Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, coffeine, propyphenazone and codeine-phosphate. *100 years of Chromatography, 3rd Int. Symposium on Separations in BioSciences*, Moscow, Russia, 2003.
8. Malenović, A., Jančić, B., Marković, S., **Mašković, M.**: Central composition design in robustness evaluation of simvastatin and its six impurities separation. *10th international symposium on separation sciences*, Opatija, Hrvatska, 2004.
9. **Mašković M.**, Kovačević I.: Kvalitet, specifikacije i rutinski testovi pakovnog materijala, *Hemofarm*, Vršac, Srbija, 2004.
10. **Mašković, M.**, Ivanović, D., Medenica, M., Malenović, A., Jančić, B., Popović, I.: Monitoring of Impurities level of Valsartan and Hydrochlorothiazide

employing Gradient Mode in RP-HPLC. *International Congress on Analytical Sciences*, Moscow, Russia, 2006.

11. Malešević, M., Đurđević, A., **Mašković, M.**, Nešić, M.: Merna nesigurnost i rezultati van specifikacijskih granica. *Četvrti kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem*, Beograd, Srbija, 2006.
12. **Mašković, M.**, Agbaba, D., Živanović, Lj.: Evropska farmakopeja i nacionalni dodatak Evropskoj farmakopeji. *Četvrti kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem*, Beograd, Srbija, 2006.
13. Jančić-Stojanović, B., **Mašković, M.**, Popović, I., Malenović, A., Ivanović, D.: Assesment of method's robustness employing Plackett–Burman design, 34th *International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Dresden, Germany, 2009.

Marija Mašković – Biografija

Rođena 9. decembra 1974. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu (V Beogradska gimnazija). Školske 1993/94. upisala studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i diplomirala u junu 2000. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu iz Analitike lekova, sa prosečnom ocenom u toku studija 8,89.

Specijalistički ispit iz Ispitivanja i kontrole lekova položila u septembru 2008. godine sa odličnim uspehom i time stekla zvanje specijaliste iz Ispitivanja i kontrole lekova.

Školske 2000/01. upisala poslediplomske magistarske studije iz Farmaceutske hemije i položila sve ispite predviđene planom i programom, a zatim joj je školske 2006/07. odobren prelazak na treću godinu doktorskih studija.

Od oktobra 2000. do januara 2002. godine angažovana je na poslovima saradnika u praktičnoj nastavi za predmet Analitika lekova, s punim radnim vremenom. Od marta 2002. godine zaposlena s punim radnim vremenom u Zavodu za farmaciju Srbije kao stručni saradnik u Instrumentalnoj laboratoriji na poslovima kontrole kvaliteta lekova i medicinskih sredstava u postupku njihove registracije, obnove registracije, redovne kontrole i sistematske kontrole lekova u prometu. Od 2004. godine, kao koordinator za Nacionalnu i Evropsku farmakopeju i stručni saradnik u Farmaceutskom sektoru Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije (ALIMS), obavljala je sledeće poslove: saradnje sa Evropskim Direktoratom za kvalitet lekova i brigu o zdravlju (European directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, EDQM & HealthCare, Strasbourg, Francuska), saradnje i rada na poslovima u vezi članstva Nacionalne kontrolne laboratorije ALIMS-a u Mreži Evropskih nacionalnih kontrolnih laboratorija (OMCL Network), procene dela dokumentacije o leku koji se tiče kvaliteta u postupku registracije leka, obnove registracije i izmena i dopuna registracije – varijacije.

Od 2002. do 2010. godine bila je član delegacije Srbije u Komisiji Evropske farmakopeje u Strazburu.

Od 2007. do 2010. godine bila je član grupe eksperata Evropske farmakopeje *Procedure 4*, koja se bavi razvojem monografija za aktivne supstance kojima ističe patentna zaštita.

Od 2010. do 2011. godine radila je na regulatornim poslovima u predstavništvu kompanije Janssen Cilag u Beogradu.

Od 2011. godine je na poziciji rukovodioca regulatornih poslova i kontrole kvaliteta u kompaniji ADOC d.o.o. Beograd.

Član je Farmaceutskog društva Srbije.

Pohađala više stručnih usavršavanja u zemlji i inostranstvu iz oblasti praćenja savremene EU regulative u oblasti evaluacije dokumentacije o kvalitetu leka, uvođenja sistema kvaliteta prema zahtevima relevantnih nacionalnih i međunarodnih standarda u oblasti ispitivanja i kontrole lekova.

Objavila četiri naučna rada u međunarodnim časopisima i učestvovala sa šesnaest saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Ima aktivno znanje engleskog jezika i pasivno znanje francuskog jezika.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Машковић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мултикритеријумски приступ оптимизацији хроматографских метода за
фармацеутску анализу периндоприл *m*-бутиламина

- 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/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 17.4.2013.

Марија Машковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Машковић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Мултикритеријумски приступ оптимизацији хроматографских
метода за фармацеутску анализу периндоприл *m*-бутиламина

Ментор Проф. др Дарко Ивановић

Потписани Марија Машковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла 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, 17.4.2013.

Марија Машковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Мултикритеријумски приступ оптимизацији хроматографских метода за фармацеутску анализу периндоприл *m*-бутиламина

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/ла.

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, 17.4.2013.

