

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 06.03.2014. godine, imenovana je komisija u sastavu

1. dr sc. Mira Zečević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mentor
2. dr sc. Ljiljana Živanović, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. dr sc. Biljana Otašević, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „*Hemometrijski pristup u ispitivanju moksonidina, njegovih nečistoća i potencijalnih degradacionih proizvoda primenom metoda tačne hromatografije i masene spektrometrije*“, kandidata diplomiranog farmaceuta Svetlane Milovanović, stručnog saradnika u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija je napisana na 137 strana, ima 27 tabela, 52 slike i 101 literaturnih navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod, Cilj rada, Eksperimentalni deo, Rezultati i diskusija, Zaključak i Literatura.

Ciljevi doktorske disertacije

Cilj doktorske disertacije obuhvatio je razvoj, optimizaciju i validaciju RP-HPLC metode sa UV detekcijom za određivanje moksonidina i njegovih nečistoća (označenih prema Evropskoj farmakopeji kao nečistoća A, B, C i D), primenom eksperimentalnog dizajna, kako bi se ona primenila za ispitivanje u komercijalno dostupnim farmaceutskim doziranim oblicima. U ciljevima rada je sadržano i ispitivanje primarne hemijske stabilnosti aktivne farmaceutske supstance moksonidina i farmaceutskog doziranog oblika sprovođenjem studija forsirane degradacije i identifikacija novonastalih degradacionih proizvoda, primenom UHPLC-MS i UHPLC-MS/MS metoda, kao i definisanje puteva degradacije moksonidina. Sastavni deo ovih ispitivanja koji je takođe obuhvaćen ciljevima rada je i razvoj odgovarajuće *stability-indicating* UHPLC-PDA metode, primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji *stability-indicating* metode, kao i validacija predložene *stability-indicating* UHPLC-PDA metode u cilju potvrde njene primenljivosti u rutinskoj analizi.

Materijal i metode

U realizaciji predviđenih istraživanja korišćene su instrumentalne metode reverzno fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom sa UV/VIS detektorom (Agilent 1100 Series, *Agilent Technologies Deutschland GmbH*, Nemačka), tečne hromatografije pod ultra visokim pritiskom (*Accela UHPLC*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD) sa *photo diode array* UV/VIS spektrofotometrijskim detektorom (*Thermo Fisher Electron Corporation*), i masene spektrometrije (*Thermo scientific TSQ Quantum Access max triple stage quadrupole*, SAD).

Za optimizaciju hromatografskih metoda korišćen je eksperimentalni dizajn, u okviru koga je za RP-HPLC metodu primenjen centralni kompozicioni dizajn (*face centered cube* dizajn), dok je za razvoj i optimizaciju *stability-indicating* UHPLC-PDA metode u okviru *screening* dizajna primenjen 2^{4+1} frakcioni faktorski dizajn. Faktori koji su u toku *screening* faze pokazali statistički značajan uticaj na odgovor sistema, detaljnije su ispitani primenom 3^3 *Box-Behnken* dizajna. Zavisnost posmatranih odgovora sistema od uticaja ispitivanih faktora je predstavljena u obliku matematičkih modela, polinoma u kojima su sadržani pojedinačni uticaji faktora, kao i njihove međusobne interakcije. Dobijeni rezultati su dodatno predstavljani i grafički, u formi trodimenzionalnih dijagrama površina odgovora sistema u cilju jasnijeg tumačenja hromatografskog ponašanja supstanci i lakšeg, bržeg i preciznijeg uočavanja optimalnih eksperimentalnih uslova. Statistička značajnost svakog ispitivanog faktora određena je primenom *Studentovog t-testa*, odnosno kroz grafičku prezentaciju faktorskih efekata u vidu *Pareto* dijagrama. Adekvatnost dobijenih matematičkih modela ispitana je primenom metode analize varijanse (ANOVA).

Osim optimizacije odabranih hromatografskih parametara, vršena je i višestruka višefaktorska optimizacija *stability-indicating* UHPLC-PDA metode u odnosu na više željenih odgovora sistema. Metodologija višekriterijumskog odlučivanja koja je podrazumevala izračunavanje opšte *Derringer*-ove funkcije poželjnih odgovora sistema izabrana je kao najbolji pristup zadovoljavanju različitih ciljeva i iznalaženju adekvatnih kompromisa između njih. U toku statističke obrade rezultata, procene faktorskih efekata prema planu eksperimentalnog dizajna i *Derringer*-ove funkcije korišćeni su statistički programi *Design-Expert 7.0.0* (*StatEase*, SAD), *Statistica 5.0* (*StatSoft*, SAD), *Statistica 8.0* (*StatSoft*, SAD), kao i *Excel 2003*, u okviru paketa *Microsoft Office 2003* (*Microsoft*, SAD) i *Excel 2007*, u okviru paketa *Microsoft Office 2007* (*Microsoft*, SAD).

Validacija analitičke metode je izvršena u skladu sa regulativom u okviru *International conference on harmonization i Food and drug administration* (dokument ICH Q2(R1)), kao i propisima *Američke farmakopeje* (USP 30 – NF 25). Ovim dokumentima su definisani validacioni parametri, predviđeni postupci za njihovo ispitivanje, kao i kriterijumi prihvatljivosti rezultata. U okviru postupka validacije ispitivana je selektivnost, linearnost, preciznost, robusnost, tačnost i limiti detekcije i kvantifikacije analitičkih metoda, pri čemu je statistička analiza vršena korišćenjem statističkih programa *Excel 2003*, u okviru paketa *Microsoft Office 2003* (*Microsoft*, SAD) i *Excel 2007*, u okviru paketa *Microsoft Office 2007* (*Microsoft*, SAD).

Studije forsirane degradacije se sprovode sa ciljem da se ispita stabilnost farmaceutske aktivne supstance, njenog doziranog oblika, puteva degradacije supstance, kao i da se razvije analitička metoda za praćenje stabilnosti (*stability-indicating* metoda). Studije forsirane degradacije su sprovedene u skladu sa ICH smernicama za ispitivanje stabilnosti novih lekovitih supstanci i proizvoda, uz

posebno izdvojenu smernicu za ispitivanje fotostabilnosti (dokumenti ICH Q1A(R2) i ICH Q1B). U okviru studija forsirane degradacije ispitana je osetljivost supstance prema uticajima visoke temperature, baza, kiselina, oksidacionih sredstava i zračenja. Uticaj temperature je ispitivan na 70 °C. Podložnost hidrolitičkoj degradaciji je ispitana u neutralnim pH uslovima na sobnoj temperaturi i uz zagrevanje, u prisustvu rastvora HCl i rastvora NaOH različitih koncentracija. Podložnost oksidativnoj degradaciji je ispitana izlaganjem uzorka uticaju vodenih rastvora vodonik peroksida koncentracija u opsegu 3-10 % (v/v). Fotostabilnost je ispitana pod uticajem sunčeve svetlosti. Za svaki nameravani stres agens prema metodologiji istraživanja pripremljeni su odgovarajući kontrolni uzorci koji su se sastojali od rastvora leka koji se čuva pri normalnim uslovima (sobna temperatura, tamno i hladno mesto i slično), zatim "blanko" uzorka koji sadrži stres agense, a ne sadrži lek, kao i rastvor leka u prisustvu stres agensa analiziran u "nultom vremenu", odnosno odmah nakon što je pripremljen.

Rezultati istraživanja

U prvom i drugom delu poglavlja *Rezultati i diskusija* dat je opis preliminarnih ispitivanja hromatografskog ponašanja moksonidina i njegovih poznatih nečistoća A, B, C i D, kao i prikaz rezultata optimizacije i validacije nove RP-HPLC metode za određivanje moksonidina i njegovih poznatih nečistoća. Primenom centralnog kompozicionog dizajna ispitivan je uticaj udela metanola u mobilnoj fazi, pH vodene faze i temperature kolone na vrednost faktora kapaciteta pomenutih supstanci i rezoluciju između kritičnih parova (nečistoće C i D; nečistoće A i moksonidina). Utvrđeno je da procenat metanola u mobilnoj fazi i pH vodene faze predstavljaju statistički značajne faktore koji su dalje optimizovani primenom metodologije površine odgovora sistema. Prilikom odabira optimalnih hromatografskih uslova, konstruisani su trodimenzionalni dijagrami koji su omogućili vizuelizaciju ponašanja odgovora sistema u okviru ispitivanog eksperimentalnog domena. Optimalni uslovi su podrazumevali upotrebu mobilne faze sastavljene od metanola i vodenog rastvora kalijum-dihidrogenfosfata (0,05 mol L⁻¹, pH 3,5 podešen *orto*-fosfornom kiselinom), u odnosu 15:85 (v/v), temperatura kolone je održavana na 25 °C, dok je protok mobilne faze bio 1 mL min⁻¹. Linearnost metode je potvrđena vrednošću koeficijenta korelacije koji je iznosio za moksonidin 0,9986 i za nečistoće A, B, C i D redom 0,9988; 0,9973; 0,9996 i 0,9996. *Studentovim t-testom* potvrđeno je da ne postoji statistička značajnost odsečaka na y-osi dobijenih kalibracionih krivih. Vrednosti relativne standardne devijacije svih ispitivanih supstanci su bile manje od 2 % što je ukazalo na zadovoljavajuću preciznost metode. Odsustvom interferirajućih pikova iz tabletnog ekscipijensa potvrđena je selektivnost metode, dok su limiti detekcije za moksonidin i nečistoće A, B, C i D bili redom 0,02 µg mL⁻¹, 0,03 µg mL⁻¹, 0,01 µg mL⁻¹, 0,03 µg mL⁻¹ i 0,03 µg mL⁻¹, a limiti kvantifikacije su iznosili istim redosledom 0,06 µg mL⁻¹, 0,05 µg mL⁻¹, 0,04 µg mL⁻¹, 0,07 µg mL⁻¹ i 0,07 µg mL⁻¹. Robusnost metode je procenjena korišćenjem centralnog kompozicionog dizajna. Određivan je sadržaj moksonidina u tabletama i nađeno je 100,823 µg mL⁻¹, što iznosi 100,84 % u odnosu na deklarisanu sadržaj. Nađeni sadržaj nečistoće A je 0,117 µg mL⁻¹, nečistoće B je 0,079 µg mL⁻¹, nečistoće C 0,288 µg mL⁻¹ i nečistoće D 0,270 µg mL⁻¹, a utvrđen je i sadržaj nepoznate nečistoće od 0,219 µg mL⁻¹. Svi dobijeni rezultati bili su u okviru deklarisanog opsega.

U trećem delu poglavlja *Rezultati i diskusija* prikazani su rezultati studije forsirane degradacije primenjene za ispitivanje stabilnosti moksonidina, farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika, što je u daljem istraživanju omogućilo

razvoj hromatografske metode za praćenje stabilnosti. Ovim studijama je ustanovljeno da je moksonidin veoma otporan na uticaje ekstremnih temperatura, oksidativnog stresa i zračenja. Rastvori supstance su izlagani uticaju 0,5 mol L⁻¹ rastvora HCl u trajanju od 80 minuta i 2 mol L⁻¹ NaOH u trajanju od 15 minuta uz zagrevanje na 70 °C. Pod uticajem hidrolize u kiseloj sredini zabeležena je degradacija moksonidina od 5 %, dok je u baznoj sredini degradacija iznosila 15 %. Čvrsta supstanca i sprášena tabletna masa, kao i odgovarajući rastvori, izlagani su uticaju temperature od 70 °C i sunčevoj svetlosti u trajanju od 7 dana, nakon čega nije konstatovana značajna degradacija. Ponašanje moksonidina pod uticajem oksidativnog stresa ispitano je izlaganjem rastvora moksonidina 10 % vodenom rastvoru H₂O₂ (v/v) u toku 5 sati, nakon čega takođe nije konstatovana značajna degradacija. UHPLC-PDA metoda je omogućila definisanje retencionog ponašanja i apsorpcionih svojstava nastalih degradacionih proizvoda u uslovima kisele i bazne hidrolize. Struktura degradacionih proizvoda je dodatno potvrđena sprovođenjem UHPLC-MS analize, dok je fragmentacija moksonidina i njegovih degradacionih proizvoda sprovedena primenom UHPLC-MS/MS analize. Utvrđeno je da se hidrolizom u kiseloj sredini kao dominantni degradacioni proizvod javlja nečistoća A, kao i nepoznati degradacioni proizvod ispod propisanog limita za studije forsirane degradacije, dok se hidrolizom u baznoj sredini kao dominantni degradacioni proizvod stvara nečistoća D. Na osnovu dobijenih podataka predložen je put degradacije moksonidina, kao i put fragmentacije moksonidina i dobijenih degradacionih proizvoda.

Rezultati dobijeni tokom studije forsirane degradacije omogućili su razvoj i optimizaciju nove UHPLC-PDA *stability-indicating* metode, koji je opisan u četvrtom delu poglavlja *Rezultati i diskusija*. Nakon preliminarnih ispitivanja, tokom *screening* faze primenom 2⁴⁻¹ frakcionog faktorskog dizajna ispitano je uticaj udela metanola i koncentracije pufera u mobilnoj fazi, pH vodene faze i temperature kolone na vrednost faktora kapaciteta pomenutih supstanci. Konstruisani su *Pareto* dijagrami koji su omogućili procenu pojedinačnih faktorskih efekata i faktorskih interakcija. Utvrđena je statistička značajnost svih ispitivanih faktora, međutim imajući u vidu izražen uticaj koncentracije pufera u mobilnoj fazi na trajanje hromatografske analize, kao i na pojavu *tailing*-a hromatografskog pika aktivne supstance, odlučeno je da se analiza uticaja preostalih faktora u okviru optimizacionog dizajna vrši pri konstantnoj vrednosti koncentracije pufera od 10 mmol L⁻¹. Preostali faktori su detaljnije ispitani i optimizovani kroz istovremenu sistematičnu upotrebu 3³ *Box-Behnken* dizajna i *Derringer*-ovih funkcija poželjnih odgovora sistema. Kao odgovor sistema praćena je vrednost rezolucije između ispitivanih supstanci. Na osnovu dobijenih matematičkih modela koji su opisali ponašanje više posmatranih odgovora sistema, izračunate su pojedinačne funkcije poželjnih odgovora prema zadatim kriterijumima, kao i opšta *Derringer*-ova funkcija koja je dodatno grafički predstavljena u obliku trodimenzionalnih dijagrama. Na ovaj način su definisani eksperimentalni uslovi koji su omogućili najkraću moguću analizu uz zadovoljavajuću razdvojenost komponenata smeše što je uključivalo mobilnu fazu sastava metanol - rastvor amonijum-acetata (10 mmol L⁻¹) pH 3,43 podešen sa glacijalnom sirćetnom kiselinom (0,9:99,1, v/v), pri protoku od 870 µg min⁻¹, i temperaturi kolone od 50,13 °C.

Validacija *stability-indicating* UHPLC-PDA metode opisana je u petom delu poglavlja *Rezultati i diskusija*. Koeficijenti korelacije kalibracionih krivih su bili veći od 0,999, a *Studentovim t-testom* je potvrđeno da ne postoji statistička značajnost odsečka na y-osi. Vrednosti relativne standardne devijacije svih ispitivanih supstanci su bile manje od 2 % što je ukazalo na zadovoljavajuću preciznost metode. Vrednosti limita detekcije su bile 0,04 µg mL⁻¹ za moksonidin; 0,02 µg mL⁻¹ za nečistoće A i B;

0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću C i 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću D, dok su limiti kvantifikacije iznosili 0,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za moksonidin; 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoće A i B; 0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću C i 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ za nečistoću D. Određivan je sadržaj moksonidina u tabletama i nađeno je 101,617 $\mu\text{g mL}^{-1}$, što iznosi 101,62 % u odnosu na deklarirani sadržaj. Nađeni sadržaj nečistoće A je 0,181 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nečistoće C 0,223 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i nečistoće D 0,207 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dok je sadržaj nečistoće B bio ispod *LOD* vrednosti. Svi dobijeni rezultati bili su u okviru deklarisanog opsega.

B. ANALIZA REZULTATA ISTRAŽIVANJA

Analiza rezultata istraživanja RP-HPLC metode za određivanje moksonidina i njegovih poznatih nečistoća

U osnovi hemijske strukture moksonidina i njegovih nečistoća A, B, C i D nalaze se dva heterociklična prstena, pirimidinski i imidazolidinski. Strukturnu razliku između moksonidina i njegovih nečistoća čini samo jedan supstituent (-OCH₃, -Cl ili -OH) na položaju C-4 ili C-6 pirimidinskog prstena. Ova činjenica ukazuje na izraženu strukturnu sličnost ispitivanih jedinjenja, čije se hromatografsko ponašanje samim tim prevashodno zasniva na hemijskim osobinama prisutnog supstituenta. Takođe, postojanje strukturne sličnosti jedinjenja u višekomponentnom analitu predstavlja otežavajući faktor u razvoju izokratske metode. Izbor pH oblasti za ispitivanje hromatografskog ponašanja moksonidina bio je zasnovan na stepenu zastupljenosti molekulskog oblika u zavisnosti od pH vrednosti rastvora, što je ukazalo na činjenicu da hromatografsko ispitivanje moksonidina treba vršiti u oblasti kisele pH vrednosti. Poznavanje navedenih osobina moksonidina, uzimajući u obzir i njegov lipofilan karakter, uticalo je na izbor C₁₈ stacionarne faze. Ovaj tip stacionarne faze sadrži duge ugljovodonične C18 lance što ove kolone izdvaja po veoma niskoj polarnosti, zbog čega se slabo polarna jedinjenja na njima sporije eluiraju. Kao organska komponenta mobilne faze izabran je metanol najpre zbog bolje rastvorljivosti ispitivanih supstanci u ovom rastvaraču u odnosu na acetonitril i njegove manje toksičnosti, dok je kao modifikator mobilne faze izabran fosfatni pufer koji dodatno umanjuje mogućnost nastajanja interakcija sa analitom i pojavu nesimetričnih hromatografskih pikova (*tailing* faktor). Nakon odabira pomenutih uslova, ispitivana je selektivnost mobilne faze. Pretpostavljeno je da procenat organskog rastvarača, pH vrednost vodene faze i temperatura kolone mogu uticati na stepen hromatografske razdvojenosti ispitivanih jedinjenja, što je i ispitano izvođenjem eksperimenata prema planu za centralni kompozicioni dizajn. Kako bi se hromatografsko ponašanje supstanci u funkciji ispitivanih faktora predstavilo grafički, faktor sa najmanjim uticajem je održavan pri konstantnoj vrednosti, dok su na osnovu vrednosti preostala dva eksperimentalna faktora konstruisani 3D dijagrami, koji su omogućili lakše, jednostavnije i preciznije uočavanje optimalnih podešenja parametara metode. Na osnovu dobijenih rezultata definisani su optimalni hromatografski uslovi i izvršena je validacija RP-HPLC metode kojom je potvrđena dobra selektivnost, osetljivost, linearnost, preciznost, robusnost i primenljivost na tabletnoj formulaciji moksonidina.

Analiza rezultata istraživanja stabilnosti moksonidina i UHPLC metode za praćenje njegove stabilnosti

U toku sprovedene studije forsirane degradacije moksonidina, uzorci čiste supstance i njenog doziranog oblika su izlagani ekstremnim eksperimentalnim uslovima koji su birani na taj način da dovedu do razgradnje 5-20 % uzorka. Zagrevanje uzorka je vršeno na 70 °C u trajanju od 8 sati nakon čega je zaključeno da nije došlo do statistički značajnog razlaganja. Isti zaključak je formiran i nakon izlaganja uzorka u obliku praškaste čiste supstance, sprašene tabletno masu i rastvora uticaju sunčeve svetlosti u trajanju od 7 dana. Tokom oksidativnog stresa pod uticajem 10 % vodenog rastvora H₂O₂ (v/v) tokom 5 sati takođe nije zabeležena značajna degradacija. Jačina kiseline i baze birane su na taj način da dovedu do pomenutog stepena razgradnje. Shodno tome, moksonidin je izlagan uticaju 0,5 mol L⁻¹ HCl u trajanju od 80 minuta i 2 mol L⁻¹ NaOH, uz zagrevanje na temperaturi od 70 °C u trajanju od 15 minuta. Registrovana je pojava jednog dominantnog degradacionog proizvoda nakon hidrolize u kiselj sredini i jednog dominantnog degradacionog proizvoda nakon hidrolize u baznoj sredini. U cilju preciznijeg tumačenja rezultata ispitivanja stabilnosti, vršene su UHPLC-PDA i UHPLC-MS analize. Konstatovano je da se hidrolizom u kiselj sredini kao dominantni degradacioni proizvod javlja nečistoća A, kao i nepoznati degradacioni proizvod ispod propisanog limita za studije forsirane degradacije, dok se hidrolizom u baznoj sredini kao dominantni degradacioni proizvod stvara nečistoća D. Primenom MS/MS analize, nakon cepanja polaznih molekula u masenom spektrometru došlo je do formiranja karakterističnih fragmentnih jona na osnovu kojih je predložen put fragmentacije moksonidina i njegovih degradacionih proizvoda. U slučaju masenog spektra pika nepoznate nečistoće dobijeni fragmentni joni razlikovali su se od fragmentnih jona moksonidina, tako da strukturne karakteristike nepoznatog degradacionog proizvoda nisu utvrđene. Međutim, kako je navedeni nepoznati degradacioni proizvod u uslovima forsirane degradacije hidrolizom u kiselj sredini formiran u količini koja je ispod propisanog limita za studije forsirane degradacije, dalja ispitivanja u cilju strukturne identifikacije biće svrsishodna samo ukoliko se isti bude javljao i kroz ubrzane i dugoročne studije stabilnosti moksonidina.

Nakon preliminarnih ispitivanja u cilju razvoja *stability-indicating* UHPLC metode, kao stacionarna faza izabrana je takođe C₁₈ kolona, dok je kao modifikator mobilne faze umesto fosfatnog izabran acetatni pufer zbog njegove isparljivosti i kompatibilnosti sa MS detektorom. Metanol je na osnovu već opisanih prednosti i njegove pogodnosti za MS analizu zadržan kao organska komponenta mobilne faze. Zapaženo je da je redosled eluiranja ispitivanih komponenti ostao nepomenjen i na UHPLC koloni, čime je dodatno potvrđena konzistentnost hromatografskog ponašanja moksonidina i njegovih nečistoća. Nakon *screening* faze u kojoj su statističkom analizom, primenom *Studentovog t-testa* i konstruisanjem *Pareto* dijagrama definisani faktori koji imaju statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci (udeo metanola i koncentracije pufera u mobilnoj fazi, pH vodene faze i temperatura kolone), u cilju skraćivanja hromatografskog *run*-a i sprečavanja pojave *tailing*-a hromatografskog pika aktivne supstance, odlučeno je da se analiza uticaja preostalih faktora u okviru optimizacionog dizajna vrši pri konstantnoj vrednosti koncentracije pufera od 10 mmol L⁻¹. Preostali faktori su detaljnije ispitani primenom *3³ Box-Behnken* optimizacionog dizajna, pri čemu je eksperimentalni opseg za vrednost temperature kolone sužen za 10 °C u odnosu na *screening* fazu, kako bi se sprečilo prolongiranje hromatografskog *run*-a koje je zapaženo pri nižem nivou ovog

faktora tokom *screening* faze. Kombinacija informacija koje pruža 3^3 *Box-Behnken* dizajn (matematički model koji opisuje ponašanje odgovora sistema u zavisnosti od uticaja izabranih eksperimentalnih faktora) i *Derringer*-ovih funkcija poželjnih odgovora sistema kojima se uklapaju zadati ciljevi za svaki pojedinačni odgovor sistema sa opštim kompromisnim poželjnim odgovorima sistema omogućila je značajno unapređenje hromatografske metode. Opšta *Derringer*-ova funkcija poželjnih odgovora sistema je grafički predstavljena u formi trodimenzionalnih dijagrama čijom analizom je uočena lokalizacija maksimuma funkcije, odnosno vrednosti parametara metode koje omogućavaju zadovoljenje svih postavljenih ciljeva. Nakon odabira već navedenih optimalnih uslova, izvršena je validacija metode kojom je potvrđena dobra selektivnost, osetljivost, linearnost, preciznost, robusnost i primenljivost na uzorku doziranog oblika moksonidina.

C. ZAKLJUČAK

Razvijena je i optimizovana nova RP-HPLC metoda sa UV detekcijom za određivanje moksonidina i njegovih nečistoća A, B, C i D u farmaceutskom doziranom obliku. Nakon preliminarnih ispitivanja utvrđeno je da na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci najviše utiče udeo metanola u mobilnoj fazi, temperatura kolone i pH vrednost vodene faze. Izvršena je optimizacija metode primenom centralnog kompozicionog dizajna (*face centered cube* dizajna) u kojoj je uticaj navedenih faktora detaljnije ispitan, a kao odgovori sistema praćeni su faktori kapaciteta svih ispitivanih supstanci, kao i vrednost rezolucije između kritičnih parova ($R_{D/C}$ i $R_{A/moksonidin}$). Na osnovu regresione analize i analize varijanse (ANOVA) izvršena je statistička procena značajnosti uticaja ispitivanih faktora, odnosno adekvatnosti dobijenog matematičkog modela koji opisuje ponašanje posmatranog sistema. Konstruisani su 3 D dijagrami posmatranih odgovora sistema u funkciji udela metanola u mobilnoj fazi i pH vrednosti vodene faze. Definisani su optimalni hromatografski uslovi za izokratsko razdvajanje ispitivanih supstanci na koloni *Symmetryshield*, C₁₈, (250 mm×4,6 mm, 5 μm), koji su uključivali mobilnu fazu sastava metanol - rastvor kalijum-dihidrogenfosfata (0,05 mol L⁻¹) pH 3,5 podešen sa *orto*-fosfornom kiselinom (15:85, v/v), temperaturu kolone 25 °C, protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹, volumen injiciranja od 20 μL i talasnu dužinu detekcije od 255 nm. Validacijom RP-HPLC metode potvrđena je dobra selektivnost, osetljivost, linearnost, preciznost i robusnost metode. Primenom RP-HPLC metode za određivanje sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća u farmaceutskom doziranom obliku (tablete), dobijeni su reproduktivni rezultati, uz kvantifikaciju jedne nepoznate nečistoće, čiji je sadržaj bio u dozvoljenim granicama.

Razvijeni su i postavljeni izokratski hromatografski uslovi za ispitivanje uzoraka dobijenih u studiji forsirane degradacije moksonidina, primenom UHPLC-PDA tehnike. Navedeni uslovi su uključili kolonu *Hypersil Gold aq*, C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), mobilnu fazu sastava rastvor amonijum-acetata (10 mmol L⁻¹) pH 3,5, temperaturu kolone od 55 °C, protok mobilne faze od 450 μL min⁻¹, volumen injiciranja od 3 μL i talasnu dužinu detekcije od 255 nm.

Sprovedena je studija forsirane degradacije aktivne farmaceutske supstance moksonidin i farmaceutskog doziranog oblika (tablete). Ispitivanje stabilnosti izvršeno je u uslovima hidrolize u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini, termalne degradacije, oksidacije i fotolize. Farmaceutski dozirani oblik je u ispitivanim uslovima pokazao apsolutnu stabilnost, dok je aktivna farmaceutska supstanca

pokazala degradaciju u uslovima hidrolize u kiseloj sredini (0,5 mol L⁻¹ HCl) i baznoj sredini (2 mol L⁻¹ NaOH, 70 °C). U uslovima hidrolize u kiseloj sredini zabeležena je pojava nepoznatog degradacionog proizvoda čiji je sadržaj ispod dozvoljenog limita u studijama forsirane degradacije.

Identifikacija nastalih degradacionih proizvoda je izvršena UHPLC-PDA, UHPLC-MS i MS/MS metodama, na osnovu njihovih retencionih vremena i odgovarajućih spektara na oba detektora. Kao dominantni proizvod hidrolitičke degradacije moksonidina u kiseloj sredini identifikovana je nečistoća A, dok je dominantni proizvod hidrolitičke degradacije moksonidina u baznoj sredini bila nečistoća D. Na osnovu dobijenih rezultata studije forsirane degradacije definisani su putevi degradacije moksonidina.

Razvijena je i optimizovana nova izokratska metoda za praćenje stabilnosti aktivne farmaceutske supstance moksonidin i odgovarajućeg farmaceutskog doziranog oblika (tablete). Metoda je razvijena primenom eksperimentalnog dizajna i metodologije multikriterijumskog odlučivanja. U *screening* fazi, za identifikaciju faktora koji imaju statistički značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci korišćen je 2⁴⁻¹ frakcioni faktorski dizajn. Ispitivan je uticaj koncentracije pufera, udela metanola u mobilnoj fazi, temperature kolone i pH vrednosti vodene faze, a kao posmatrani odgovori sistema praćeni su faktori kapaciteta svih ispitivanih supstanci. Prikaz rezultata putem Pareto dijagrama ukazao je da sva četiri ispitivana faktora imaju značajan uticaj na hromatografsko ponašanje ispitivanih supstanci, ali je u cilju postizanja odgovarajuće simetrije hromatografskog pika moksonidina i sprečavanja dugotrajnosti analize, za optimizaciju metode selektovana koncentracija pufera od 10 mmol L⁻¹. Optimizacija metode izvršena je primenom 3³ *Box-Behnken* dizajna kojim je detaljnije ispitivan uticaj preostala tri faktora na vrednost rezolucije između svih ispitivanih supstanci. Na osnovu regresione analize i analize varijanse (ANOVA) izvršena je statistička procena značajnosti uticaja ispitivanih faktora, odnosno adekvatnosti dobijenog matematičkog modela koji opisuje ponašanje posmatranog sistema. Konstruisani su 3 D dijagrami posmatranih odgovora sistema. Krajnji optimalni uslovi su definisani primenom multikriterijumskog odlučivanja, izračunavanjem opštih *Derringer*-ovih funkcija poželjnih odgovora. Kako je dobijena vrednost opšte *Derringer*-ove funkcije iznosila 1, svi postavljeni ciljevi su bili maksimalno zadovoljeni. Konstruisan je 3 D dijagram *Derringer*-ove funkcije u odnosu na pH vrednost vodene faze i udeo metanola u mobilnoj fazi. Definisani optimalni uslovi *stability-indicating* metode su uključili kolonu *Hypersil Gold aq, C₁₈* (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), mobilnu fazu sastava sastava metanol - rastvor amonijum-acetata (10 mmol L⁻¹) pH 3,43, podešen dodatkom glacijalne sirćetne kiseline (0,90: 99,1, v/v), temperaturu kolone od 55 °C, protok mobilne faze od 870 μL min⁻¹, volumen injiciranja od 3 μL i talasnu dužinu detekcije od 255 nm. Validacijom RP-HPLC metode potvrđena je odgovarajuća selektivnost, osetljivost, linearnost, preciznost i robusnost metode. Primenom UHPLC-PDA metode za određivanje sadržaja moksonidina i njegovih nečistoća u farmaceutskom doziranom obliku (tablete), dobijeni su reproduktivni rezultati, čime je potvrđena primenjivost metode za ispitivanje stabilnosti aktivne farmaceutske supstance i farmaceutskog doziranog oblika.

D OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi iz doktorske disertacije štampani u međunarodnim časopisima:

Milovanović S, Otašević B, Zečević M, Zivanović L, Protić A. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of moxonidine in the presence of its impurities. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 59: 151-156.

Otašević B, **Milovanović S**, Zečević M, Golubović J, Protić A. UPLC Method for Determination of Moxonidine and Its Degradation Products in Active Pharmaceutical Ingredient and Pharmaceutical Dosage Form. *Chromatographia.* 2014; 77: 109-118.

Rad iz doktorske disertacije saopšten na međunarodnom skupu štampan u proširenom obliku:

Svetlana Milovanović, Mira Zečević, Biljana Otašević, Ljiljana Živanović, Ana Protić. Razvoj RP-HPLC metode za određivanje moksonidina u prisustvu njegovih nečistoća. *II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem*, Banja Luka, 17-20. novembra 2011.

Rad iz doktorske disertacije saopšten na domaćem skupu štampan kao kratak izvod:

Svetlana Milovanović, Mira Zečević, Biljana Otašević. Ispitivanje uslova za RP-HPLC analizu moksonidina u prisustvu njegovih nečistoća. *5. Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem*, Beograd, 13-17. oktobar 2010. *Arh. farm.* 2010; 60: 962-963.

Radovi iz doktorske disertacije saopšteni na međunarodnim skupovima štampani kao kratak izvod:

Jelena Golubović, **Svetlana Milovanović**, Biljana Otašević, Mira Zečević, Ana Protić. Stability-indicating UPLC assay method for moxonidine active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage form, 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, June 16-20, 2013, Amsterdam, The Netherlands.

E. MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega što je izloženo u doktorskoj disertaciji smatramo da ovaj rad predstavlja značajan naučni doprinos za oblast analitike lekova zbog primene novih naprednih optimizacionih tehnika u razvoju analitičkih metoda, kao i primene savremenih instrumentalnih metoda u analitici lekova. Rezultati ove doktorske disertacije imaju praktičnu primenu u ispitivanju i kontroli kvaliteta farmaceutskih doziranih oblika moksonidina, naročito imajući u vidu rutinsku primenljivost predloženih metoda u odnosu na oficinalnu metodu, kao i činjenicu da je na polju analitike mosonidina veoma malo dostupnih podataka u relevantnoj literaturi. Rezultati iz ove doktorske disertacije publikovani su kao dva rada u časopisima međunarodnog značaja (kategorije M22 i M23).

Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „*Hemometrijski pristup u ispitivanju moksonidina, njegovih nečistoća i potencijalnih degradacionih proizvoda primenom metoda tačne hromatografije i masene spektrometrije*“, kandidata diplomiranog farmaceuta Svetlane Milovanović.

Članovi komisije:

1. dr sc. Mira Zečević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski
fakultet, mentor

2. dr sc. Ljiljana Živanović, redovni profesor u
penziji, Univerzitet u Beogradu –
Farmaceutski fakultet

3. dr sc. Biljana Otašević, docent, Univerzitet u
Beogradu – Farmaceutski fakultet

U Beogradu, 03.04.2014.