

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Nataša M. Dorđević Filijović

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

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Nataša M. Dorđević Filijović

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

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

MENTORI:

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

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

ČLANOVI KOMISIJE:

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

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

Datum odbrane: _____

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

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

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

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

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

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

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

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

REZIME

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

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

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

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

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

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

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

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

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj: 615.214:543.061:004.9(043.3)

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDK number: 615.214:543.061:004.9(043.3)

SADRŽAJ

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

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

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

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

LISTA SKRAĆENICA

ANOVA – *Analysis of Variance*

API – *Active Pharmaceutical Ingredient* (aktivna supstanca)

ATR – *Attenuated Total Reflectance*

CAS – *Connolly Accessible Surface Area*

CCC – *Central Composite Circumscribed design*

CCD – *Central Composite Design*

CCF – *Central Composite Face-centered design*

CEF – *Chromatographic Exponential Function*

COSY – *Correlation Spectroscopy*

CRF – *Chromatographic Response Functions*

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

DP – *Degradation Product*

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

FFD – *Full Factorial Design*

HBA – *Hydrogen Bond Acceptors*

HBD – *Hydrogen Bond Donors*

HMBC – *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*

HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital*

HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography*

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

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

ICH – *International Conference on Harmonization*

IR – *Infrared Spectroscopy*

IT - *Identification Threshold*

LOD – *Limit Of Detection*

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

LOQ – *Limit of Quantification*

LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

LV – *Latent Variable*

MLR – *Multiple Linear Regressions*

MS – *Mass Spectrometry*

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

1. UVOD

1.1. Ispitivanje kompatibilnosti aktivne i pomoćnih supstanci

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

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

1.1.1. Tipični aspekti reakcija u čvrstom stanju

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

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

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

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

1.1.2. Fizička nestabilnost

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

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

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

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

1.1.3. Hemijska nestabilnost

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

1.1.3.1. Direktna reakcija aktivne i pomoćnih supstanci

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

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

1.1.3.2. Ekscipijensi kao katalizatori reakcija degradacije aktivne supstance

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

1.1.3.3. Uticaj pH vrednosti ekscipijenasa

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

1.1.4. Reakcije aktivnih supstanci sa nečistoćama ekscipijenasa

1.1.4.1. Peroksidi

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

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

1.1.4.2. Aldehidi i kiseline

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

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

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

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

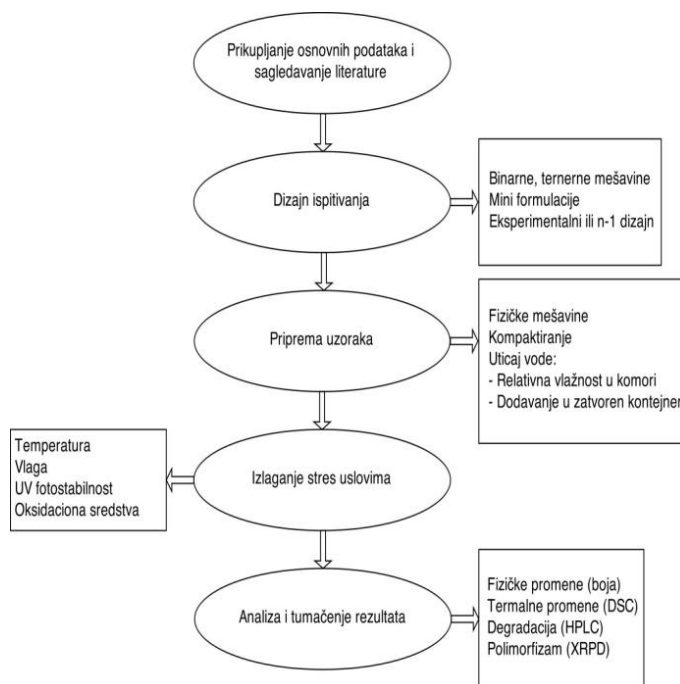
1.1.4.3. Metali

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

1.1.5. Plan studija kompatibilnosti

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

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



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

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

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

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

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

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

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

1.1.6. Literaturni podaci

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Studije stabilnosti farmaceutskih proizvoda

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

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

1.2.1. Ispitivanja stabilnosti u fazi razvoja proizvoda

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

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

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

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

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

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

Preuređenjem ove jednačine dobija se sledeći izraz:

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.2. Metode za analizu nečistoća tokom studija stabilnosti

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

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

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

Retencioni hromatografski parametri karakteristični za svaki pik na hromatogramu su:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3. Validacija HPLC metode za analizu nečistoća

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

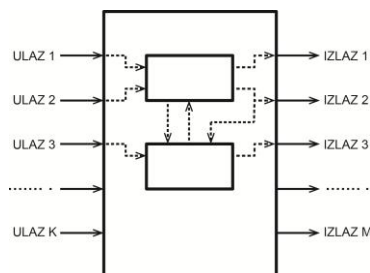
Validacija metoda izvodi se na osnovu unapred pripremljenih validacionih protokola i kriterijuma za procenu rezultata. Nakon završene validacije dobija se metoda za rutinsko izvođenje analize nečistoća u aktivnim supstancama i farmaceutskim proizvodima, a za potrebe ispitivanja stabilnosti.

1.2.4. Literaturni podaci

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

1.3. Eksperimentalni dizajn

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



Slika 2. Sistem sa prikazom odnosa između osnovnih elemenata

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

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

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

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

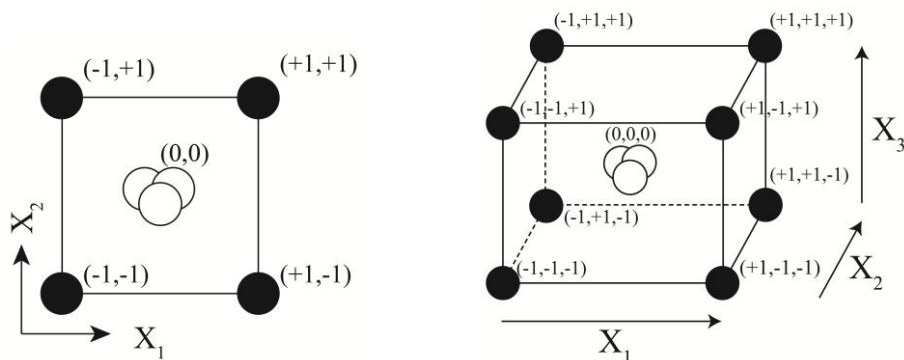
1.3.1. Faktorski i kompozitni dizajn ispitivanja

Definisanje faktorskog dizajna podrazumeva sledeće korake:

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

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

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



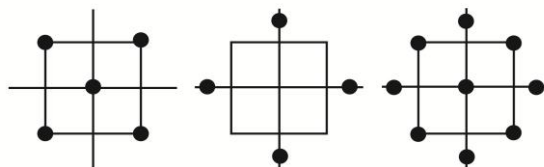
a) b)
Slika 3. Eksperimenti faktorskog dizajna a) 2^2 i b) 2^3 sa centralnom tačkom

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

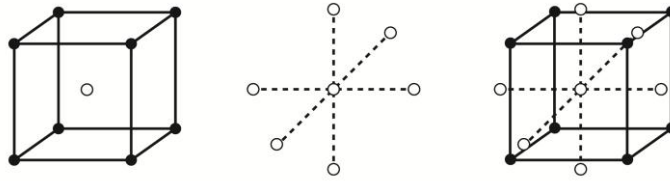
Primena punog faktorskog dizajna izvodljiva je kada se ispituje uticaj dva do četiri faktora na dva nivoa. U slučajevima kada je broj faktora pet ili više, primena punog faktorskog dizajna zahteva izvođenje velikog broja eksperimenata, što nije praktično i ekonomski opravdano. Iz tog razloga se u ovim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

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

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

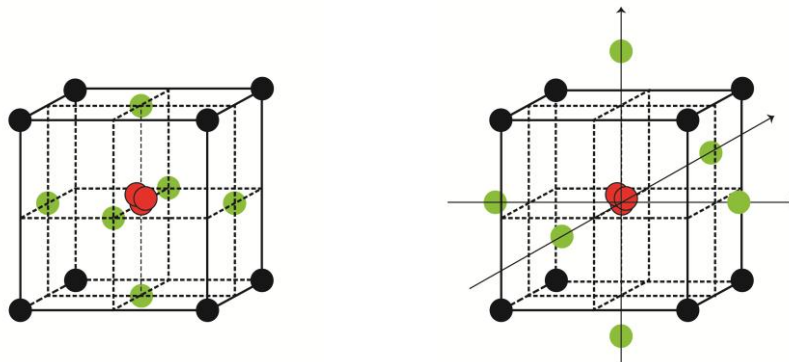


Slika 4. Eksperimenti CCC dizajna sa dva faktora



Slika 5. Eksperimenti CCC dizajna sa tri faktora

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



Slika 6. Eksperimenti CCF i CCC dizajna sa tri faktora

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

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

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

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

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

gde su:

x_1, x_2, \dots, x_i - faktori,

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

ε - rezidua tj. odstupanje modelovanja

y - odgovor sistema.

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

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

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

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

gde je:

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

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

SS_{residual} - varijansa koja se ne može modelovati

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2. Funkcije hromatografskog odgovora

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Eksponencijalna funkcija sadrži dva člana: prvi koji procenjuje razdvajanje

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

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

Dobra funkcija hromatografskog odgovora treba da bude efikasna u razlikovanju kvaliteta hromatograma i da obezbedi pouzdano matematičko rešenje za kvantitativnu procenu njihovog kvaliteta i rangiranje hromatograma. Međutim, treba reći da nijedna od njih nije univerzalno primenljiva, već odabir odgovarajuće funkcije zavisi od očekivanja analitičara u vezi sa različitim problemima razdvajanja, koji se bitno mogu razlikovati [83].

1.3.3. Matematičko modelovanje primenom regresione analize metodom delimičnih najmanjih kvadrata (PLS)

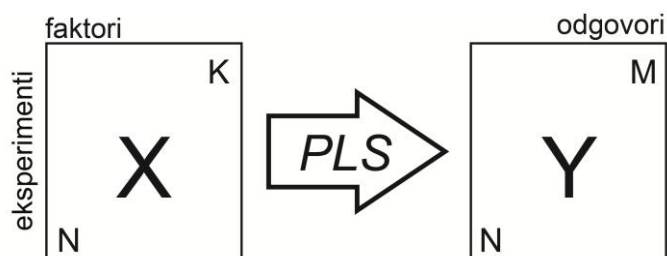
Hemometrijski pristup rešavanju problema podrazumeva korišćenje matematičkih i statističkih metoda u oblasti hemije kako bi se na osnovu malog broja dobro isplaniranih eksperimenata definisalo ponašanje sistema. Cilj je da se analizom hemijskih, eksperimentalnih podataka dobiju relevantne hemijske informacije. Na taj način, proces optimizacije izvodi se teoretskim pretraživanjem eksperimentalnog prostora, bez dodatnih eksperimenata. Ova strategija podrazumeva modelovanje sistema i predviđanje njegovog ponašanja korišćenjem kompjuterske simulacije. Uvođenje ovog pristupa omogućava da se iskoristi veliki broj podataka koje daje moderna analitička oprema. Takođe, za najveći broj hemijskih pojava svojstvena je multivarijantnost, što zapravo znači da na jednu pojavu (zavisno promenljivu) utiče veći broj faktora (nezavisno promenljivih). Multivarijantne tehnike za analizu podataka mogu se podeliti u tri osnovne grupe: a) opisivanje podataka, odnosno modelovanje strukture podataka, b) klasifikacija i svrstavanje podataka u grupe i c) regresija i predviđanje [84, 85].

Regresiona analiza metodom delimičnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square*, PLS) predstavlja jednu od osnovnih alatki u hemometriji. Razvijena je u novije vreme kao generalizacija višestruke linearne regresije (engl. *Multiple Linear Regression*, MLR). Koristi se kada je potrebno analizirati veliki broj podataka tj. X promenljivih koje pokazuju međusobnu korelaciju zbog čega se one ne označavaju kao nezavisno promenljive već samo kao promenljive i za istovremeno modelovanje nekoliko zavisnih promenljivih, Y tj. odgovora sistema. Ovaj model ima veliku moć predviđanja i omogućava da se istraže veoma kompleksni problemi [65].

Metodu je osmislio i razvio Herman Wold 1975. godine za potrebe modelovanja složenih grupa podataka. 80-tih godina PLS model je modifikovan kako bi se prilagodio naučnim

i tehnološkim podacima. U novije vreme se radi boljeg opisivanja interpretira kao projekcija u latentne varijable (engl. *Projection to Latent Structures*) [86]. Uspešno je primenjivana za potrebe QSAR (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship*) modelovanja, multivarijantne kalibracije i praćenja procesa i njegove optimizacije.

Ukoliko matrica X ima dimenzije N x K, gde je N broj eksperimenata (tačaka tj. redova), a K broj faktora tj. nezavisno promenljivih (kolona), a matrica Y dimenzije N x M, gde je M broj odgovora sistema (kolona), zadatak PLS regresije će biti definisanje veze između ovih matrica. Za svaku od matrica može se konstruisati prostor od K, odnosno M dimenzija, tako da svaka X i Y promenljiva predstavlja koordinatne ose u tom prostoru (Slika 7).



Slika 7. Matrice nezavisno (X) i zavisno (Y) promenljivih u PLS regresionoj tehnici. N predstavlja broj eksperimenata, uzoraka, jedinjenja, serija, itd.

PLS modelovanje podrazumeva uspostavljanje veze između dve grupe podataka, X i Y, sa ciljem da se na osnovu podataka u X predvide podaci u Y, uz prethodno formiranje modela za X i Y. Ovo se postiže bilinearnim projekcijama:

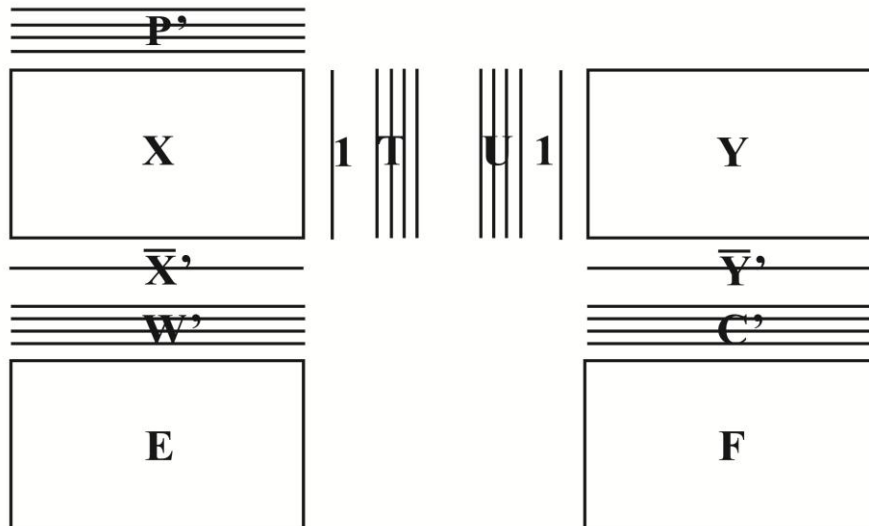
$$X = 1\bar{x}' + TP' + E \quad (17.)$$

$$Y = 1\bar{y}' + UC' + F \quad (18.)$$

$1\bar{x}'$ i $1\bar{y}'$ predstavljaju prosečne vrednosti promenljivih i potiču od faze kojom se promenljive tj. podaci preoblikuju i transformišu u oblik pogodan za analizu. Jedna od takvih faza je normalizacija numeričkih opsega promenljivih (engl. *scaling*) čime se svim promenljivim daje podjednaka važnost u formiranom modelu. Jedan od najčešće korišćenih metoda za standardizaciju je normalizacija varijanse (engl. *unit variance scaling*, UV). Druga osnovna faza u preoblikovanju podataka je centriranje (engl. *mean-centering*) čime se poboljšava tumačenje modela.

Informacija o eksperimentima se čuva u matricama rezultata T i U (engl. *scores matrices*), a informacija o promenljivima u matrici P' za X-prostor (engl. *X-loading matrix*) i matrici C' za Y prostor (engl. *Y-weight matrix*). Deo varijacije podataka koji se ne modeluje pripada matricama odstupanja E i F (engl. *residual matrices*).

PLS model je model maksimalne kovarijanse između podataka u X i Y prostoru. Grafički prikaz međusobnih odnosa svih matrica u PLS modelu dat je na Slici 8.



Slika 8. Odnosi matrica u PLS

Matrica opterećenja W za X prostor sadrži vektore opterećenja za X, w_a koji pokazuju kako se X promenljive linearno kombinuju da bi se formirali vektori rezultata t_a .

PLS model kreira nove X promenljive, t , kao linearane kombinacije starih, koje zatim koristi za predviđanje Y. Broj novih promenljivih, t , tj. komponentata, zavisi od značaja predviđanja koje se pomoću njih ostvaruje. Za svaku komponentu (a) u PLS modelu dobijaju se vrednosti sledećih parametara: t_a , u_a , w_a (w_a^*), p_a i c_a .

Rezultati t i u sadrže informacije o eksperimentima, sličnostima i razlikama koje među njima postoje kada se posmatraju u odnosu na dati problem. Takođe, grafički prikaz rezultata (engl. *score plot*) pokazuje kako se eksperimenti (engl. *observations*) projektuju iz prostora sa K dimenzija na prostor od dve dimenzije tj. ravan.

Prva PLS komponenta predstavlja pravu u X prostoru i pravu u Y prostoru koje dobro opisuju podatke u X i Y prostoru i omogućavaju korelaciju između podataka u njima. Projektovanjem podataka na PLS komponente (*Latent Variable*, LV) dobijaju se latentne promenljive tzv. rezultati (engl. *scores*) t_1 i u_1 . Obično jedna PLS komponenta nije

dovoljna za modelovanje variranja u Y podacima. Uključivanjem druge PLS komponente odstupanje se smanjuje. Druga PLS komponenta takođe predstavlja prave u X i Y prostoru, koje omogućavaju bolju korelaciju između podataka. Druga prava u X prostoru leži normalno u odnosu na prvu. PLS model sa dve komponente se geometrijski predstavlja kao ravan u X i Y prostoru. Projektovanjem podataka na ovu ravan dobijaju se rezultati t_1 i t_2 za X prostor i u_1 i u_2 za Y prostor. Vektori rezultata se mogu povezati sledećom jednačinom:

$$U = T + H \quad (19.)$$

gde je H rezidua, odnosno odstupanje.

Za PLS model sa dve komponente moguće je formirati četiri grafička prikaza rezultata t_1/t_2 , t_1/u_1 , t_2/u_2 , u_1/u_2 . Grafički prikaz rezultata t_1/t_2 omogućava otkrivanje odstupanja (engl. *outliers*) u X podacima, dok grafički prikaz rezultata u_1/u_2 otkriva odstupanja u Y podacima. Takođe, grafički prikaz t_1/u_1 i t_2/u_2 omogućava otkrivanje podataka koji odstupaju od prethodno utvrđene korelacije u odnosu između X i Y. Drugi par vektora rezultata (t_2/u_2) pokazuje manji stepen korelacije u odnosu na prvi par (t_1/u_1).

PLS model može sadržati više od dve komponente i tada se podaci iz X i Y prostora projektuju na hiper-ravni od tri, četiri, pet i više dimenzija, uz poštovanje istih principa.

Tumačenje PLS modela postiže se analizom parametara PLS modela. Opterećenja X i Y promenljivih, w^* i c , pružaju informacije o načinu na koji se promenljive kombinuju kako bi se ostvarila kvantitativna veza između X i Y. To znači da su opterećenja ključna za prepoznavanje i razumevanje važnih X promenljivih koje doprinose PLS modelu (veće numeričke vrednosti w^*), X promenljivih koje su međusobno povezane i daju sličnu informaciju (sličan profil w^* vrednosti), kao i interpretaciju rezultata, tj. t vrednosti. PLS opterećenja pokazuju odnose između svih promenljivih u isto vreme. Za dati PLS model, za svaku komponentu (a) dobija se jedan vektor X opterećenja, w_a^* i jedan vektor Y opterećenja, c_a . Grafički je moguće prikazati samo X opterećenja (w^*), samo Y opterećenja (c) ili X i Y opterećenja zajedno (w^*c).

Za pregled i tumačenje PLS modela koriste se i PLS regresioni koeficijenti. Njihova upotreba pojednostavljuje tumačenje modela naročito u situacijama kada model ima više komponenta. Na grafičkom prikazu koeficijenata PLS modela veličina i znak

koeficijenta koji je u vezi sa standardizovanom i centriranom promenljivom pokazuje njen uticaj. Takođe, statistički značaj svakog koeficijenta prikazuje se kao 95% interval pouzdanosti. Broj setova regresionih koeficijenata odgovara broju zavisno promenljivih u Y matrici. Za odgovore koji su u međusobnoj korelaciji dobijaju se slične vrednosti koeficijenata. Sa druge strane, vrednosti koeficijenata za odgovore koji nisu u korelaciji značajno se razlikuju.

Tumačenje složenih PLS modela koji se sastoji iz velikog broja varijabli predstavlja veoma kompleksan zadatak. Iz tog razloga je Wold 1993. godine uveo parametar pod nazivom uticaj promenljive na projekciju (engl. *Variable Influence on Projection*, VIP), koji sumira značaj X promenljivih na X i Y modele. Parametri sa velikim VIP vrednostima, većim od 1, najviše utiču na dati model, pa se ove vrednosti mogu koristiti za odabir značajnih promenljivih. U PLS analizi uobičajeno je da se studija VIP vrednosti poveže sa pregledom opterećenja ili koeficijenata.

Deo podataka koji se ne može objasniti modelom, tzv. rezidue se može koristiti za procenu kvaliteta formiranog modela. Vrednosti DModX ili DModY (engl. *Distance to the Model in X/Y-space*) pokazuju udaljenost svakog eksperimenata od modela u X i Y prostoru i predstavljaju zbir elemenata matrica odstupanja E i F po redovima tj. odgovaraju odstupanjima standardne devijacije u redu. Iz tog razloga se grafički prikaz vrednosti DModX i DModY može koristiti za otkrivanje umerenih odstupanja od modela. Na osnovu vrednosti DModX mogu se identifikovati eksperimenti koji odstupaju u X prostoru, tj. eksperimenti koji nisu u skladu sa modelom. Takođe, DModY vrednosti ukazuju na činjenicu da je model loš, a identifikacija eksperimenata koji odstupaju može se izvršiti na osnovu grafičkog prikaza.

Ukoliko se međutim elementi matrica odstupanja sabiraju po kolonama, za X odstupanja u matrici E dobija se vrednost R^2VX (ili samo R^2), a za Y odstupanja u matrici F vrednost R^2VY . R^2VX predstavlja varijaciju koja se može objasniti promenljivom (engl. *explained variation*). Ona može imati vrednosti od 0 do 1 i pokazuje koliko su dobro nezavisno promenljive objašnjene modelom. R^2VY pokazuje koji su odgovori dobro izračunati primenom modela.

Validan, odnosno dovoljno pouzdan model se može koristiti za predviđanje zavisno promenljive Y, na osnovu formirane PLS regresione funkcije.

Validacija modela podrazumeva nekoliko koraka i to: internu validaciju tzv. ukrštenu validaciju (engl. *Cross Validation, CV*), test permutacije odgovora i eksternu validaciju. Ona predstavlja jedini način za pouzdanu procenu pouzdanosti formiranog modela za predviđanje ispitivanog odgovora sistema.

Tehnika ukrštene validacije se primenjuje za testiranje značajnosti latentnih promenljivih tj. određivanje optimalnog broja komponenata PLS modela kao i za sveukupnu procenu kvaliteta i pouzdanosti formiranog modela. Ona podrazumeva podelu podataka na set za kalibraciju (engl. *training set*) i set za testiranje (engl. *test set*), a jedna od metoda koja se u te svrhe koristi je metoda izostavi jedan podatak (engl. *Leave One Out Cross-Validation, LOO-CV*). Izvodi se tako što se po jedan podatak izostavi iz trening seta i zatim se sa redukovanim brojem podataka razvija nov paralelan model. Nakon razvoja novog PLS modela izostavljeni podatak se koristi za testiranje tačnosti predviđanja formiranog PLS modela i zatim se izračunava odstupanje između originalnog i predviđenog odgovora sistema. Ceo proces se ponavlja sve dok svaki podatak ne bude isključen iz trening seta. Na osnovu dobijenih odstupanja se računa parametar ukrštene validacije (Q^2).

U kontekstu PLS modelovanja kvadrat koeficijenta korelacije, R^2 i kvadrat koeficijenta korelacije za ukrštenu validaciju, Q^2 odnose se pre svega na karakteristike modela koji formiraju Y podaci, odnosno odgovori sistema. Vrednosti R^2 i Q^2 pojedinačnih odgovora sistema ukazuju na odgovore koji su dobro modelovani ($Q^2 > 0,5$ dobar model i $Q^2 > 0,9$ odličan model) i one koji to nisu. Mera sposobnosti predviđanja modela označava se kao PRESS (engl. *Predictive Residual Sum of Squares*) i predstavlja zbir kvadrata razlika originalnih i predviđenih vrednosti za sve paralelene modele. Vrednosti R^2 i Q^2 definisane su jednačinama:

$$R^2 = 1 - \frac{SSY_{\text{resid}}}{SSY_{\text{total}}} \quad (20.)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{SSY_{\text{total}}} \quad (21.)$$

gde je SSY_{total} ukupna varijacija u Y matrici nakon normalizacije i centriranja.

Da bi se dobile dovoljno visoke korelacije između originalnih i predviđenih vrednosti potrebno je da SSY ima što nižu vrednost. U idealnom slučaju $SSY = 0$ i $R^2 = 1$. Takođe, niže PRESS vrednosti ukazuju na modele koji imaju dobru sposobnost predviđanja [65].

Za definisanje kvaliteta PLS modela koriste se i greška predviđanja trening seta (engl. *Root Mean Square Error of Estimation*, RMSEE) i greška predviđanja test seta (engl. *Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP) [87]. RMSEE pokazuje grešku predviđanja za model kod koga je isti set podataka korišćen za kalibraciju i proveru sposobnosti predviđanja. Sa druge strane, RMSEP vrednost predstavlja grešku predviđanja za model kod koga je jedan set podataka korišćen za kalibraciju, a drugi, nezavisan set podataka za procenu sposobnosti predviđanja. Na osnovu RMSEP vrednosti se može odrediti broj komponenta PLS modela koji daje najmanju varijansu tj. grešku predviđanja. Ova vrednost se u literaturi najčešće koristi za procenu sposobnosti predviđanja nekog PLS modela, s obzirom da ima iste jedinice kao odgovor sistema [84, 87]. Izračunava se prema sledećoj jednačini:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (22.)$$

gde je y_i originalna vrednost y za eksperiment i , \hat{y}_i je y vrednost eksperimenta i predviđena modelom, a n broj eksperimenata za koje je dobijena \hat{y} .

Jedno od ograničenja tehnike ukrštene validacije je da ona samo daje procenu sposobnosti modela da predviđa, ali ne daje podatak o statističkoj značajnosti predviđanja. Iz tog razloga se u narednom koraku izvodi test permutacije odgovora (engl. *Response Permutation Test*). U okviru ovog testa X podaci se ne menjaju, dok se Y podaci nasumično permutuju. Nakon toga se za takve Y podatke kreira PLS model i primenom ukrštene validacije izračunavaju R^2 i Q^2 parametri. U sledećem koraku se formira nov PLS model sa drugom permutovanom verzijom Y podataka i dobijaju nove vrednosti za R^2 i Q^2 . Navedena procedura se ponavlja 25-100 puta i na taj način formira serija PLS modela sa odgovarajućom raspodelom R^2 i Q^2 . Ova raspodela se zatim koristi za izračunavanje statističke značajnosti osnovnog PLS modela. Dodatno, s obzirom da „permutovane” R^2 i Q^2 vrednosti zavise od stepena permutacije potrebno je pratiti i vrednosti koeficijenta korelacije između Y promenljivih u originalnom i novim PLS modelima. Rezultati testa permutacije odgovora mogu se sumirati tako što se grafički prikaže odnos R^2/Q^2 svih PLS modela u funkciji koeficijenata korelacije permutovanih i originalnih Y promenljivih, a nakon toga izvrši regresiona analiza za dva seta podataka,

jedna za tačke koje prikazuju R^2 i druga za tačke koje prikazuju Q^2 . Odsecci dobijenih regresionih linija predstavljaju meru osnovnih (engl. *background*) R^2 i Q^2 parametara i za dobar model bi trebalo da imaju vrednosti manje od 0,3-0,4 za R^2 i manje od 0,05 za Q^2 [65].

Ukrštena validacija kao i test permutacije odgovora predstavljaju prvu procenu sposobnosti predviđanja PLS modela. Međutim, mnogo zahtevniji način za ispitivanje sposobnosti predviđanja datog PLS modela predstavlja predviđanje odgovora za nezavisan set podataka tj. seriju eksperimenata koja nije korišćena za kreiranje modela. Uslov za to je da set za kalibraciju i testiranje budu reprezentativni za sve očekivane varijacije u X podacima tokom normalnog funkcioniranja sistema koji se ispituje, kao i da obuhvataju pun opseg odgovora sistema.

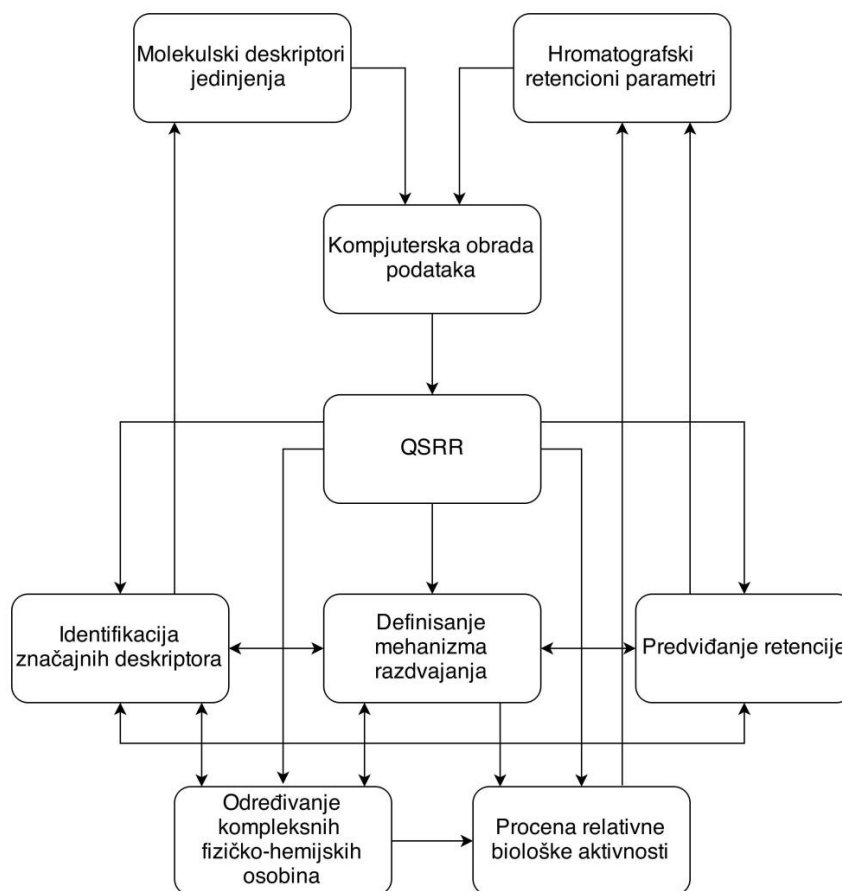
Kada je PLS model pouzdan, što se utvrđuje na osnovu tumačenja parametara modela, dijagnostičkih alata i primenom CV tehnike, itd., takav model se može koristiti za predviđanje Y podataka novih eksperimenata (jedinjenja) koji nisu uticali na kreiranje modela.

1.3.4. Studija kvantitativnog odnosa strukture i retencije

Uspostavljanje kvantitativnog odnosa između strukture molekula i njihove retencije (engl. *Quantitative Structure Retention Relationship*, QSRR) predstavlja veoma korisnu metodu u hromatografskim ispitivanjima. Osnovni cilj QSRR istraživanja je da se na osnovu strukture molekula predvide njihovi retencioni parametri, kao i da se na osnovu retencionih podataka predvide određena fizička svojstva molekula [88]. QSRR studijom se uspostavlja matematička zavisnost nekoliko nezavisno promenljivih tj. deskriptora (X) sa najčešće jednom zavisno promenljivom tj. odgovorom hromatografskog sistema (Y) [89].

Dobijeni set podataka se koristi za formiranje odgovarajuće matematičke funkcije i QSRR modela. QSRR modeli mogu poslužiti za predviđanje retencionih podataka novih jedinjenja na osnovu njihovih strukturnih deskriptora. Takođe, mogu se uspešno koristiti za identifikaciju najznačajnijih strukturnih deskriptora, objašnjavanje retencionog mehanizma, za optimizaciju odvajanja smeša složenog sastava, za određivanje kompleksnih fizičko-hemijskih osobina ili za procenu relativne biološke aktivnosti [90].

Šematski prikaz veze između ulaznih podataka za građenje QSRR modela i karakteristika molekula dat je na Slici 9 [91].



Slika 9. Metodologija i ciljevi QSRR studija

Da bi se dobili relevantni QSRR modeli neophodno je da ulazni set podataka bude pouzdan, a preporučljivo je i da ispitivana jedinjenja pripadaju homolognoj seriji, jer se u tom slučaju mogu očekivati dobre korelacije između retencije i deskriptora koji opisuju ispitivane strukture [88]. Pored relevantnog ulaznog seta podataka, za formiranje statistički značajnih QSRR modela neophodno je odabrati pogodne matematičke metode. Različite matematičke metode su uspješno primjenjivane u formiranju QSRR modela, kao što su na primer: višestruka linearna regresija (MLR), metoda delimičnih najmanjih kvadrata (PLS), analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) i dr.

Validacija modela je izuzetno važna u svakoj QSRR studiji. Za definisanje kvaliteta QSRR modela koriste se različiti statistički parametri: kvadrat koeficijenta korelacije R^2 , koji predstavlja meru odstupanja koja mogu biti objašnjena regresionom pravom, F-test i

standardna greška (engl. *standard error*, SE). Dodatno, za procenu kvaliteta modela u smislu njegove sposobnosti predviđanja koriste se različite metode validacije. Složenost modela se obično proverava tehnikom ukrštene validacije (CV) primenom metode izostavljanja jednog uzorka (LOO-CV) [92]. Ceo postupak se ponavlja sve dok svaki uzorak ne bude isključen iz razmatranja. Statistički parametri koji definišu ukrštenu validaciju su: kvadrat koeficijenta korelacije za ukrštenu validaciju (Q^2), koren srednjeg kvadratnog odstupanja za predviđanje (RMSEP), kao i suma kvadrata odstupanja od predviđenih vrednosti (PRESS). Visoke vrednosti R^2 pokazuju da model dobro opisuje postojeće podatke, a visoke vrednosti F-testa da je model statistički značajan [93]. Standardna devijacija opisuje variranja odstupanja, odnosno variranja oko regresione prave i trebalo bi da ima malu vrednost kako bi regresija bila značajna. Vrednost parametra Q^2 pruža informacije o tačnosti predviđanja QSRR modela, odnosno visoke vrednosti ($Q^2 > 0,5$) ukazuju na dobru moć predviđanja. Takođe, prisustvo manje značajnih deskriptora u QSRR modelu utiče na opadanje Q^2 vrednosti, što nije slučaj sa R^2 parametrom. [94].

1.3.4.1. Molekulski deskriptori kao svojstva strukture molekula

QSRR istraživanja se zasnivaju na pretpostavci prema kojoj fizičko-hemijska svojstva molekula zavise od podataka zapisanih u njihovoj strukturi, te da postoji mogućnost da se ta svojstva predstave jednim ili većim brojem izračunatih deskriptora. Iz tog razloga je danas veliki broj istraživanja usmeren na pronalaženje načina za čitanje informacija sadržanih u strukturi tj. njihovo prevođenje u numeričke vrednosti na osnovu kojih se može definisati veza između strukture i eksperimentalno određenih svojstava (na primer predvideti retencija molekula u HPLC sistemu). Proces formiranja QSRR modela započinje odabirom molekulskih deskriptora koji na odgovarajući način predstavljaju strukturu molekula, a završava se predviđanjem ponašanja molekula u fizičko-hemijskim sistemima. [95, 96].

Da bi molekulski deskriptor mogao da se koristi u QSRR istraživanjima, potrebno je da tumači strukturu, pokazuje dobru korelaciju sa najmanje jednim svojstvom molekula, ukoliko je moguće da pravi razliku među izomerima, da je primenljiv na delove strukture, da je nezavisan i jednostavan, da može da se primenjuje na strukturno slične molekule i da se postepeno menja sa postepenim promenama u strukturi [96].

Molekulski deskriptori mogu biti eksperimentalno određeni (fizičko-hemijska svojstva) ili teorijski izračunati, pomoću matematičkih formula ili primenom kompjuterskih metoda. Prednost fizičko-hemijskih deskriptora je činjenica da su u većini slučajeva oni u direktnoj vezi sa retencijom ili nekim drugim fizičko-hemijskim svojstvima. Međutim, ovi deskriptori često nisu dostupni ili su dostupne vrednosti koje podrazumevaju veliku grešku. U odnosu na eksperimentalno određene deskriptore, najveća prednost teorijskih deskriptora se najčešće, mada ne uvek, ogleda u pogledu troškova, vremena i dostupnosti [96].

Prikaz molekula je način na koji je molekul simbolički predstavljen, shodno odgovarajućoj proceduri i opšteprihvaćenim pravilima. Obim hemijske informacije koja se prenosi na simbolički prikaz molekula zavisi od načina na koji je on predstavljen. U zavisnosti od vrste algoritma primenjenog za izračunavanje deskriptora, razlikuju se 0D-, 1D-, 2D-, 3D- i 4D- molekulski deskriptori [96].

Najjednostavniji prikaz molekula je hemijska formula (molekulska formula), koja sadrži samo informacije o vrsti i broju atoma u strukturi molekula. Ovakav prikaz molekula ne sadrži informacije o molekulskoj strukturi, pa se deskriptori dobijeni iz hemijskih formula mogu smatrati bezdimenzionalnim deskriptorima (0D molekulski deskriptori).

Jednodimenzionalni prikaz molekula obuhvata prikaz podstruktura molekula kao što su informacije o broju fragmenata, funkcionalnih grupa i supstituenata od interesa za molekul. Deskriptori izvedeni iz jednodimenzionalnog prikaza molekula, nazivaju se jednodimenzionalni (1D molekulski deskriptori). 0D i 1D deskriptori se mogu lako izračunati i protumačiti, ne zahtevaju optimizaciju molekulske strukture i ne zavise od konformacionih problema. Glavni nedostatak ovih deskriptora je što mnogi molekuli imaju iste vrednosti ovih deskriptora. Međutim, iako je obim informacija koju ovi deskriptori nose mali, oni ipak mogu imati važnu ulogu u modelovanju nekih fizičko-hemijskih svojstava ili mogu biti uključeni u složenije modele.

Dvodimenzionalni prikaz molekula obuhvata informacije o načinu povezivanja atoma u molekulu, tačnije informacije o prisustvu i prirodi hemijskih veza između atoma, nezavisno od drugih parametara kao što su ravnotežne udaljenosti između atoma, uglovi između veza i uvijanje ugla veze. Deskriptori dobijeni na ovaj način nazivaju se topološki ili dvodimenzionalni deskriptori (2D molekulski deskriptori).

Trodimenzionalni prikaz molekula posmatra molekul kao rigidni geometrijski objekat u prostoru i predstavlja prikaz ukupne prostorne konfiguracije atoma u molekulu. Ovakav

prikaz molekula naziva se geometrijski prikaz i definiše molekul preko vrste atoma koji su zastupljeni i njihovih prostornih (x, y, z) koordinata. Molekulski deskriptori koji se dobijaju iz ovog prikaza nazivaju se 3D molekulski deskriptori ili geometrijski deskriptori. Neki od njih su predloženi kao mera veličine i sternih svojstava molekula.

Stereoelektronski prikaz molekula je opis molekula koji se odnosi na njegova svojstva koja proizilaze iz elektronske raspodele i interakcije polja tog molekula sa atomima ili atomskim grupama iz njegovog okruženja. Deskriptori na ovom nivou mogu se smatrati 4D molekulskim deskriptorima.

Molekulske deskriptore je moguće klasifikovati na različite načine, pa se u zavisnosti od toga kakvu informaciju nose, teoretski molekulski deskriptori mogu podeliti na konstitucione, topološke, geometrijske, elektrostatičke, kvantno-hemijske, termodinamičke i solvatacione deskriptore [92]. U Tabeli 1 navedeni su molekulski deskriptori koji se najčešće koriste u QSRR istraživanjima, a podela je izvršena na osnovu njihove veze sa određenim karakteristikama molekula. Deskriptori povezani sa veličinom molekula (na pr. molekulska masa, polarizabilnost, molarna refraktivnost) se često koriste u QSRR istraživanjima. Empirijski fizičko-hemijski deskriptori (na pr. oktanol-voda particioni koeficijent, logP) su značajni za određivanje mehanizma retencije u HPLC sistemu. Deskriptori povezani sa polarnošću (na pr. dipolni moment, energija HOMO i LUMO orbitala) takođe značajno utiču na retenciju u hromatografskom sistemu. Sa druge strane, deskriptori koji se odnose na geometriju molekula i njegov oblik mogu postati značajni u situacijama kada se analizira retencija grupe molekula slične veličine i polarnosti. Indikator promenljive se dodeljuju na osnovu prisustva ili odsustva nekog strukturnog svojstva [97].

Jedan od problema u vezi sa kreiranjem QSRR modela odnosi se na odabir relevantnih molekulskih deskriptora iz velikog broja deskriptora koji se mogu izračunati tj. na njihovu klasifikaciju. U ove svrhe se primenjuju različite statističke metode koje se dele na metode za klasifikaciju i regresione metode.

Tabela 1. Strukturni deskriptori koji se koriste u QSRR

Deskriptori koji definišu veličinu molekula	Broj ugljenikovih atoma Molekulska masa Refraktivnost Polarizabilnost Van der Waals-ova zapremina i površina Zapremina i površina molekula dostupna rastvaraču Ukupna energija
Deskriptori koji definišu geometriju molekula	Odnos dužine i širine molekula Moment inercije
Fizičko-hemijski, empirijski i semiempirijski parametri	Hammett-ove konstante Hansch-ove konstante Taft-ove sterne konstante Parametri rastvorljivosti Parametri linearnog odnosa energije solvatacije Particioni koeficijenti (log P) Temperatura ključanja pKa vrednosti
Deskriptori koji definišu polarnost molekula	Dipolni momenat Naelektrisanja atoma ili fragmenata elektrona HOMO i LUMO energije orbitala Delimično naelektrisani regioni Lokalni dipolni pomenat Parametri submolekulske polarnosti
Deskriptori koji definišu topologiju molekula	Indeksi molekulske konektivnosti Kappa indeksi Indeksi informativnog sadržaja Topološki elektronski indeks
Indikator promenljive	Indikatori nula-jedan
Ad-hoc deskriptori	

1.3.5. Literaturni podaci

Podaci iz literature pokazuju da se različiti tipovi eksperimentalnog dizajna primenjuju u različitim fazama eksperimenta, npr. u optimizaciji metode i proceni njene robusnosti. Za preliminarno ispitivanje hromatografskog ponašanja smeša aktivnih supstanci, kao i smeša aktivnih supstanci i njihovih nečistoća, u farmaceutskim preparatima ili biološkom materijalu primenjeni su pun faktorski dizajn (engl. *Full Factorial Design*) [98-103] ili frakcioni faktorski dizajn (engl. *Fractional Factorial Design*) [103, 104]. Dodatno, pun faktorski dizajn je primenjen i na optimizaciju HPLC uslova za razdvajanje API i njenih nečistoća, u slučaju ispitivanja uticaja malog broja faktora [105], a frakcioni faktorski

dizajn za procenu robusnosti metode [106]. Sa druge strane, centralni kompozitni dizajn (engl. *Central Composite Design*, CCD) je uglavnom korišćen za definisanje retencionog ponašanja [98], optimizaciju HPLC uslova [102, 107, 108] kao i procenu robusnosti metode [100, 101, 109]. Tokom razvoja i optimizacije HPLC metode za analizu flukonazola i njegovih nečistoća je pokazano da centralni kompozitni dizajn i pun faktorski dizajn na tri nivoa daju značajno bolje modele u odnosu na pun faktorski dizajn na dva nivoa i Box-Behnken dizajn. Za potrebe teoretskog istraživanja eksperimentalnog prostora prednost je data modelima CCD dizajna jer su u odnosu na pun faktorski dizajn na tri nivoa podrazumevali izvođenje manjeg broja eksperimenata [103].

U okviru QSRR istraživanja koriste se retencionni podaci iz gasne hromatografije [110], tankoslojne hromatografije [94] ili visoko-efikasne tečne hromatografije. Podaci iz literature pokazuju da se na osnovu definisane veze sa retencijom mogu predvideti različita svojstva jedinjenja: particioni koeficijent ($\log P$) [111, 112], tačka ključanja [113], napon pare [114], hiralna selektivnost [115] itd.

Publikovane su i QSRR studije za modelovanje retencionog ponašanja smeša aktivnih supstanci ili smeša aktivnih supstanci i njihovih nečistoća u HPLC sistemu [116-122]. Za formiranje statistički značajnih modela u QSRR studijama su primenjene različite statističke tehnike. Višestruka linearna regresija je jedna od najčešće korišćenih metoda, koja je u slučaju velikog broja deskriptora kombinovana sa prethodnom selekcijom promenljivih (npr. genetski algoritam) [116-119]. Osim toga, u QSRR istraživanjima su korišćene i analiza glavnih komponenata, regresiona analiza metodom delimičnih najmanjih kvadrata i veštačke neuronske mreže [118, 120-122]. Za dobijanje informacija o sposobnosti predviđanja modela korišćene su različite tehnike validacije, kao što su tehnika ukrštene validacije ili eksterna validacija [117-119, 121].

1.4. Ispitivane supstance i njihove nečistoće

Piperazinski prsten je prisutan u hemijskoj strukturi više od dve stotine aktivnih supstanci koje pokazuju različito farmakološko dejstvo [123]. Klozapin je prvi atipičan antipsihotik koji takođe u svojoj strukturi sadrži piperazinski prsten. Veoma je efikasan, ali kod određenog broja pacijenata dovodi do agranulocitoze koja može biti smrtonosna. Iz tog razloga su veliki naponi uloženi da se sintetišu novi atipični antipsihotici sa istom kliničkom efikasnošću, koja neće biti praćena toksičnim efektima. Olanzapin i aripiprazol pripadaju ovoj grupi lekova. Takođe, obe supstance u svojoj strukturi sadrže piperazinski prsten [124].

1.4.1. Olanzapin

1.4.1.1. Farmakološke osobine olanzapina

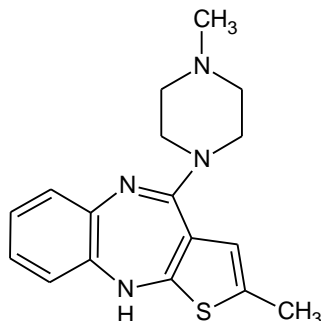
Olanzapin je atipični antipsihotik ili antipsihotik novije generacije. Tačan mehanizam njegovog dejstva nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da svoje delovanje ostvaruje primarno blokadom serotoninskih, 5-HT_{2A} i u nešto manjoj meri dopaminskih, D₂-receptora. Osim toga, olanzapin je antagonist i dopaminskih, D₁ i α_1 -adrenergičkih i histaminskih, H₁ receptora, što takođe doprinosi njegovim terapijskim, ali i neželjenim efektima [125, 126].

Primenjuje se u terapiji shizofrenije, shizoafektivnih poremećaja, manične i depresivne faze bipolarnih afektivnih poremećaja. U slučaju psihotičnih poremećaja, kao što je shizofrenija, olanzapin se koristi kao simptomatska terapija. U terapiji akutnih mešanih ili maničnih faza bipolarnih afektivnih poremećaja primenjuje se sam ili zajedno sa litijumom, odnosno natrijum valproatom. Samostalno se primenjuje i u dugotrajnoj terapiji održavanja kod pacijenata sa ovim poremećajem. Takođe, u terapiji depresivnih faza bipolarnih afektivnih poremećaja se koristi zajedno sa fluoksetinom [125, 126].

Primenjuje se oralno u obliku tableta ili orodisperzibilnih tableta. U slučajevima kada je potrebna brza kontrola akutne agitacije i poremećaja ponašanja kod pacijenata sa shizofrenijom ili bipolarnom manijom, primenjuje se intramuskularno u obliku praška za rastvor za injekciju.

1.4.1.2. Fizičko-hemijske osobine olanzapina

Strukturna formula:



2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10*H*-tieno [2, 3-*b*] [1, 5] benzodiazepin

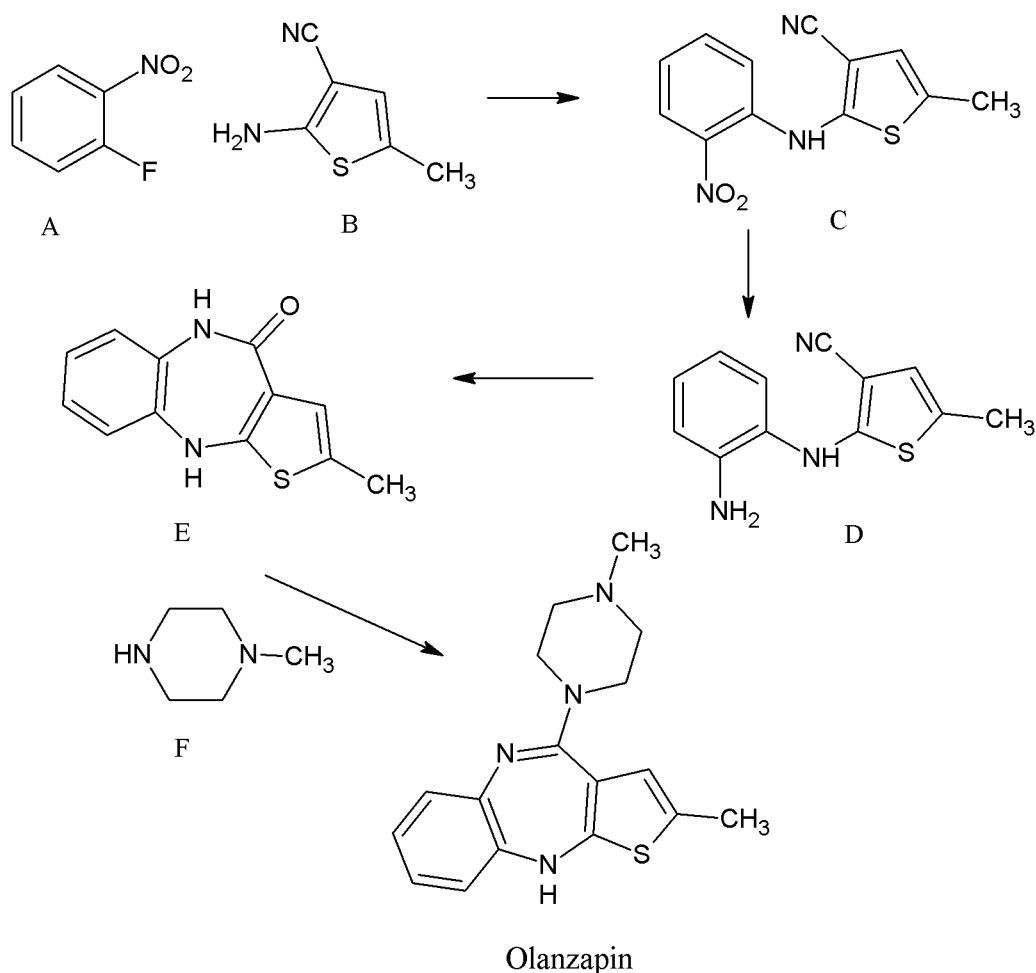
Olanzapin je kristalan prašak bledo žute do žute boje, blago higroskopan, lako rastvorljiv u hloroformu i metilen-hloridu, dosta teško rastvorljiv u sirćetnoj kiselini, teško rastvorljiv u etanolu (96%) i gotovo nerastvorljiv u vodi.

Hemijska struktura olanzapina se može dokazati snimanjem njegovih spektara različitim tehnikama, kao što su infracrvena apsorpciona spektroskopija (IR), ultraljubičasta apsorpciona spektrofotometrija (UV) i masena spektroskopija (MS). IR spektar olanzapina snimljen tehnikom KBr-diska pokazuje apsorpcione trake koje potiču od karakterističnih funkcionalnih grupa N–H, C–H, C=N, C=C, C-N, =C-H, C-S, a UV spektar u 0,1M HCl daje karakteristične apsorpcione maksimume na 201 i 259 nm. Maseni spekar olanzapina pokazuje karakterističan molekularni jon (m/z 313 $[M+H]^+$) i glavni fragment jon (m/z 256).

Olanzapin pokazuje polimorfizam i može kristalirati u velikom broju polimorfnih oblika. Polimorfni oblici pokazuju različitu rastvorljivost i stabilnost.

1.4.1.3. Sinteza i potencijalne nečistoće olanzapina

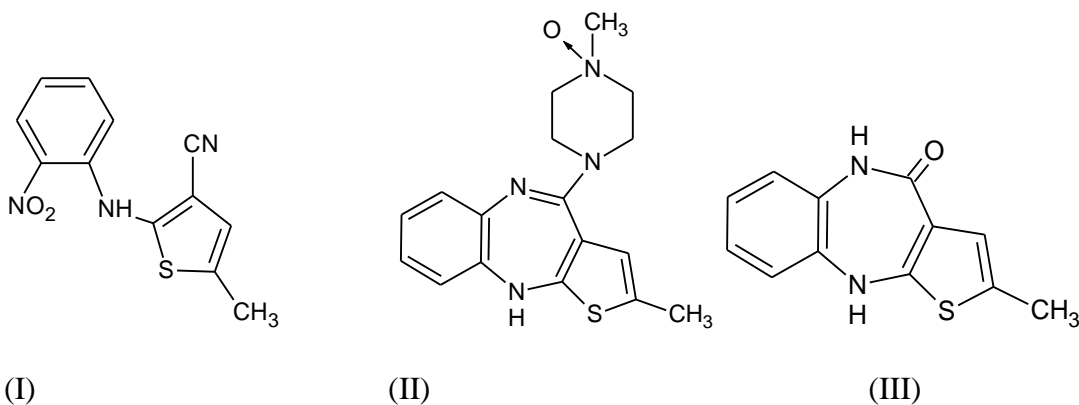
Sinteza olanzapina se odvija nizom hemijskih reakcija počevši od halogenonitrobenzena na primer 2-fluoronitrobenzena (A) i tiofen amino estra ili karbonitrila, na primer 2-amino-5-metiltiofen-3-karbonitrila (B). U ovoj reakciji nastaje nitroanilintiofen (C), jedinjenje koje se katalitičkom hidrogenacijom redukuje do orto-fenilendiamino analoga (D). Ciklizacijom korišćenjem natrijum hidrida (NaH) u dimetil sulfoksidu (DMSO) nastaje intermedijer tj. laktam (E) koji kondenzacijom sa 1-metilpiperazinom (F) daje olanzapin. Sinteza olanzapina je prikazana na Slici 10 [127].



Slika 10. Šema sinteze olanzapina

Nečistoće olanzapina se mogu podeliti na one koje potiču iz procesa sinteze i one koje predstavljaju degradacione proizvode aktivne supstance. Dalje, nečistoće iz procesa

sinteze se mogu podeliti u polazne materijale, međuproizvode i neželjene proizvode reakcije.



(I) Nečistoća I (EP A/USP A)

2-(2-nitroanilino)-5-metil-tiofen-3-karbonitril

Ova nečistoća predstavlja polazni materijal tokom procesa sinteze aktivne supstance.

(II) Nečistoća II (EP D/USP C)

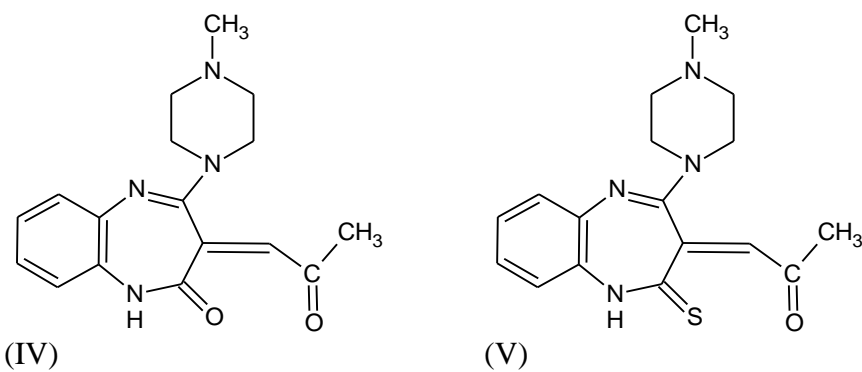
2-metil-4-(4-metil-4-oksipiperazin-1-il)-10H-tieno [2,3-*b*][1,5] benzodiazepin

Ova nečistoća potiče iz sinteze (međuproizvod) i predstavlja proizvod oksidacije aktivne supstance.

(III) Nečistoća III (EP B/USP B)

2-metil-5,10-dihidro-4H-tieno[2,3-*b*][1,5] benzodiazepin-4-on (III)

Ova nečistoća je proizvod oksidacije aktivne supstance.



(IV) Nečistoća IV (Olanzapin laktam, USP)

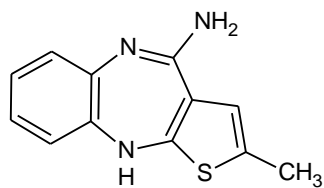
4-(4-metilpiperazin-1-il)-3-oksopropiliden)-1H-benzo[b][1,4] diazepin-2(3H)-on

Ova nečistoća je proizvod oksidacije olanzapina u tabletama [128].

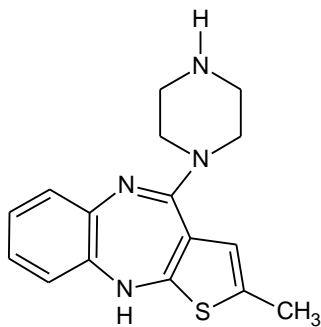
(V) Nečistoća V (Olanzapin tiolaktam, USP)

1-4-(4-metilpiperazin-1-il)-2-tio-1H-benzo[b][1,4] diazepin-3(2H)iliden]propan-2-on

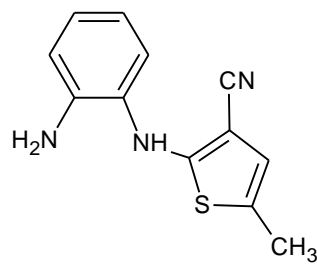
Ova nečistoća je proizvod oksidacije olanzapina u tabletama [128].



(VI)



(VII)



(VIII)

(VI) Nečistoća VI (Amino nečistoća)

4-amino-2-metil-10H-tieno[2,3-b][1,5] benzodiazepin

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (međuproizvod) [129].

(VII) Nečistoća VII (Demetil olanzapin)

2-metil-4-(1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b][1,5] benzodiazepine

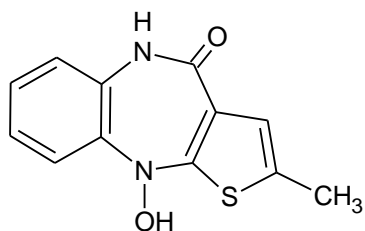
Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (neželjeni proizvod reakcije).

(VIII) Nečistoća VIII (Fenilendiamino karbonitril nečistoća)

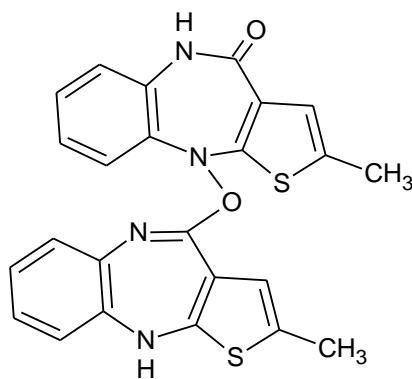
2-(1,2-fenilendiamino)-5-metil-tiofen-3-karbonitril

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (neželjeni proizvod reakcije)

[130].



(IX)



(X)

(IX) Nečistoća IX (Ketoosim nečistoća)

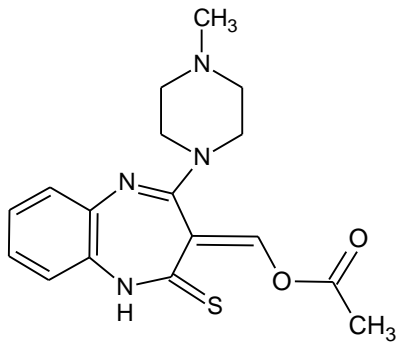
10-hidroksi-2-metil-5,10-dihidro-4H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4] diazepin-4-on

Ova nečistoća je proizvod oksidacije aktivne supstance.

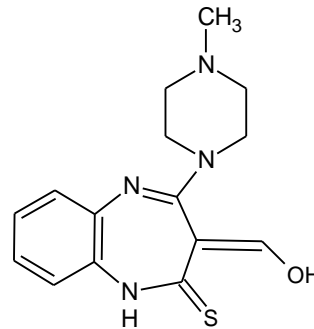
(X) Nečistoća X (Dimer nečistoća)

2-metil-10-(2-metil-10H-benzo[b]tieno[2,3-e][1,4] diazepin-4-iloksi)5,10-dihidro-4H-benzo[b]tieno[2,3-e] diazepin-4-en

Ova nečistoća je proizvod oksidacije aktivne supstance [131].



(XI)



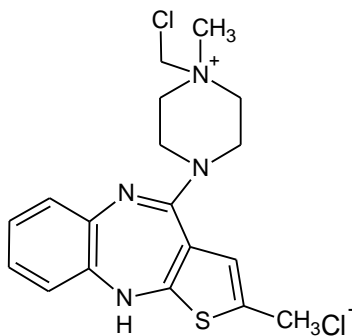
(XII)

(XI) Nečistoća XI (Acetoksimetiliden tion nečistoća)

(Z)-4-(4-metil-1-piperazinil)-3-acetoksimetiliden-1H-benzo[b][1,4]diazapin-2(3H)-tion
Ova nečistoća je proizvod oksidacije aktivne supstance [132].

(XII) Nečistoća XII (Hidroksimetiliden tion nečistoća)

4-(4-metil-1-piperazinil)-3-hidroksimetiliden-1H-benzo[b][1,4]diazepine-2(3H)-tion
Ova nečistoća je proizvod oksidacije aktivne supstance [132].



(XIII)

(XIII) Nečistoća XIII (EP C)

1-(hlorometil)-1-metil-4-(2-metil-10H-tieno [2,3-*b*][1,5] benzodiazepin-4-il)-
piperazin-1-ium hlorid

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (neželjeni proizvod reakcije).

Olanzapin je oficinalan po Evropskoj farmakopeji (European Pharmacopoeia 7.3) i
Američkoj farmakopeji (USP 36 NF 31) [133, 134].

1.4.1.4. Metode za analizu olanzapina

U dostupnoj naučnoj literaturi publikovani su novi putevi sinteze olanzapina, zatim
razvoj metoda za određivanje njegovog sadržaja, kao i metoda za izolaciju i

karakterizaciju njegovih degradacionih proizvoda [129,131,135,136]. Osim toga, identifikovane su i izolovane njegove procesne i degradacione nečistoće u aktivnoj supstanci i farmaceutskim formulacijama [128,130,132,137], a opisano je i termoanalitičko ispitivanje kompatibilnosti sa pomoćnim supstancama koje ulaze u sastav čvrstih doziranih oblika [138]. Struktura nečistoća olanzapina određena je primenom različitih spektroskopskih metoda: IR [128,135,136], FTIR [130,131], NMR [128,130-132,135,136], LC-MS ili LC-MS-MS [128,130-132,136] i primenom kristalografije [128,129,138]. Za analizu olanzapina i njegovih nečistoća razvijene su i validirane RP-HPLC [130] i UPLC [135] metode.

Prezentovani su novi putevi sinteze olanzapina [135,136] kako bi se obezbedio jednostavniji i jeftiniji postupak. Takođe, primenom NMR i IR spektroskopije identifikovane su i okarakterisane nečistoće koje potencijalno mogu nastati tokom tog procesa.

Za razdvajanje olanzapina i njegovih degradacionih proizvoda predložena je HPLC metoda uz korišćenje kolone Intertsil ODS 3V (150 x 4,6 mm, veličine čestica 5 µm). Mobilnu fazu čine dve komponente koje se gradijentno eluiraju. Mobilna faza A je dinatrijum hidrogen fosfat čiji je pH podešen ortofosfornom kiselinom na 7,4, a mobilna faza B je acetonitril. Protok mobilne faze je 1 ml/min, a talasna dužina detekcije 271 nm [131].

Jednostavna HPLC metoda predložena je za kvantitativnu analizu olanzapina i njegovih osam procesnih nečistoća u sirovini. Korišćena je mobilna faza sa gradijentnim eluiranjem koju čine 0,3% trietilamin u vodi čiji je pH sirćetnom kiselinom podešen na 3,73 (A) i metanol (B). Razdvajanje je izvršeno na koloni TC-C₁₈ (250 x 4,6 mm, veličine čestica 5 µm) pri protokolu mobilne faze 1ml/min [129].

Brza i osetljiva HPLC metoda postavljena je za razdvajanje i kvantitativnu analizu olanzapina i njegovih nečistoća u sirovini i farmaceutskim preparatima. Mobilnu fazu čine 0.2 M amonijum-acetat (pH = 4.50) i acetonitril koji se eluiraju gradijentno pri protoku od 1 ml/min. Talasna dužina detekcije iznosi 254 nm [130].

Jednostavna, osetljiva i reproduktivna UPLC metoda predložena je za kvantitativnu analizu olanzapina i njegovih osam nečistoća u sirovini i farmaceutskim preparatima. Razdvajanje je izvršeno na Acquity UPLC BEH C-18 kolonama uz gradijentno eluiranje u trajanju od 10 minuta. Talasna dužina detekcije iznosila je 250 nm [137].

Publikovana je i identifikacija dva degradaciona proizvoda olanzapina koja mogu nastati u čvrstim farmaceutskim oblicima oksidacijom tiofenskog prstena. Ovi degradacioni

proizvodi su izolovani preparativnom HPLC metodom iz uzoraka tretiranih na povišenoj temperaturi, a njihova karakterizacija izvršena je primenom UV, IR, MS i NMR spektroskopije i kristalografije [128]. Dodatno, opisana je identifikacija još dve nečistoće koje mogu nastati oksidacijom tiofenskog prstena olanzapina, a koje su detektovane i u sirovini i u farmaceutskim proizvodima, a predložen je i put oksidativne degradacije kojim one nastaju [132].

Termoanalitičko ponašanje olanzapina i njegovih smeša sa pomoćnim supstancama koje ulaze u sastav čvrstih farmaceutskih oblika ispitivano je primenom diferencijalno skenirajuće kalorimetrije (DSC) i termogravimetrijske analize (TGA), a uzorci su dodatno analizirani i difrakcijom x-zraka supstance u čvrstom stanju (PXRD) [138].

U Evropskoj i Američkoj farmakopeji je za određivanje nečistoća olanzapina definisana metoda sa kompleksnom mobilnom fazom i kombinacijom izokratskog i gradijentnog eluiranja. Mobilnu fazu čine acetonitril i pufer u čiji sastav ulazi natrijum-dodecilsulfat, ortofosforna kiselina, natrijum-hidroksid za korekciju pH (pH= 2,5) i voda. Ova metoda koristi C18 kolonu dimenzija 250 x 4,6 mm i veličine čestica od 5 μ m [133, 134]. Navedena metoda nije primenljiva za analizu nečistoća u olanzapin tabletama.

1.4.2. Aripiprazol

1.4.2.1. Farmakološke osobine aripiprazola

Aripiprazol je atipični antipsihotik ili antipsihotik novije generacije. Svoje delovanje ostvaruje interakcijom sa dopaminskim, D₂ i serotoninskim, 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} receptorima. Razlikuje se od ostalih atipičnih antipsihotika po tome što se ponaša kao parcijalni agonista na D₂ i 5-HT_{1A} receptorima i antagonista na 5-HT_{2A} receptorima. Blokodom drugih receptora (na primer α_1 - adrenergičkih i histaminskih H₁) doprinosi drugim terapijskim i neželjenim efektima [125,126]. Osnovna prednost primene aripiprazola sastoji se u tome što, delujući kao antagonista i agonista D₂ receptora, stabilizuje dopaminski sistem i na taj način pozitivno utiče i na terapijska i neželjena dejstva [139].

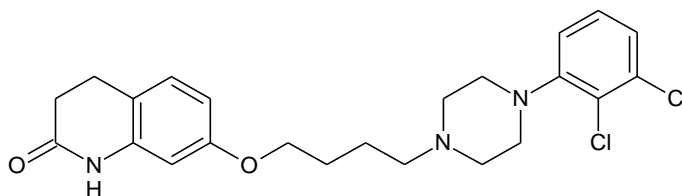
Ovaj lek se koristi u terapiji shizofrenije i manične faze bipolarnih afektivnih poremećaja.

Aripiprazol se koristi kao simptomatska terapija shizofrenije. Prema Američkom udruženju psihijatarata (American Psychiatric Association, APA) kao i olanzapin, predstavlja prvu liniju lekova u terapiji akutne faze shizofrenije, pre svega zbog smanjenog rizika od pojave neželjenih reakcija, kao što su ekstrapiramidalni sindrom i tardivna diskinezija. Sa druge strane, u terapiji mešanih ili maničnih faza bipolarnih afektivnih poremećaja primenjuje se samo u ozbiljnijim stanjima, dok se kod blažih oblika ove bolesti primenjuju litijum, valproati ili olanzapin [125].

Primenjuje se oralno u obliku tableta ili orodisperzibilnih tableta.

1.4.2.2. Fizičko-hemijske osobine aripiprazola

Strukturna formula:



(7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil) piperazin-1-il] butoksi]-3,4-dihidro-1H-hinolin-2-on)

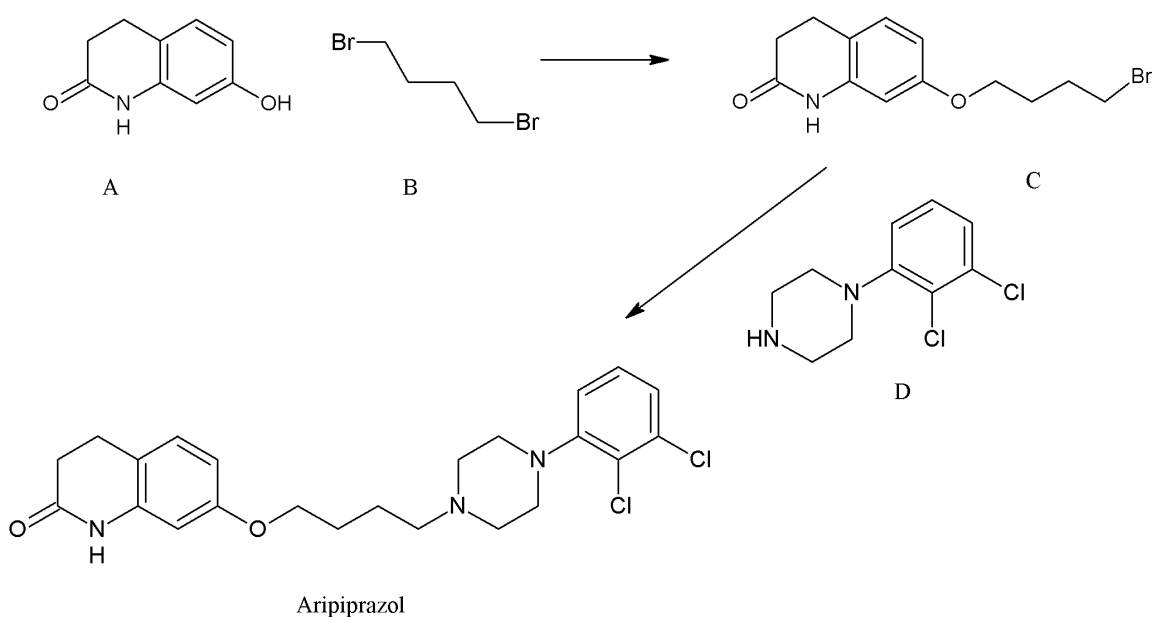
Aripiprazol je kristalan prašak bele do skoro bele boje, blago higroskopan, lako rastvorljiv u dimetil- formamidu, umereno rastvorljiv u metilen-hloridu, vrlo teško rastvorljiv u etanolu, gotovo nerastvorljiv u vodi.

Hemijska struktura aripiprazola se može dokazati snimanjem njegovih spektara različitim tehnikama, kao što su infracrvena apsorpciona spektroskopija (IR), ultraljubičasta apsorpciona spektrofotometrija (UV) i masena spektroskopija (MS). IR spektar aripiprazola snimljen tehnikom KBr-diska pokazuje apsorpcione trake koje potiču od karakterističnih funkcionalnih grupa N–H, C–H, C=O, C=C, C–N, C–O, a UV spektar u smeši acetonitrila i metanola (50:50 v/v) daje karakteristične apsorpcione maksimume na 217 i 255 nm. Maseni spekar aripiprazola pokazuje karakterističan molekulski jon (m/z 448 $[M+H]^+$) i fragment jone (m/z 285, 218 i 176) [140].

Aripiprazol pokazuje sposobnost formiranja velikog broja polimorfa i solvatomorfa. Ovi oblici se mogu dokazati primenom različitih metoda, ali se difrakcija X-zraka supstance u čvrstom stanju smatra metodom izbora [140].

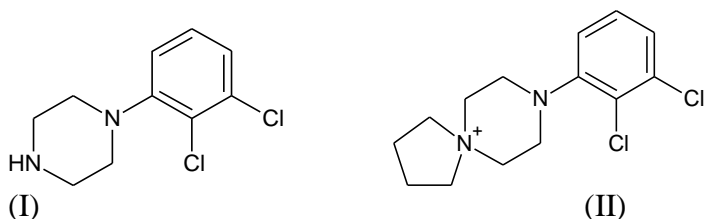
1.4.2.3. Sinteza i potencijalne nečistoće aripiprazola

Sinteza aripiprazola se odvija nizom hemijskih reakcija koje počinju od 7-hidroksi-3,4-dihidro hinolin-2(1H)-ona (A) i dihalogenobutana na primer, 1,4-dibromobutana (B). U ovoj reakciji nastaju jedinjenja koja predstavljaju 7-derivate 3,4-dihidrohinalin-2(1H)-ona, na primer 7-(4-bromobutoksi)-3,4-dihidrohinalin-2(1H)-on (C). Reakcijom ovog jedinjenja sa 1-(2,3-dihlorofenil) piperazinom (D) ili nekim njegovim derivatom nastaje aripiprazol. Sinteza aripiprazola je prikazana na Slici 11.



Slika 11. Šema sinteze aripiprazola

Nečistoće aripiprazola se mogu podeliti na one koje potiču iz procesa sinteze i one koje predstavljaju degradacione proizvode aktivne supstance. Takođe, nečistoće iz procesa sinteze mogu biti polazni materijali ili međuproizvodi. Dodatno, u zavisnosti od reakcionih uslova moguće su i neželjene reakcije, te nastajanje proizvoda tih reakcija.



(I) Nečistoća I (Piperazin nečistoća/EP B)

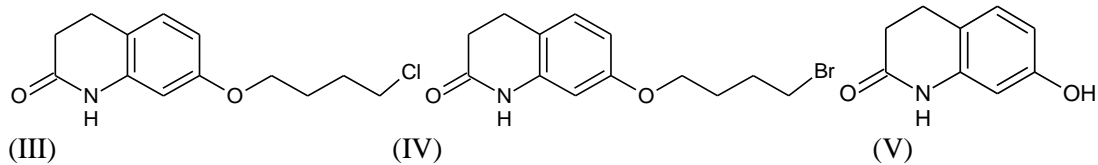
1-(2,3-dihlorofenil)piperazin

Ova nečistoća nastaje tokom procesa sinteze aktivne supstance (polazni materijal).

(II) Nečistoća II (Azaazonispirodekan nečistoća)

8-(2,3-dihlorofenil)-8-aza-5-azonispiro[4,5]dekan

Ova nečistoća nastaje tokom procesa sinteze aktivne supstance (polazni materijal).



(III) Nečistoća III (Hlorobutoksi hinolin nečistoća)

7-(4-hloro butoksi)-3,4-dihidro hinolin-2(1H)-on

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (međuproizvod).

(IV) Nečistoća IV (Bromobutoksi hinolin nečistoća)

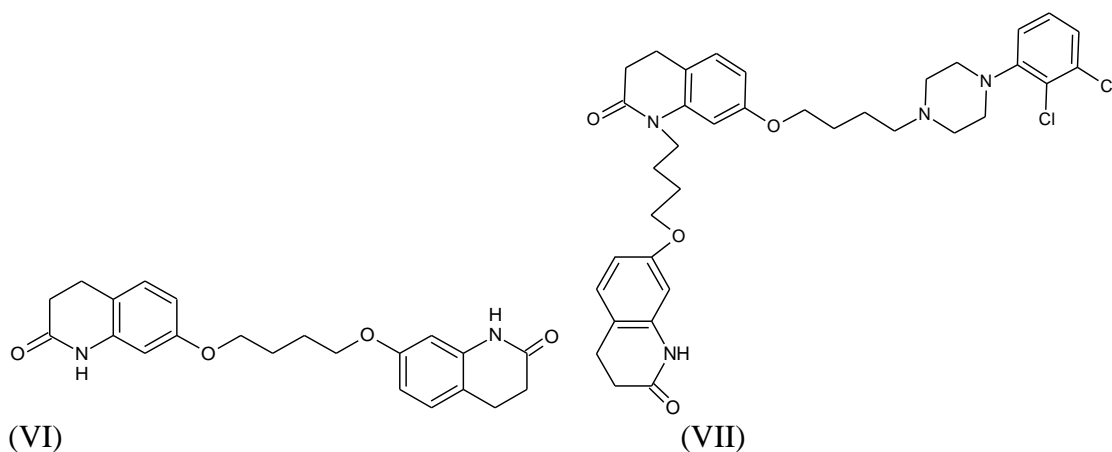
7-(4-bromobutoksi)-3,4-dihidrohlinolin-2(1H)-on

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (međuproizvod).

(V) Nečistoća V (Hidroksi hinolin nečistoća/EP A)

7-hidroksi-3,4-dihidro hinolin-2(1H)-on

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (polazni materijal).



(VI) Nečistoća VI (Dihinolin nečistoća)

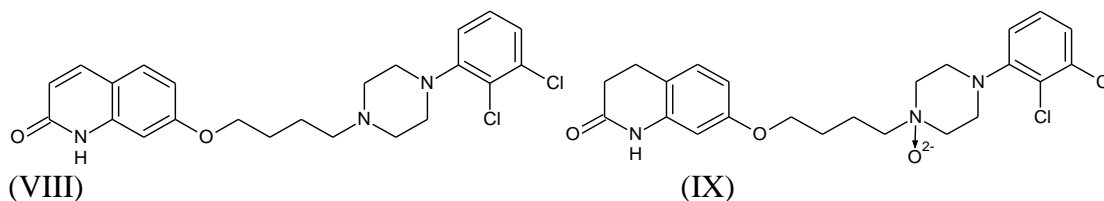
7,7'-(butilendioksi) di-3,4-dihidro hinolin-2(1H)-on

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (neželjeni proizvod reakcije).

(VII) Nečistoća VII (Hinolin aripiprazol nečistoća)

7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)-1-piperazinil]butoksi]-1-[4-(2-okso-3,4-dihidro-1H-hinolin-7-il) butoksi]-3,4-dihidro hinolin-2(1H)-on

Ova nečistoća potiče iz procesa sinteze aktivne supstance (neželjeni proizvod reakcije).



(VIII) Nečistoća VIII (Dehidro aripiprazol nečistoća/EP E)

7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)-1-piperazinil]butoksi]-hinolin-2(1H)-on

Ova nečistoća je proizvod degradacije pod uticajem temperature.

(IX) Nečistoća IX (N-oksid aripiprazol nečistoća/EP F)

N-oksid-7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)-1-piperazinil]butoksi]-3,4-dihidrohinalin-2(1H)-on

Ova nečistoća je proizvod oksidacije aktivne supstance.

Aripiprazol je oficinalan po Evropskoj farmakopeji (European Pharmacopoeia 8.1) i Američkoj farmakopeji (USP 36 NF31 S1) [141,142].

1.4.2.4. Metode za analizu aripiprazola

U dostupnoj naučnoj literaturi publikovan je razvoj nekoliko metoda koje su primenjene tokom farmakokinetičkih studija i studija praćenja terapijskog delovanja leka. U različitim uzorcima humanog ili životinjskog porekla određivan je sadržaj aripiprazola, kao i sadržaj njegovog glavnog metabolita dehidroaripiprazola. Primenjivane su sledeće metode: HPLC sa UV detekcijom [143-147], kapilarna elektroforeza [147-149], zatim HPLC, UPLC i GC spregnute sa masenom spektrometrijom [150-157]. Utvrđeno je i da u organizmu aripiprazol podleže reakcijama dehidrogenacije, N-dealkilovanje i oksidacije. Procesom oksidacije molekula aripiprazola, nastaje aktivni metabolit, dehidroaripiprazol [158].

Opisano je određivanje sadržaja aripiprazola u sirovini i farmaceutskim formulacijama spektrofotometrijski [159,160] i elektro-hemijskim metodama [161]. Takođe, pregledom literature utvrđeno je da se većina RP-HPLC metoda sa UV detekcijom odnosi na određivanje sadržaja aripiprazola u prisustvu njegovih degradacionih nečistoća

generisanih forsiranom degradacijom [162-165]. Svega nekoliko metoda opisuje razdvajanje i istovremeno određivanje sadržaja aripiprazola i njegovih nečistoća HPLC-UV metodom [166,167] ili identifikaciju njegovih degradacionih proizvoda u tabletama LC-QToF-MS [168].

Jednostavna HPLC metoda predložena je za kvantitativnu analizu aripiprazola i njegovih pet procesnih nečistoća u sirovini. Korišćena je mobilna faza sa izokratskim eluiranjem koju čine 0,2% rastvor trifluorosirćetne kiseline u vodi i acetonitril (55:45, v/v). Separacija je izvršena na koloni Inertsil phenyl (250 x 4,6 mm, veličine čestica 5 µm) pri temperaturi od 40°C i protoku mobilne faze 1 ml/min [166].

Brza i osetljiva HPLC metoda predložena je za razdvajanje i kvantitativnu analizu aripiprazola i njegovih nečistoća u sirovini. Mobilnu fazu čine 0,2% trifluorosirćetna kiselina u vodi i 0,2% trifluorosirćetna kiselina u metanolu koji se eluiraju gradijentno pri protoku od 1 ml/min. Korišćena je Zorbax C₁₈ kolona (150 x 4,6 mm, 5 µm) na temperaturi od 25°C. Talasna dužina detekcije iznosi 254 nm [167].

Publikovana je i identifikacija degradacionih proizvoda aripiprazola koji mogu nastati u čvrstim farmaceutskim oblicima u uslovima termalne degradacije. Degradacioni proizvodi aripiprazola, 1-but-3-enil-4-(2,3-dihloro-fenil)-piperazine, aripiprazol N-oksid i 7-but-3-eniloksi-3,4-dihidro-1H-hinolin-2-on, su razdvojeni primenom HPLC metode, uz korišćenje Symmetry C-18 kolone (250 x 4,6 mm, 5 µm) i gradijentno eluiranje mobilne faze pri protoku od 1 ml/min. Mobilnu fazu čini (A) vodeni rastvor amonijum-acetata čiji je pH mravljom kiselinom podešen na 2,5 i (B) mešavina metanola i acetonitrila (50:50, v/v). Identifikacija degradacionih proizvoda izvršena je primenom QToF-MS [168].

Međutim, ni jednom od navedenih metoda nije izvršeno razdvajanje svih devet nečistoća aripiprazola od aktivne supstance. Takođe, nije publikovana optimizacija HPLC uslova za razdvajanje navedenih supstanci uz korišćenje hemometrijskog pristupa.

2. CILJ RADA

Cilj ovog istraživanja bio je:

- Ispitivanje međusobnih interakcija olanzapina sa pomoćnim supstancama odabranim za formulisanje tableta primenom HPLC, DSC, TGA i PXRD metoda.
- Karakterizacija hemijske strukture degradacionih proizvoda olanzapina primenom HPLC-MS, odnosno IR i NMR metode.
- Sprovođenje studije preliminarne stabilnosti tableta olanzapina primenom stres metode, uz karakterizaciju i procenu kritičnih parametara stabilnosti; primenom Arenijusovog kinetičnog modela istakao bi se značaj preliminarnih ispitivanja u proceni rezultata pri dugotrajnim uslovima.
- Izvođenje studije stabilnosti tableta olanzapina na pilot serijama gde bi se na osnovu kretanja vrednosti kritičnih parametara stabilnosti definisao način čuvanja proizvoda i njegov rok upotrebe.
- Ispitivanje međusobnih interakcija aripiprazola sa pomoćnim supstancama odabranim za formulisanje tableta primenom HPLC metode.
- Razvoj i validacija „stability-indicating“ metode tačne hromatografije pod visokim pritiskom za potrebe farmaceutske analize aripiprazola i njegovih devet nečistoća.
- Optimizacija eksperimentalnih uslova za HPLC analizu nečistoća aripiprazola primenom eksperimentalnog dizajna i definisanje veze između strukture i osobina ispitivanih jedinjenja sa jedne strane i njihovog retencionog ponašanja sa druge strane razvojem QSRR modela.
- Izvođenje preliminarnih studija stabilnosti tableta aripiprazola, kao i studija na pilot serijama, u okviru kojih bi se izvršila identifikacija kritičnih parametara i procena načina čuvanja i roka upotrebe proizvoda.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Oprema, hemikalije i računarski programi

3.1.1. Oprema

- Tečni hromatograf, Hewlett Packard 1100 Series, Agilent Technologies, Nemačka: pumpa, autosampler, DAD detektor, ChemStation integrator (grafička obrada)
- Tečni hromatograf, Hewlett Packard 1200 Series, Agilent Technologies, Nemačka: pumpa, autosampler, DAD detektor, ChemStation integrator (grafička obrada)
- Tečni hromatograf, Agilent Technologies 1200 Series, Nemačka, povezan sa sistemom tečni hromatograf – maseni spektrometar, Agilent Technologies 6210, DAD detektor ili ESI MS detektor
- Tečni hromatograf, Agilent Technologies 1100 Series, Nemačka, DAD detektor, preparativni frakcioni kolektor 1200 Series
- Nuklearno magnetni spektrometar, Bruker Avance III 500, Bruker, SAD
- Infracrveni spektrometar sa furijeovom transformacijom, Thermo Scientific Nicolet 6700, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Termogravimetrijski analizator, TGA Q5000, TA instruments, SAD
- Diferencijalno-skenirajući kalorimetar, DSC Q2000, TA instruments, SAD
- Difraktometar x-zraka, Bruker D8 Advance, Bruker, SAD
- Komore za stabilnost Weiss SB1/160/40, WeissUmwelttechnik, Nemačka
- Komore za stabilnost Weiss Pharma 2000, WeissUmwelttechnik, Nemačka
- Komora za stabilnost, Sanyo PSC062.XHX.C, Sanyo Gallenkamp, Engleska
- Komora za stabilnost, Weiss WKL 100/40, WeissUmwelttechnik, Nemačka
- Soba za ispitivanje stabilnosti, Weiss WK16, Weiss Umwelttechnik, Nemačka
- Frižider, Sanyo MPR-414F, Sanyo Gallenkamp, Engleska
- Uređaj za ispitivanje raspadljivosti, Erweka ZT3-4, Nemačka
- Uređaj za ispitivanje čvrstine, Erweka TBH 28, Nemačka
- Uređaj za titraciju po Karl Fišeru, Titrando 835, Metrohm, Švajcarska

- Uređaj za ispitivanje brzine rastvaranja, Erweka DT800, Nemačka
- UV-Vis spektrofotometar, Agilent Technologies 8453, Nemačka
- Mikrolitarski špric 20 µl, Carl Roth GmbH, Nemačka
- Filter, Minisart RC 25, 0.45 µm, Sartorius, Nemačka
- Ultrazvučno kupatilo, Ultrawave DP200-00, Engleska
- Elektronska analitička vaga, Sartorius CPA225D, Nemačka
- Sistem za dobijanje vode HPLC grade, Simplicity 185, Millipore, SAD
- pH metar, MeterLab PHM210, Radiometer Analytical SAS, Francuska

3.1.2. Hemikalije

- Standardne supstance i uzorci:
 - Olanzapin, Hetero Drugs Limited, Indija
 - Nečistoće VI, VII i VIII, Hetero Drugs Limited, Indija
 - Nečistoća III, USP 34-NF29, US Pharmacopoeial Convention, Rockville, SAD
 - Olanzapin 5 mg film tablete, Hemofarm A.D., Vršac
 - Aripiprazol, Jubilant Organosys, Indija
 - Aripiprazol, Zhejiang HuaHai Pharmaceutical Co., Kina
 - Nečistoće I, IV, V, VI, i VII, Jubilant Organosys, Indija
 - Nečistoće II i VIII, Maprimed S.A., Argentina
 - Nečistoća III, Zhejiang HuaHai Pharmaceutical Co., Kina
 - Nečistoća IX, Neuland Laboratories, Indija
 - Aripiprazol 10 mg tablete, Hemofarm A.D., Vršac
- Limunska kiselina, analytical grade, Merck, Nemačka
- Trinatrijum-citrat dihidrat analytical grade, Fluka, Švajcarska
- Acetonitril, HPLC grade, Merck, Nemačka
- Metanol, HPLC grade, Sigma-Aldrich, Germany
- Mravlja kiselina, HPLC grade, Merck, Nemačka
- Koncentrovani vodonik peroksid, Fluka, Švajcarska
- 2-Propanol, HPLC grade, Sigma-Aldrich, Nemačka
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, Sigma-Aldrich, Nemačka
- Natrijum-pentansulfonat (Na-PS), Merck, Nemačka

- Kalijum-dihidrogenfosfat, J.T.Baker, Holandija
- Koncentrovana ortofosforna kiselina, Sigma-Aldrich, Nemačka
- Pomoćne supstance Olanzapin film tableta:
 - Manitol, Kukuruzni skrob, Mikrokristalna celuloza, Talk, Magnezijum stearat, Hidroksipropilmetilceluloza i Titan dioksid su kupljeni od proizvođača i u Hemofarmu odobreni za proizvodnju tableta.
 - Laktoza, anhidrovana, Pharmatose[®] DCL21, DMV Holandija
 - Laktoza, anhidrovana, Pharmatose[®] DCL21, DMV Holandija
 - Laktoza, monohidrat (sitana), Pharmatose[®] 100M, DMV Holandija
 - Laktoza, monohidrat (aglomerisana), Tablettose[®] 80, Meggle, Nemačka
- Pomoćne supstance Aripiprazol tableta:
 - Manitol, Mikrokristalna celuloza, Maltodekstrin, Krosповidon, Natrijum-hidrogen karbonat, Vinska kiselina, Silicijum dioksid, Magnezijum stearat, Saharin natrijum, Aroma i Boja su kupljeni od proizvođača i u Hemofarmu odobreni za proizvodnju tableta.

3.1.3. Računarski programi

- Microsoft Office Excel, Microsoft Corporation, SAD 2007.
- ACD/ChemSketch program, version 11.01, Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto, ON, Kanada, www.acdlabs.com, 2014.
- SIMCA P+ program, Version 12.0, Umetrics AB, Umea, Švedska 2008.
- MOPAC (Molecular Orbital PACKage)/PM₃ program CS MOPAC Pro USA, 2000.
- MarvinSketch, ChemAxon, Budimpešta, Mađarska 2008.
- Chem3DUltra 7.0.0, CambridgeSoft, MA, SAD 2002.
- Gaussian 98 (Revision A.7), Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, SAD, 1998.

3.2. Olanzapin

3.2.1. Hromatografski eksperimentalni uslovi za određivanje nečistoća olanzapina

3.2.1.1. Priprema pufera i rastvarača

Citratni pufer pH 5,9

Priprema se u odmernom sudu od 1000 ml rastvaranjem 8,823 g trinatrijum-citrata dihidrata u vodi. Nakon toga se dodavanjem 5% rastvora limunske kiseline pH podesi na 5,9 i rastvor se dopuni vodom do oznake.

Rastvarač za uzorke

Priprema se smeša 700 ml citratnog pufera pH 5,9, 400 ml acetonitrila i 300 ml metanola.

3.2.1.2. Priprema standardnog rastvora i uzoraka

Standardni rastvor (0,1%)

Osnovni rastvor se priprema odmeravanjem 10 mg standardne supstance olanzapina i 10 mg standardnih supstanci nečistoća VI, VII i VIII u odmerni sud od 100 ml, njihovim rastvaranjem u 70 ml odgovarajućeg rastvarača i dopunjavanjem odmernog suda do oznake. Od ovog rastvora, razblaživanjem u rastvaraču (2 ml ovog rastvora se prenese u odmerni sud od 100 ml), priprema se standardni rastvor koncentracije 0,002 mg/ml.

Rastvor olanzapin film tableta

Odmeri se dvadeset olanzapin film tableta i izmeri prosečna masa jedne tablete. Tablete se sprae i homogenizuju u tarioniku, a zatim odmerena tabletna masa koja sadrži 40 mg olanzapina, prenese u odmerni sud od 20 ml, doda oko 15 ml rastvarača i rastvara na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Nakon hlađenja, odmerni sud se dopuni rastvaračem do oznake i rastvor se filtrira kroz filter 0,45 μm . Filtrat u kome je koncentracija olanzapina 2 mg/ml koristi se za analizu.

Rastvor placeba

Odmeri se 1480 mg placeba, prenese u odmerni sud od 20 ml, doda oko 15 ml rastvarača i rastvara na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Nakon hlađenja, odmerni sud se dopuni rastvaračem do oznake, a rastvor se filtrira kroz filter 0,45 mm.

3.2.1.3. HPLC uslovi

Kolona: Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m

Mobilna faza: 720 ml citratnog pufera pH 5.9, 200 ml acetonitrila i 80 ml metanola

Temperatura kolone: 35°C

Talasna dužina detekcije: 260 nm

Injekciona zapremina: 20 μ l

Protok mobilne faze: 1,8 ml/min

3.2.2. Eksperimentalni uslovi oksidativne degradacije olanzapina

Oksidativna degradacija olanzapina sprovedena je na uzorku aktivne supstance u čvrstom stanju, kao i uzorku film tableta korišćenjem 3 ml 1% rastvora vodonik-peroksida. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta. Koncentracija olanzapina u dobijenim rastvorima iznosila je 0,2 mg /ml. Smeša proizvoda oksidacije za preparativnu HPLC analizu dobijena je mešanjem olanzapina (rastvor u 2- propanolu koncentracije oko 20 mg/ml) sa 7,5 ml 3% rastvora vodonik-peroksida. Rastvor je čuvan na temperaturi od 70°C tokom 3 sata. Nakon toga, uzorci su upareni do suva izlaganjem struji azota na 85°C.

3.2.3. HPLC i MS eksperimentalni uslovi za identifikaciju nečistoća olanzapina

Kolona: Zorbax Eclipse Plus C18, 100 x 2,1 mm, 1,8 μ m

Mobilna faza: (A) 0,2% mravlje kiseline u vodi i (B) acetonitril, prema sledećem programu: t (min)/%B; 0 min/5%, 1.5 min/5%, 12 min/95%, 15 min/95% i 16 min/5%.

Temperatura kolone: 40°C

Talasna dužina detekcije: 190-450 nm

Protok mobilne faze: 0,4 ml/min

Detekcija m/z spektra: 100-3200 u pozitivnom jonskom modu

Potencijal jonskog izvora: 4000 V

Potencijal fragmentacije: 140 V

3.2.4. Eksperimentalni uslovi preparativne HPLC

Kolona: Zorbax XDB C18, 250 x 9,4 mm, 5 μ m

Mobilna faza: (A) 0,2% mravlje kiseline u vodi i (B) acetonitril, prema sledećem programu: t (min)/%B; 0 min/15%, 5 min/15%, 25 min/60%, 30 min/100% i 32 min/100%.

Temperatura kolone: 25°C

Talasna dužina detekcije: 190-450 nm (210 nm, 230 nm i 260 nm)

Protok mobilne faze: 4 ml/min

3.2.5. Eksperimentalni uslovi nuklearno magnetne (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) i infracrvene (engl. *Infra Red*, IR) spektroskopije za identifikaciju nečistoća

Primenjena je dvodimenziona NMR spektroskopija (2D-NMR).

Rastvarač: deuterisani hloroform, CDCl₃ (sa dodatkom deuterisanog metanola, CD₃OD)

Referentni standard: tetrametilsilan ((CH₃)₄Si, TMS)

Frekvencija: 500 MHz za ¹H

Spektri:

- Korelacije heteronuklearnog pomeranja: ¹H-¹³C korelacija preko jedne hemijske veze (engl. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*, HSQC) i ¹H-¹³C korelacija preko više hemijskih veza (engl. *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*, HMBC)
- Korelacije homonuklearnog pomeranja: ¹H-¹H korelaciona spektroskopija (engl. *COrrrelation SpectroscopY*, COSY)

Infracrveni spektri su snimani za supstance u čvrstom stanju primenom tehnike prigušene totalne refleksije (engl. *Attenuated Total Reflectance*, ATR).

3.2.6. Eksperimentalni uslovi za karakterizaciju uzoraka u čvrstom stanju

Diferencijalno skenirajuća kalorimetrija

Masa uzorka: 1.50 ± 0.50 mg za većinu uzoraka. Kod uzoraka gde je bilo potrebno kvantifikovati male količine vlage ili isparljivih supstanci korišćena je veća masa uzorka, do maksimalnih 8.00 mg. Instrument je kalibrisan indijumom (temperatura) i safirom (toplotni kapacitet). Uzorci su analizirani u atmosferi azota od 20°C do 300°C pri brzini zagrevanja od $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Za analizu podataka korišćen je softver Universal Analysis.

Termogravimetrijska analiza

Masa uzorka: 2.00 ± 0.50 mg

Protok struje azota: 25 ml/min

Temperatura zagrevanja: sobna temperatura do 350°C

Brzina zagrevanja: $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

Difrakcija x-zraka supstance u čvrstom stanju

Način refleksije: θ - θ geometrija

Spektar: ^1H , 500MHz

Rendgenska cev (sa bakarnom (Cu) anodom) koristi radni napon od 40 kV pri struji od 40 mA. Refleksioni goniometar kontrolišu dva motora: θ sa opsegom od 0° do 360° i 2θ sa opsegom od 0° do 161° pri $\theta - 2\theta$ geometriji. „Parallel beam“ geometrija ostvarena je posredstvom Gebelovog višeslojnog paraboličnog ogledala. Veličina snopa kontrolisana je u horizontalnoj i vertikalnoj ravni (primarna pukotina Solera (Soller) 4° , izlazna pukotina 0,2 mm, rotacija uzorka 15 rpm). Korišćen je LynxEye silikonski strip detektor sa 176 aktivnih kanala, koji se otvaraju na 3° , Lynx-Iris od 6,5 mm i sekundarna pukotina Solera (Soller) $2,5^{\circ}$. Ugaoni interval, za vrednost 2θ , u kojem su praćena rasejanja bio je od 4° do 35° . Promena ugla vršena je za $0,02^{\circ}$ na svakih 17,6 s.

3.2.7. Eksperimentalni uslovi ispitivanja kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci

3.2.7.1. Priprema uzoraka

Za potrebe studije kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci formulacije tableta pripremljene su binarne smeše u odnosima koji odgovaraju relativnim količinama tih komponenata u tabletama (Tabela 2).

Odgovarajuća količina olanzapina odmerena je u staklenoj bočici, nakon čega je u tu bočicu dodata i odmerena količina pomoćne supstance. Ukupna masa uzorka u svakoj bočici iznosila je 300 mg. Svaki uzorak pripremljen je šest puta. Kako bi se osigurao maksimalan kontakt između komponenata, smeša u svakoj bočici je promešana staklenim štapićem. Ovaj način mešanja odabran je kako bi se izbegao uticaj mehaničke degradacije do koga bi došlo u slučaju energičnije tehnike mešanja. Nakon pripreme smeše su kondicionirane na stres uslovima: 50°C i 50°C/75% RH, tokom 28 dana. Referentni uzorci su čuvani na temperaturi 25°C.

Uzorci su u duplikatu analizirani HPLC metodom za analizu nečistoća prikazanom u poglavlju 3.2.1, primenom termalnih metoda, DSC i TGA analize, kao i XRPD metodom za praćenje polimorfnih promena, prikazanim u poglavlju.

U sledećoj fazi ispitivana je kompatibilnost sa pet različitih punilaca. Pripremljene su binarne smeše sa četiri tipa laktoze (dva tipa laktoze anhidrovane i dva tipa laktoze monihidrat) i manitolom. Cilj ove faze je bio da se istraži uticaj ovih pomoćnih supstanci na porast nečistoća olanzapina. Uzorci su čuvani pri uslovima 50°C/75% RH tokom 28 dana.

Tabela 2. Uzorci preliminarne studije kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci

Naziv komponente:	Oznaka uzorka (masa u mg)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Olanzapin	300	10	60	100	200	250	200	200	250
Laktoza, anhidrovana		290							
Skrob			240						
Mikrokristalna celuloza				200					
Talk					100				
Magnezijum stearat						50			
Hidroksipropilmetil celuloza							100		
Hidroksipropil celuloza								100	
Titan dioksid									50
Odnos u smeši	n/p	1:29	1:4	1:2	1:0.5	1:0.2	1:0.5	1:0.5	1:0.2

Napomene: n/p – nije primenljivo;

3.2.8. Eksperimentalni uslovi ispitivanja stabilnosti

Studija preliminarnе stabilnosti sprovedena je na dve laboratorijske serije olanzapin 5 mg film tableta. Obe serije proizvedene su istim postupkom proizvodnje uz iste kvantitativne odnose olanzapina i pomoćnih supstanci. Jedna šarža sadržala je laktozu anhidrovanu (tip I), a druga laktozu monohidrat (tip IV). Tablete su izložene uticaju povišene temperature, 50°C (u staklenim bočicama) i kombinovanom uticaju povišene temperature i relativne vlage, 50°C/75% RH (direktno izložene tablete, bez kontaktne ambalaže) tokom 28 dana, kako bi se procenio uticaj ovih faktora na porast nečistoća. Istim uslovima izložene su i placebo tablete. U uzorcima su analizirane nečistoća VI, nečistoća VII, nečistoća VIII, nepoznate nečistoće, pojedinačno i ukupne nečistoće.

U sledećoj fazi preliminarnе studije stabilnosti praćena je kinetika nastajanja nečistoća. Tablete sa laktozom anhidrovanom (tip I) izložene su uslovima povišene temperature (40-60°C) i analizirane tokom 3 meseca.

Naredna studija stabilnosti olanzapin 5 mg film tableta sprovedena je na dve proizvodne serije u skladu sa smernicama Internacionalne konferencije o harmonizaciji (ICH). Tokom studije su praćeni fizički, hemijski i mikrobiološki parametri sa ciljem da se definišu način čuvanja i rok upotrebe proizvoda. Analiziran je sadržaj olanzapina i nečistoća (primenom HPLC metode) izgled (organoleptički), parametri koji karakterišu farmaceutsko-tehnološke osobine tableta (brzina rastvaranja lekovite supstance, raspadljivost, čvrstina, voda) i mikrobiološka čistoća (prema zahtevima regulatornih organa).

3.2.8.1. Sadržaj olanzapina

Priprema citratnog pufera pH 5,9 i rastvarača za uzorke je opisana u poglavlju 3.2.1.1.

Poredbeni rastvor se priprema odmeravanjem 20 mg standardne supstance olanzapina u odmerni sud od 100 ml, njenim rastvaranjem u 70 ml odgovarajućeg rastvarača, dopunjavanjem odmernog suda do oznake i filtriranjem kroz filter 0,45 mm. Dobijen je rastvor koncentracije 0,2 mg/ml.

Test rastvor se priprema odmeravanjem tabletnе mase koja sadrži 20 mg olanzapina, njenim prenošenjem u odmerni sud od 100 ml, dodavanjem 70 ml rastvarača i rastvaranjem na ultrazvučnom kupatilu 10 minuta. Nakon hlađenja, odmerni sud se dopuni rastvaračem do oznake, rastvor se centrifugira 5 minuta na 4000 rpm i filtrira kroz

filtrar 0,45 μm . Za svaki uzorak pripremaju se dva test rastvora u kojima je koncentracija olanzapina 0,2 mg/ml.

Uzorci se analiziraju na HPLC aparatu sa DAD detektorom uz izokratsko eluiranje. Koristi se Zorbax Eclipse XDB C18 kolona (150 x 4,6 mm, 5 μm) i mobilna faza: citratni pufer pH 5.9, acetonitril i metanol u odnosu 720:200:80 (v/v). Protok mobilne faze je 1,8 ml/min, a temperatura kolone 35°C. Injekciona zapremina je 20 μl . Detekcija se izvodi na 260 nm. Vreme trajanja analize je 15 minuta.

3.2.8.2. Sadržaj nečistoća olanzapina

Sadržaj nečistoća olanzapina analizira se HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.

3.3. Aripiprazol

3.3.1. Hromatografski eksperimentalni uslovi za određivanje nečistoća

3.3.1.1. Priprema pufera i rastvarača

Fosfatni pufer pH 3,0

Priprema se u odmernom sudu od 1000 ml rastvaranjem 1,11 g kalijum-dihidrogen fosfata i 1,2 g natrijum-pentansulfonata (Na-PS) u vodi. Nakon toga se dodavanjem 10% rastvora ortofosforne kiseline pH podesi na 3,0 i rastvor se dopuni vodom do oznake.

Rastvarači za uzorke

Rastvarač 1 –Priprema se smeša acetonitrila i metanola u odnosu 50:50, v/v.

Rastvarač 2 – Fosfatni pufer pH 3,0.

Rastvarač 3 –Priprema se smeša rastvarača 2 i acetonitrila u odnosu 72:28.

3.3.1.2. Priprema standardnog rastvora i uzoraka

Standardni rastvor (0,2%)

Osnovni rastvor se priprema odmeravanjem 25 mg referentne supstance aripiprazola u odmerni sud od 50 ml, njegovim rastvaranjem u 15 ml rastvarača 1 i dopunjavanjem odmernog suda rastvaračem 2 do oznake. Od ovog rastvora, razblaživanjem u rastvaraču 3 (2 ml rastvora se prenese u odmerni sud od 100 ml, a zatim i 5 ml dobijenog rastvora u odmerni sud od 50 ml), priprema se standardni rastvor koncentracije 1 µg/ml.

Rastvor aripiprazol sirovine

Odmeri se 25 mg aripiprazola, prenese u odmerni sud od 50 ml, doda 15 ml rastvarača 1 i rastvara 15 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Nakon hlađenja, odmerni sud se dopuni rastvaračem 2 do oznake i profiltrira kroz filter 0,45µm.

Rastvor aripiprazol tableta

Odmeri se dvadeset aripiprazol tableta i izmeri prosečna masa jedne tablete. Tablete se sprae i homogenizuju u tarioniku, a zatim odmerena tabletna masa koja sadrži 25 mg

aripirazola, prenese u odmerni sud od 50 ml, doda oko 15 ml rastvarača 1 i rastvara na ultrazvučnom kupatilu 10 minuta. Nakon hlađenja, odmerni sud se dopuni rastvaračem 2 do oznake, rastvor se filtrira kroz filter 0,45 mm. Filtrat u kome je koncentracija aripirazola 500 µg/ml se koristi za analizu.

3.3.1.3. HPLC uslovi

Kolona: Luna C18, 250 x 4,6 mm, 5µm

Mobilna faza: (A) fosfatni pufer pH 3,0 sa Na-PS i (B) acetonitril, prema programu: t (min)/%B; 0 min/28%, 10 min/30%, 40 min/40%, 50 min/63%, 60 min/63% and 61 min/28%.

Temperatura kolone: 25°C

Talasna dužina detekcije: 215 nm

Injekciona zapremina: 20 µl

Protok mobilne faze: 1,0 ml/min

3.3.2. Priprema rastvora za optimizaciju RP-HPLC metode

Osnovni rastvori svih nečistoća pripremaju se odmeravanjem 1 mg odgovarajućih standardnih supstanci nečistoća u odmerne sudove od 10 ml, rastvaranjem u rastvaraču 1 i dopunjavanjem suda istim rastvaračem do oznake.

Osnovni rastvori nečistoća mogu se čuvati 2 dana na temperaturi od 25°C.

Rastvori za optimizaciju hromatografskih uslova pripremaju se rastvaranjem 25 mg aripirazol radnog standarda u 15 ml rastvarača 1, u odmernom sudu od 50 ml. Nakon hlađenja, doda se 250 µl osnovnog rastvora svih nečistoća, odmerni sud se dopuni rastvaračem 2 do oznake i rastvor filtrira kroz 0,45 mm filter. Koncentracija aripirazola u filtratu je 500 µg/ml, a nečistoća 0,5 µg/ml.

Za procenu pogodnosti sistema, korišćenjem Agilent ChemStation softverskog paketa, izračunavaju se retencioni faktor (k), asimetrija pika (A_s), selektivnost (α), rezolucija (R_s) i broj teoretskih platoa (N).

3.3.3. Eksperimentalni dizajn, PLS modelovanje i funkcije hromatografskog odgovora

Hemijske strukture ispitivanih jedinjenja su nacrtane u ACD/ChemSketch programu [169]. Za sva ispitivana jedinjenja izračunati su molekularni parametri ($\log D_{\text{pH}3.0}$, molekularna masa (MW), pK_a , odnosno pK_b vrednosti, kao i dominantni molekularni/katjonski oblici pri pH vrednosti 3,0 pomoću MarvinSketch programa [170].

Centralni kompozitni eksperimentalni dizajn i optimizacija HPLC uslova su izvršeni primenom regresione analize metodom delimičnih najmanjih kvadrata (PLS) i metode površine odgovora (RSM) SIMCA (engl. *Soft Independent Modeling of Class Analogy*) P+12.0 programa [171]. Na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja za optimizaciju HPLC uslova odabrana su četiri faktora: pH vrednost pufera (2,5, 3,0 i 3,5), temperatura kolone (20°C, 25°C i 30°C), koncentracija KH_2PO_4 (0,555, 1,110 i 1,665 g/l) i koncentracija Na-PS (0,6, 1,2 i 1,8 g/l).

QSRR studija je takođe izvedena primenom PLS regresione analize [65, 172] u okviru SIMCA P+ 12.0 programa [171].

Validacija formiranih PLS QSRR modela je izvedena metodom ukrštene validacije (LOO-CV). Sposobnost predviđanja QSRR modela je definisana na osnovu vrednosti kvadrata koeficijenta korelacije za ukrštenu validaciju (Q^2), greške predviđanja trening seta (RMSEE), greške predviđanja test seta (RMSEP) i odnosa koeficijenata korelacije dobijenih eksperimentalno i koeficijenata korelacije dobijenih modelom (r^2 Obs vs. Pred) [65].

Za odabir optimalnih HPLC uslova korišćena je funkcija hromatografskog odgovora (CRF) koju je uveo Beridž [72] i hromatografska eksponencijalna funkcija (CEF) koju je uveo Moris [74], koje su detaljnije opisane u poglavlju 1.2.2. „Funkcije hromatografskog odgovora”.

3.3.4. QSRR studija

Za formiranje QSRR modela su korišćeni podaci o retencionim vremenima aripiprazola i njegovih devet nečistoća (t_r), kao zavisno promenljive, i izračunate vrednosti njihovih molekulskih deskriptora, kao nezavisno promenljive.

Primenom MOPAC/PM₃ programa su određene najstabilnije konformacije sa minimalnom energijom za sva analizirana jedinjenja [173, 174].

Primenom MarvinSketch 5.1.5.0. [170] i Chem3D Ultra 7.0.0. programa [175] izračunati su molekulski parametri tako optimizovanih struktura. Izračunate su sledeći konstucioni, fizičko-hemijski i elektrostatički parametri: molekulska masa, molarna refraktivnost, particioni koeficijent oktanol-voda (logP), koeficijent raspodele (logD_{pH3.0}), Connolly dostupna površina molekula (engl. *Connolly Accessible Surface Area*, CAS), Connolly molekulska površina (engl. *Connolly Molecular Area*, MS), molekulska površina (engl. *Molecular Surface Area*), površina polarnog dela molekula (engl. *Polar Surface Area*, PSA), polarizabilnost, dipol, broj donora vodonične veze (engl. *Hydrogen Bond Donors*, HBD), broj akceptora vodonične veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptors*, HBA).

CS Gaussian 98 program [176] korišćenjem B3LYP/3-21G hibridne funkcije [177,178] primenjen je za izračunavanje kvantno-hemijskih deskriptora: energije najviše popunjene molekulske orbitale (engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO), energije najniže slobodne molekulske orbitale (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO), hemijskog potencijala (μ), elektronegativnosti (χ), otpornost na transfer elektrona, engl. *hardness* (η), sposobnost delokalizacije naelektrisanja, engl. *global softness* (S), indeksa elektrofilnosti (ω) i dipola.

Izračunate vrednosti dvadeset i jednog molekulskog deskriptora su korišćene za razvoj QSRR modela primenom PLS regresione analize [65, 67]. U toku PLS regresione analize najznačajniji deskriptori su birani na osnovu VIP parametra, koji sumira značajnost svake nezavisno promenljive x za obe matrice podataka, Y i X i omogućava odabir najznačajnijih promenljivih. Deskriptori sa najnižim VIP vrednostima su postupno uklanjani iz PLS modela, nakon čega je kreiran nov PLS model. Za svaki novi PLS QSRR model izračunati su sledeći parametri: kvadrat koeficijenta korelacije (R^2), kvadrat koeficijenta korelacije za ukrštenu validaciju (Q^2), F odnos i P vrednost kao parametri značajnosti dobijenih koeficijenata, RMSEE za set za kalibraciju, RMSEP za set za

testiranje, kao i odnos koeficijenata korelacije određenih eksperimentalno i koeficijenata korelacije predviđenih modelom (r^2 Obs vs. Pred). Novi parametri su upoređeni sa istim vrednostima prethodno kreiranog modela. Procedura je ponavljana sve dok nije dobijen model sa najboljim vrednostima navedenih parametara.

Primenom navedene PLS metodologije tokom razvoja QSRR modela omogućen je odabir seta značajnih molekulskih deskriptora. Praćenjem greške predviđanja za trening i test set izbegnuta je mogućnost da QSRR modeli budu previše prilagođeni trening setu. Dodatno, optimalan QSRR model je odabran poređenjem R^2 , Q^2 , F odnosa, P vrednosti, RMSEE, RMSEP i r^2 (Obs vs. Pred) [65, 67].

Konačno, kako bi se ispitala statistička značajnost vrednosti R^2 i Q^2 i isključila mogućnost da usled slučajne korelacije postoji prekomerna prilagođenost modela trening setu primenjen je test permutacije odgovora (engl. *Y scrambling*) [65, 67]. Tokom ovog testa Y matrica je nasumično preuređena 100 puta, dok matrica sa X podacima nije menjana. Zatim je model prilagođen novim Y podacima i izračunate su nove vrednosti R^2 , Q^2 i VIP. Svi koraci prilikom odabira modela ponovljeni su na permutovanim podacima u Y matrici. Nakon toga je na osnovu svih vrednosti R^2 i Q^2 izvršena regresiona analiza, tako što su vrednosti R^2/Q^2 prikazane u funkciji odnosa koeficijenta korelacije permutovanih i originalnih Y promenljivih. Dobijena su dva odsečka na Y osi kao mera osnovnih R^2 i Q^2 vrednosti dobijenih prilagođavanjem nasumično odabranih podataka. Kod dobrih modela R^2 ne trebalo da pređe vrednost 0,4, dok bi Q^2 trebalo da bude manje od 0,05 [65, 67].

3.3.5. Priprema rastvora za validaciju RP-HPLC metode

3.3.5.1. Linearnost metode

Procena linearnosti metode izvodi se na osnovu površine pikova rastvora ispitivanih supstanci u zavisnosti od njihovih koncentracija. Površina pikova predstavlja srednju vrednost tri pojedinačne analize, a kalibracione krive su konstruisane metodom najmanjih kvadrata.

Standardni rastvor aripiprazola

Osnovni rastvor aripiprazola se priprema odmeravanjem 1,25 mg radnog standarda u odmerni sud od 50 ml, rastvaranjem u 30 ml rastvarača 1 i dopunjavanjem suda

rastvaračem 2 do oznake (25 µg/ml). Od ovog rastvora, razblaživanjem u rastvaraču 3, pripremaju se rastvori aripirazola za ispitivanje linearnosti u koncentracijama 0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 0,75 µg/ml, 1,00 µg/ml, 1,50 µg/ml i 2,50 µg/ml.

Standardni rastvor nečistoća I-IX

Osnovni rastvor nečistoća I-IX se priprema odmeravanjem 1,25 mg radnih standarda u odmerni sud od 50 ml, rastvaranjem u 30 ml rastvarača 1 i dopunjavanjem suda rastvaračem 2 do oznake (25 µg/ml). Od ovog rastvora, razblaživanjem u rastvaraču 3, pripremaju se rastvori nečistoća za ispitivanje linearnosti u koncentracijama 0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,50 µg/ml, 0,75 µg/ml, 1,00 µg/ml, 1,50 µg/ml i 2,50 µg/ml (opseg od LOQ do 200% limita specifikacije).

3.3.5.2. Limit kvantifikacije (LOQ) i limit detekcije (LOD)

Određivanje LOQ i LOD aripirazola i nečistoća I-IX izvodi se na osnovu odnosa signala (s) i šuma (n). Pretpostavljene vrednosti LOQ i LOD zadovoljava rastvor kod koga je $s/n > 10$, odnosno $s/n > 3$.

Za određivanje LOQ i LOD se koristi standardni rastvor u kome je koncentracija aripirazola i nečistoća I-IX 0,25 µg/ml.

3.3.5.3. Tačnost i preciznost metode

Tačnost metode se ispituje sa tri rastvora različitih koncentracija i odgovarajućom statističkom obradom rezultata. Ispitivanje preciznosti, odnosno ponovljivosti metode, izvodi se korišćenjem šest rastvora iste koncentracije i statističkom obradom rezultata.

Rastvori za ispitivanje tačnosti i preciznosti metode se pripremaju odmeravanjem oko 25 mg uzorka aripirazola u odmernom sudu od 50 ml, dodavanjem određene količine osnovnih rastvora nečistoća I-IX, rastvaranjem u rastvaraču 1, i dopunjavanjem suda rastvaračem 2 do oznake. Ovi rastvori sadrže aripirazol u koncentraciji 500 µg/ml.

Za ispitivanje tačnosti metode pripremaju se rastvori nečistoća I-IX u koncentracijama, 0,50 µg/ml, 0,75 µg/ml i 1,00 µg/ml, tri puta svaki. Za ispitivanje preciznosti metode priprema se rastvor nečistoća I-IX u koncentraciji 0,75 µg/ml šest puta.

Dodatno, razblaživanjem osnovnog rastvora aripiprazola u rastvaraču 1, pa zatim u rastvaraču 2, pripremaju se rastvori aripiprazola koncentracije 0,50 µg/ml, 0,75 µg/ml i 1,00 µg/ml, tri puta svaki, za ispitivanje tačnosti i rastvor koncentracije 0,50 µg/ml šest puta, za ispitivanje preciznosti.

3.3.5.4. Robustnost metode

Rastvori za ispitivanje robustnosti metode se pripremaju rastvaranjem 25 mg aripiprazol radnog standarda u 15 ml rastvarača 1, u odmernom sudu od 50 ml. Nakon hlađenja, doda se 250 µl osnovnog rastvora svih nečistoća, odmerni sud se dopuni rastvaračem 2 do oznake i rastvor se filtrira kroz 0,45 mm filtar. Koncentracija aripiprazola u filtratu je 500 µg/ml, a nečistoća 0,5 µg/ml.

3.3.6. Eksperimentalni uslovi ispitivanja kompatibilnosti aripiprazola i pomoćnih supstanci

3.3.6.1. Priprema uzoraka

Za potrebe studije kompatibilnosti aripiprazola i pomoćnih supstanci formulacije tableta pripremljene su binarne smeše u odnosima koji odgovaraju relativnim količinama tih komponenata u tabletama (Tabela 3).

Odgovarajuća količina aripiprazola odmerena je u staklenoj bočici, nakon čega je u tu bočicu dodata i odmerena količina pomoćne supstance. Ukupna masa uzorka u svakoj bočici iznosila je 500 mg. Svaki uzorak pripremljen je tri puta. Kako bi se osigurao maksimalan kontakt između komponenata, smeša u svakoj bočici je promešana staklenim štapićem. Ovaj način mešanja odabran je kako bi se izbegao uticaj mehaničke degradacije do koga bi došlo u slučaju energičnije tehnike mešanja. Nakon pripreme smeše su kondicionirane na stres uslovima: 60°C i 60°C/75% RH, tokom 28 dana. Referentni uzorci su čuvani na temperaturi 25°C.

Uzorci su u duplikatu analizirani HPLC metodom za analizu nečistoća prikazanom u poglavlju 3.3.1.

Tabela 3. Uzorci studije kompatibilnosti aripirazola i pomoćnih supstanci

Naziv komponente:	Oznaka uzorka (masa u mg)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Aripirazol	500	50	50	250	250	250	250	250	480	350	350	250	480
Manitol		450											
Mikrokristalna celuloza			450										
Maltodekstrin				250									
Krospovidon					250								
Natrijum hidrogenkarbonat						250							
Vinska kiselina							250						
Silicijum dioksid								250					
Saharin natrijum									20				
Aroma I										150			
Aroma II											150		
Magnezijum stearat												250	
Gvožđe oksid crveno													20
	n/p	1:9	1:9	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:0.04	1:0.4	1:0.4	1:1	1:0.04

Napomene: n/p – nije primenljivo;

3.3.7. Eksperimentalni uslovi ispitivanja stabilnosti aripiprazola

Preliminarna studija stabilnosti sprovedena je na jednoj laboratorijskoj seriji aripiprazol 10 mg tableta. Tablete su izložene uticaju povišene temperature, 50°C (u staklenim bočicama) i kombinovanom uticaju povišene temperature i relativne vlage, 50°C/75% RH (direktno izložene tablete, bez kontaktne ambalaže) tokom 90 dana, kako bi se procenio uticaj ovih faktora na porast nečistoća. Istim uslovima izložene su i placebo tablete. U uzorcima su analizirane nečistoća I-IX, nepoznate nečistoće, pojedinačno i ukupne nečistoće.

Naredna studija stabilnosti aripiprazol 10 mg tableta sprovedena je na tri pilot serije u skladu sa smernicama Internacionalne konferencije o harmonizaciji (ICH). Tokom studija praćeni su fizički, hemijski i mikrobiološki parametri sa ciljem da se definišu način čuvanja i rok upotrebe proizvoda. Analiziran je sadržaj aripiprazola i nečistoća (primenom HPLC metode) izgled (organoleptički), parametri koji karakterišu farmaceutsko-tehnološke osobine tableta (brzina rastvaranja lekovite supstance, raspadljivost, čvrstina, voda) i mikrobiološka čistoća (prema zahtevima regulatornih organa).

3.3.7.1. Sadržaj aripiprazola

Poredbeni rastvori se pripremaju odmeravanjem 15, 30 i 36 mg standardne supstance aripiprazola u odmerne sudove od 100 ml, dodavanjem po 50 ml mobilne faze B i rastvaranjem na ultrazvučnom kupatilu 10 minuta. Nakon hlađenja, odmerni sudovi se dopune do oznake mobilnom fazom A, rastvore na ultrazvučnom kupatilu još 5 minuta, ohlade i filtriraju kroz filter 0,45 µm. Dobijeni su rastvori koncentracija 0,15, 0,30 i 0,36 mg/ml.

Test rastvor se priprema prenošenjem deset tableta u odmerni sud od 100 ml, dodavanjem 20 ml mobilne faze A, rastvaranjem na ultrazvučnom kupatilu 3 minuta, dodavanjem 30 ml mobilne faze B, mešanjem i rastvaranjem na ultrazvučnom kupatilu 15 minuta. Nakon hlađenja, odmerni sud se dopuni mobilnom fazom B oznake. 5 ml ovog rastvora zatim se prenese u odmerni sud od 25 ml i rastvaračem dopuni do oznake. Dobijen rastvor koncentracije 0,2 mg/ml se filtrira kroz filter 0,45 µm. Za svaki uzorak pripremaju se dva test rastvora.

Uzorci se analiziraju na HPLC aparatu sa DAD detektorom uz izokratsko eluiranje. Koristi se Zorbax Eclipse XDB C18 kolona (150 x 4,6 mm, 5 μ m) i mobilna faza koju čine, fosfatni pufer pH 3,0 uz dodatak trietilamina (A) i metanol:acetonitril = 1:1 (B) u odnosu 50:50 (v/v). Protok mobilne faze je 1,0 ml/min, a temperatura kolone 25°C. Injekciona zapremina je 10 μ l. Detekcija se izvodi na 255 nm. Vreme trajanja analize je 10 minuta.

3.3.7.2. Sadržaj nečistoća aripiprazola

Sadržaj nečistoća aripiprazola analizira se HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.3.1.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Olanzapin

4.1.1. Identifikacija nepoznatih nečistoća

Olanzapin je gotovo nerastvorljiv u vodi i pokazuje pH zavisnu rastvorljivost. Zahvaljujući svojoj hidrofobnosti, prolazi krvno-moždanu barijeru, što je bitan preduslov za njegovo terapijsko delovanje. Olanzapin je baznog karaktera i sadrži piperazinski prsten. Na hromatografsko razdvajanje olanzapina i njegovih nečistoća VI, VII i VIII u najvećoj meri utiču kiselinsko/bazni karakter, rastvorljivost u mastima i molekulska masa (Tabela 4).

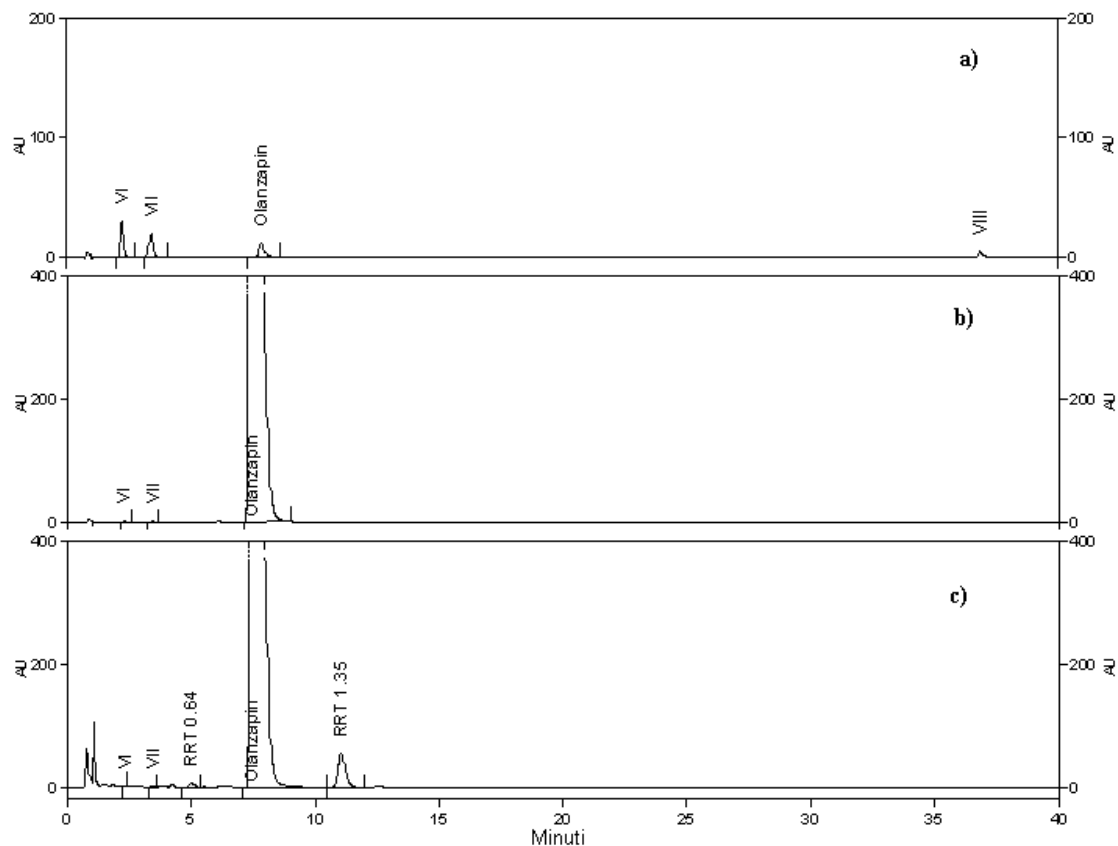
Tabela 4. Molekulski parametri olanzapina i njegovih nečistoća (ChemAxon MarvinSketch)

Jedinjenje	logD pH 5,9	Dominantni oblik pri pH 5,9	Mw	pK _a /pK _b
Nečistoća VI	1,99	katjon	229,307	6,29 (pK _b)
Nečistoća VII	-0,13	katjon	298,414	9,23 (pK _b)
Olanzapin	1,72	katjon	312,441	7,64 (pK _b)
Nečistoća VIII	2,54	molekul	229,307	3,14 (pK _b)

Karakterističan HPLC hromatogram smeše olanzapina i njegovih nečistoća (VI, VII i VIII), uzorka olanzapina i uzorka olanzapina film tableta nakon izlaganja povišenoj temperaturi i relativnoj vlažnosti, pod hromatografskim uslovima za analizu nečistoća datim u poglavlju 3.2.1., prikazan je na Slici 12. a, b i c. Retenciona vremena iznose 8,0 minuta za olanzapin, 2,2 minuta na nečistoću VI, 3,7 minuta na nečistoću VII i 27,0 minuta za nečistoću VIII. Tokom ispitivanja kompatibilnosti aktivne i pomoćnih supstanci, kao i tokom studije preliminarne stabilnosti film tableta, detektovane su još dve nečistoće sa relativnim retencionim vremenom (engl. *Relative Retention Time*, RRT) 0,64 i 1,35. Ove nečistoće predstavljaju glavne degradacione proizvode uzoraka aktivne supstance i film tableta iz studije forsirane degradacije i označene su kao DP1 i DP2 (engl. *Degradation Product*, DP). Nastaju oksidativnim putem pod uslovima opisanim u poglavlju 3.2.2.

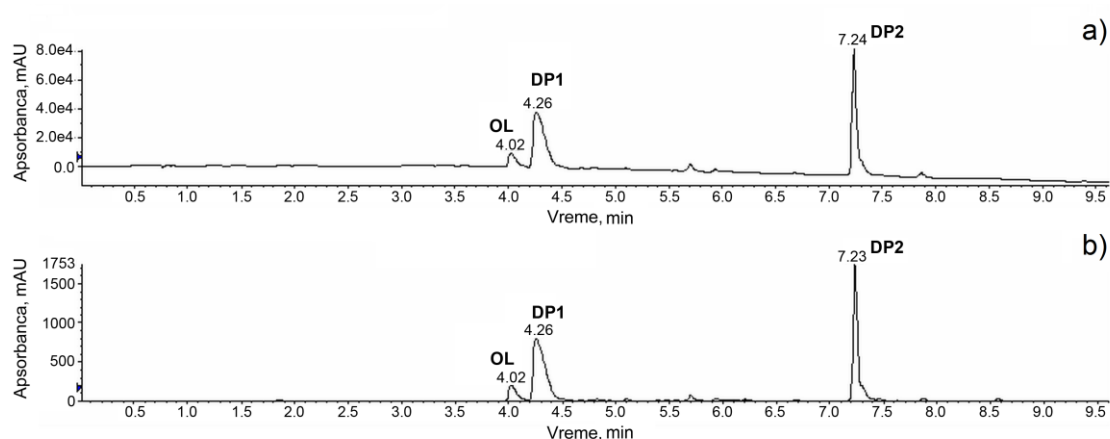
Studije forsirane degradacije aktivnih supstanci predstavljaju skup ispitivanja pod stres uslovima koji ukazuju na moguće degradacione puteve, kao i na stabilnost hemijskih

veza u molekulu. Odabir eksperimentalnih uslova zavisi od osobina aktivne supstance i farmaceutskog oblika.



Slika 12. Hromatogram a) smeše standarda olanzapina i nečistoća VI, VII i VIII, b) uzorka olanzapina i c) uzorka olanzapin film tableta kondicioniranih na 50°C/75% RH tokom 14 dana

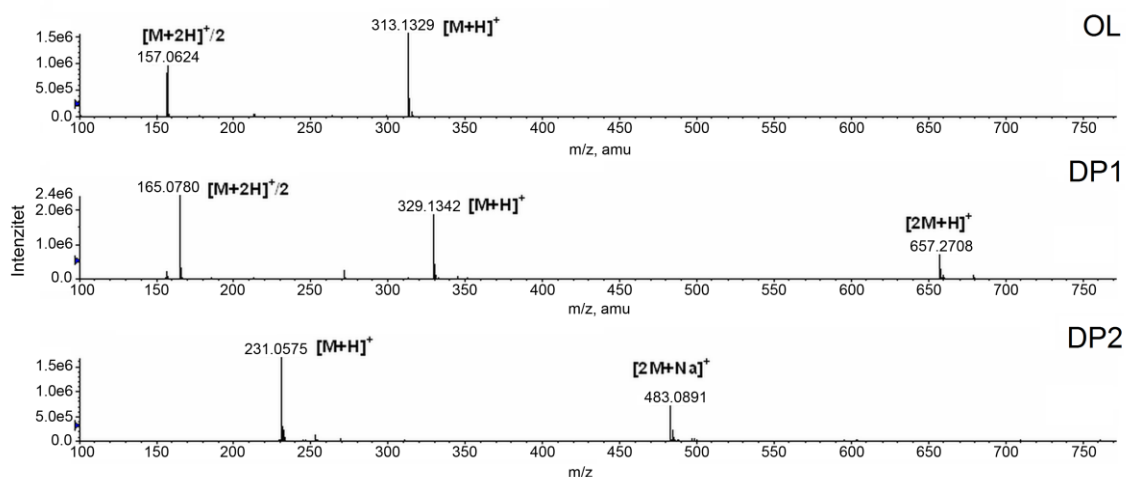
Kako bi se odredila struktura nepoznatih nečistoća, smeša degradacionih proizvoda olanzapina dobijena oksidativnim putem analizirana je pod hromatografskim i uslovima masene spektrometrije prikazanim u poglavlju 3.2.3. Analitički HPLC hromatogram sa DAD detekcijom pokazuje tri glavna pika koja pripadaju: olanzapinu (OL) i degradacionim proizvodima, DP1 i DP2 (Slika 13)



Slika 13. Analitički HPLC hromatogram olanzapina (OL) i degradacionih proizvoda DP1 i DP2; a) totalni i b) u opsegu 259-261 nm

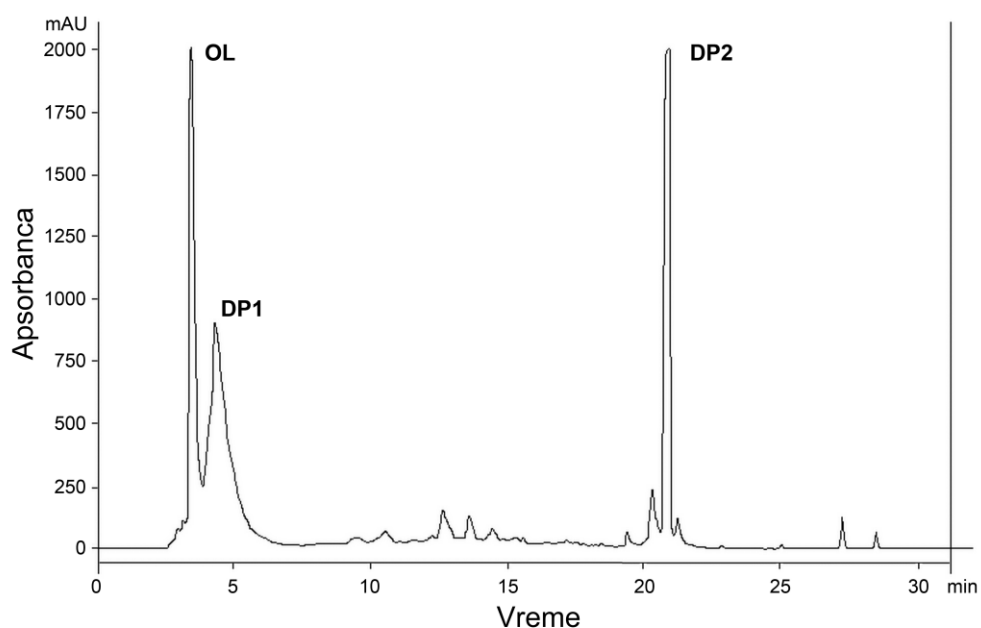
Maseni spektri visoke rezolucije dobijeni jonizacijom elektrosprejom (engl. *High-Resolution Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*, HR ESI MS) prikazani su na Slici 14. Za identifikaciju DP1 i DP2 primenjena je preparativna HPLC metoda opisana u poglavlju 3.2.4. Primenom ove metode vreme eluiranja olanzapina je 3,5 minuta, a vreme eluiranja DP1 i DP2 4,5 i 20,8 minuta, redom (Slika 15). Frakcije sa degradacionim proizvodima su prikupljene i uparene do suva u rotacionom vakuum isparivaču. Čistoća izolovanih jedinjenja proverena je primenom HPLC metode za analizu nečistoća, a snimljeni su i njihovi nuklearno-magnetni (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) i infracrveni (engl. *Infrared*, IR) spektri. ^1H NMR spektar DP1 pokazuje da ovaj degradacioni proizvod sadrži tragove olanzapina (Slika 16a).

HR ESI MS spektar DP1 pokazuje da ovo jedinjenje, u poređenju sa olanzapinom, ima jedan atom kiseonika više. Takođe, osnovna razlika između ^1H NMR spektara DP1 i olanzapina je hemijsko pomeranje protona piperazinskog prstena i CH_3 grupe vezane za N-4'. Na osnovu ovoga je zaključeno da je DP1 N-oksid derivat olanzapina, koje je identifikovano kao (2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-*b*][1,5] benzo-diazepin-4-N-oksid), nečistoća **II**. Spektralni podaci DP1 su u saglasnosti sa podacima iz literature [130, 136].



Slika 14. HR ESI MS spektri olanzapina (OL) i njegovih degradacionih proizvoda DP1 i DP1

HR ESI MS spektar DP2 pokazuje jone pri m/z 231.0575 $[M+H]^+$ i 483.0891 $[2M+Na]^+$, koji odgovaraju molekularnoj formuli $C_{12}H_{10}N_2OS$. Takođe, 1H NMR spektar DP2 ne pokazuje hemijsko pomeranje koje potiče od piperazinskog prstena (Slika 16b). Dodatno, ^{13}C NMR spektar pokazuje signal pri δ 166,5 ppm koji odgovara karbonilnom ugljeniku. Na osnovu ovih podataka jedinjenje DP2 je identifikovano kao (5,10-dihidro-2-metil-4H-tieno[2,3-*b*][1,5] benzodiazepin-4-on), nečistoća **III**, što je u skladu sa literaturnim podacima [131, 136].



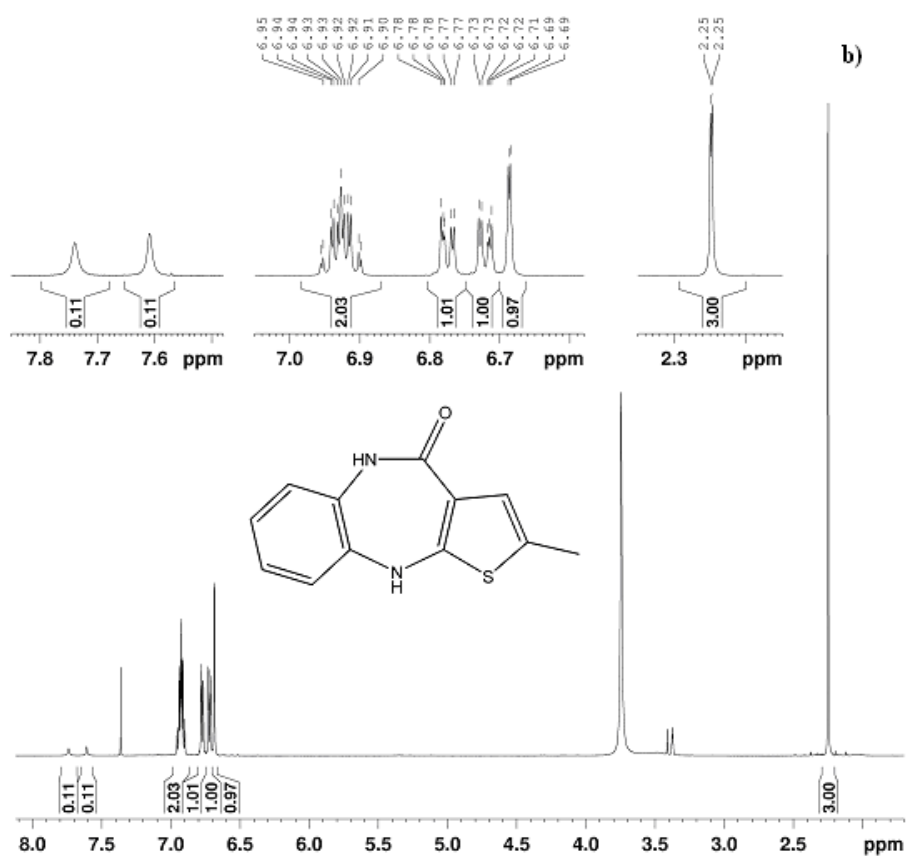
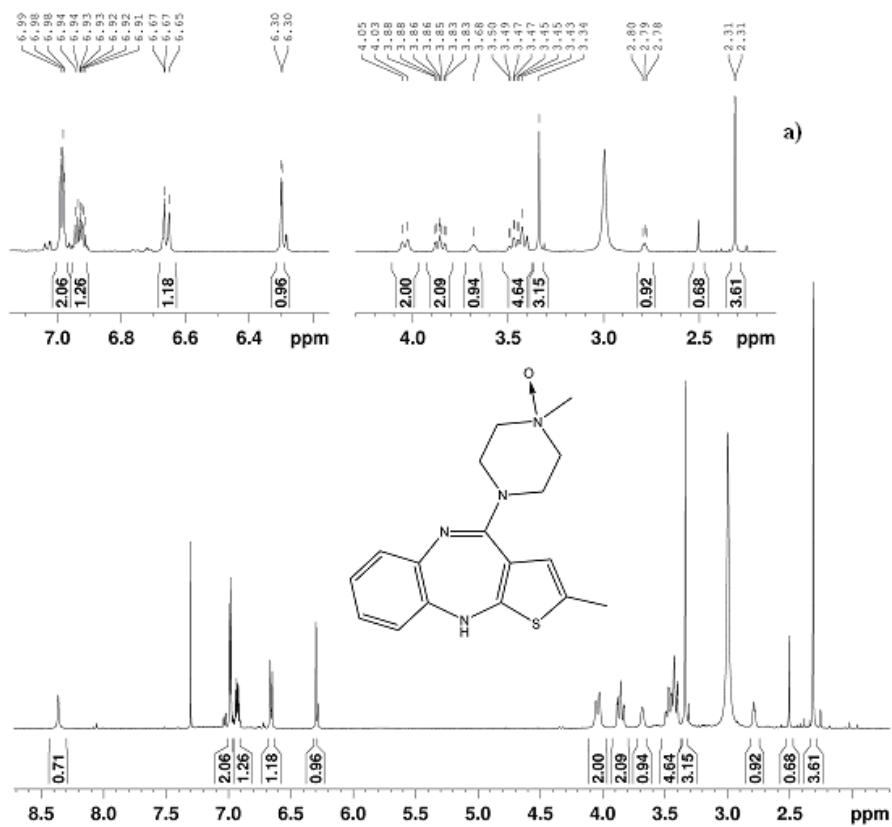
Slika 15. Preparativni HPLC hromatogram degradacionih proizvoda olanzapina

2D NMR spektri (HSQC, HMBC i COSY) omogućili su potpuno rešavanje ^1H i ^{13}C NMR spektara DP1 i DP2 (Tabela 5).

Spektroskopski podaci degradacionih proizvoda olanzapina su sledeći:

DP1 (2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-*b*][1,5]benzodiazepin-4-N-oksid): UV (ACN/H₂O) λ_{max} : 198, 230 *sh*, 260, 286 *sh* nm; IR (ATR) ν_{max} : 3252, 3060, 2945, 2920, 1592, 1466, 1398, 910, 762, 721 cm^{-1} ; HR ESI MS m/z (rel. int.): 657.2708 [2M+H]⁺ (30), 329.1342 [M+H]⁺ (75), 165.0780 [M+2H]⁺/2 (100); ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci prikazani su u Tabeli 5.

DP2 (5,10-dihidro-2-metil-4H-tieno[2,3-*b*][1,5]benzodiazepin-4-on): UV (ACN/H₂O) λ_{max} : 200, 220 *sh*, 232, 264 *sh* nm; IR (ATR) ν_{max} : 3281, 3034, 2917, 2852, 1636, 1577, 1514, 1457, 1329, 767, 742 cm^{-1} ; HR ESI MS m/z (rel. int.): 483.0891 [2M+Na]⁺ (45), 231.0575 [M+H]⁺ (100); ^1H NMR i ^{13}C NMR podaci prikazani su u Tabeli 5.



Slika 16. (nastavak) a) ^1H NMR spektar DP1 (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) b) ^1H NMR spektar DP2 (500 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$)

Tabela 5. ¹H i ¹³C NMR podaci degradacionih proizvoda olanzapina, DP1 i DP2 (500 MHz, CDCl₃+CD₃OD, TMS)

Pozicija	DP1		DP2	
	¹ H (δ, mult., J)	¹³ C	¹ H	¹³ C
2	-	129.8	-	125.0
3	6.30 <i>br q</i> (1.2 Hz)	122.3	6.69 <i>br q</i> (1.2 Hz)	124.4
4	-	118.0	-	115.3
5	-	156.8	-	166.5
6 (N-H)	-	-	7.74 <i>br s</i>	-
7	-	140.0	-	129.3
8	6.98 <i>m</i> *	128.0	6.77 <i>dd</i> (7; 2 Hz)	121.5
9	6.98 <i>m</i> *	124.7*	6.91 <i>dt</i> (7.4; 2 Hz)	123.9
10	6.93 <i>m</i>	124.7*	6.94 <i>dt</i> (7.4; 2 Hz)	124.9
11	6.66 <i>br d</i> (7.6 Hz)	119.1	6.72 <i>dd</i> (7; 2 Hz)	119.0
12	-	141.6	-	138.3
13 (N-H)	8.36 <i>br s</i>	-	7.61 <i>br s</i>	-
14	-	153.4	-	156.4
15 (Ar-CH ₃)	2.31 <i>d</i> (1.2 Hz)	15.3	2.25 <i>d</i> (1.2 Hz)	14.4
2',6' β	3.86 <i>dt</i> (14; 3 Hz)	41.5	-	-
2',6' α	4.04 <i>br d</i> (14 Hz)		-	-
3',5'	3.39-3.51 <i>m</i>	64.3	-	-
7' (N-CH ₃)	3.34 <i>s</i>	58.9	-	-

* preklapanje

4.1.2. Studija kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci formulacije tableta

4.1.2.1. Ispitivanje hemijske kompatibilnosti primenom HPLC, DSC i TGA metoda

Prvi preliminarni rezultati studije kompatibilnosti pokazali su da tokom 28 dana kondicioniranja pod ispitivanim uslovima ne dolazi do značajnog porasta nečistoće III u većini smeša olanzapina sa pomoćnim supstancama, u poređenju sa čistim olanzapinom (uzorak 1). Izuzetak je smeša olanzapina i laktoze, anhidrovane (uzorak 2) gde su, u poređenju sa uzorkom 1, pri uslovima povišene temperature i kombinovanog uticaja temperature i vlage, zabeležene visoke vrednosti ove nečistoće; 0,54% odnosno 1,17%. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 6.

Tabela 6. Sadržaj nečistoće III (%) u smešama olanzapina i pomoćnih supstanci

Oznaka uzorka	Uslovi kondicioniranja	
	50°C, 28 dana	50°C/75% RH, 28 dana
1	0,08±0,01	0,13±0,02
2	0,54±0,05	1,17±0,12
3	0,09±0,01	0,16±0,02
4	0,06±0,01	0,38±0,04
5	0,10±0,01	0,12±0,01
6	0,09±0,01	0,20±0,02

Iz ovog razloga, naredno ispitivanje kompatibilnosti obuhvatilo je samo sredstva za dopunjavanje, četiri tipa laktoze i manitol, kako bi se procenio njihov uticaj na stabilnost olanzapina i porast nečistoće III. Dobijeni rezultati (Tabela 7) pokazali su da stepen degradacije olanzapina zavisi od vrste sredstva za dopunjavanje, odnosno njegove higroskopnosti. Degradacija olanzapina je zanemarljiva u prisustvu manitola. Manitol je nehigroskopan i ne upija vodu čak ni pri visokim vrednostima relativne vlage, pa se iz tog razloga koristi sa aktivnim supstancama osetljivim na vlagu. Sa druge strane, kada se uporede četiri tipa laktoze, najmanji stepen degradacije beleži se u smeši sa laktozom monohidrat tip IV, a zatim sa laktozom monohidrat tip III. Razlika u rezultatima nečistoće III između ova dva tipa laktoze monohidrat može se objasniti različitom veličinom čestica. Naime, kod laktoze tip III (<250 µm, NLT 99%) u poređenju sa laktozom tip IV (<630 µm, NLT 97%) čestice su sitnije usled čega je veća slobodna površina. Veća površina dovodi do adsorpcije veće količine vode koja zatim utiče na degradaciju olanzapina. Laktoze anhidrovane, tip I i tip II, pokazuju značajan porast nečistoće III nešto veći kod tipa II u poređenju sa tipom I. Kod ova dva tipa laktoze veličina čestica takođe utiče na degradaciju molekula olanzapina, ali u suprotnom smeru. Naime, laktoza anhidrovana tip I (<250 µm, NLT 80%) ima sitnije čestice od laktoze tipa II (<250 µm, NLT 65%), ali je veći porast degradacije zabeležen kod laktoze tip II sa krupnijim česticama. Ova pojava objašnjava se činjenicom da laktoza anhidrovana podleže procesu hidratacije, tj. konverzije u laktozu monohidrat, što je detekovano termogravimetrijskom analizom i difrakcijom x-zraka iz suvog uzorka. Sitnije čestice podležu ovom procesu u potpunosti i brže, dok je kod krupnijih čestica proces delimičan, usled čega se molekuli vode adsorbuju na površini u manjem stepenu u poređenju sa manjim česticama. Dodatno, značajno manji porast nečistoće III zabeležen je u smešama sa oba tipa laktoze monohidrat u poređenju sa smešama koje sadrže laktozu anhidrovanu

usled male higroskopnosti, što je od velikog značaja kod aktivnih supstanci osetljivih na vlagu.

Tabela 7. Sadržaj nečistoće III (%) u smešama olanzapina i odabranih punilaca

Sastav smeša	50°C/75% RH, 28 dana
API-LA tip I	0,98±0,09
API-LA tip II	1,30±0,12
API-LM tip III	0,43±0,04
API-LM tip IV	0,33±0,03
API-manitol	0,16±0,02

Vlaga može u velikoj meri da utiče na stabilnost čvrstih aktivnih supstanci. Sposobnost vode da utiče na fizičke ili hemijske promene zavisi od aktivnosti vode u uzorku, koja je direktni pokazatelj količine slobodne, pokretne vode u sistemu. Zapravo, fizičko stanje vode u sistemu, tj. smešama aktivne i pomoćnih supstanci, određuje njenu ulogu i značaj u interakcijama. Manitol, laktoza, anhidrovana i laktoza monohidrat su kristalni ekscipijensi. Kada se izlože uticaju vlage, voda se najpre adsorbuje na njihovoj površini i onda vezuje za prisutne polarne grupe. Pretpostavka je da pomoćne supstance deluju kao posrednici u procesu degradacije olanzapina. U smešama olanzapina sa manitolom pokretljivost molekula je mala. Sa druge strane, u smešama sa anhidrovanom laktozom beleži se povećana reaktivnost koja se može objasniti nepravilnostima u kristalnoj rešetki, koje dovode do veće pokretljivosti molekula, ili plastifikacijom malih amorfnih (neuređenih) regija. Takođe, razlike između dva tipa laktoze mogu se objasniti činjenicom da je aktivnost vode u anhidrovanom obliku veća zbog toga što taj oblik teži da pređe u monohidrat, koji je termodinamički stabilniji [179]. Laktoza monohidrat sadrži oko 5% (m/m) vode koja je inkorporirana u kristalnu rešetku i zato nije dostupna za hemijske reakcije. Laktoza anhidrovana, sa druge strane, sadrži samo 1% (m/m) vode, ali snažno adsorbuje vodu zbog težnje da pređe u monohidrat. Iz tog razloga, laktoza anhidrovana koristi adsorbovanu vodu za proces nastajanja monohidrata i povećava količinu aktivne vode koja dovodi do degradacije olanzapina.

Iako je u smešama sa laktozom anhidrovanom tip I došlo do značajnog porasta nečistoće III, ova pomoćna supstanca je odabrana za dalji razvoj formulacije zbog svojih dobrih tehnoloških karakteristika (dobra kompresibilnost). Laktoza monohidrat tip IV je odabrana kao alternativni punilac.

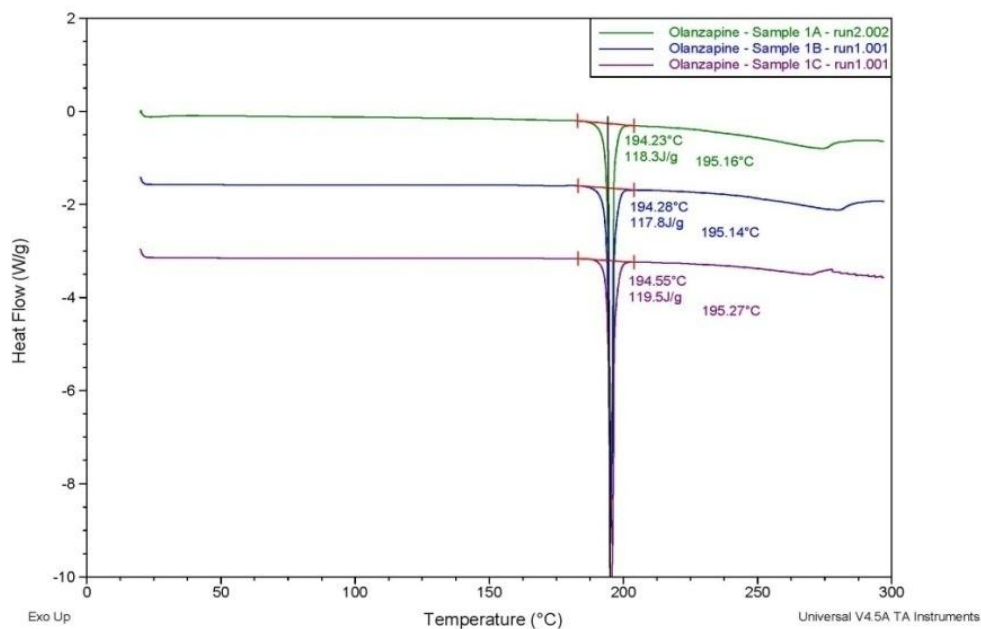
Dodatno, pored procene stepena degradacije, primenom HPLC metode, izvršena je i karakterizacija uzoraka u čvrstom stanju tj. smeša aktivne i pomoćnih supstanci primenom termalnih metoda DSC i TGA, kao i difrakcijom x-zraka iz praha.

Uzorci binarnih smeša olanzapina i pomoćnih supstanci, kao i čistog olanzapina, analizirani su i primenom DSC metode koja se smatra jednom od vodećih tehnika na ovom polju [12-20].

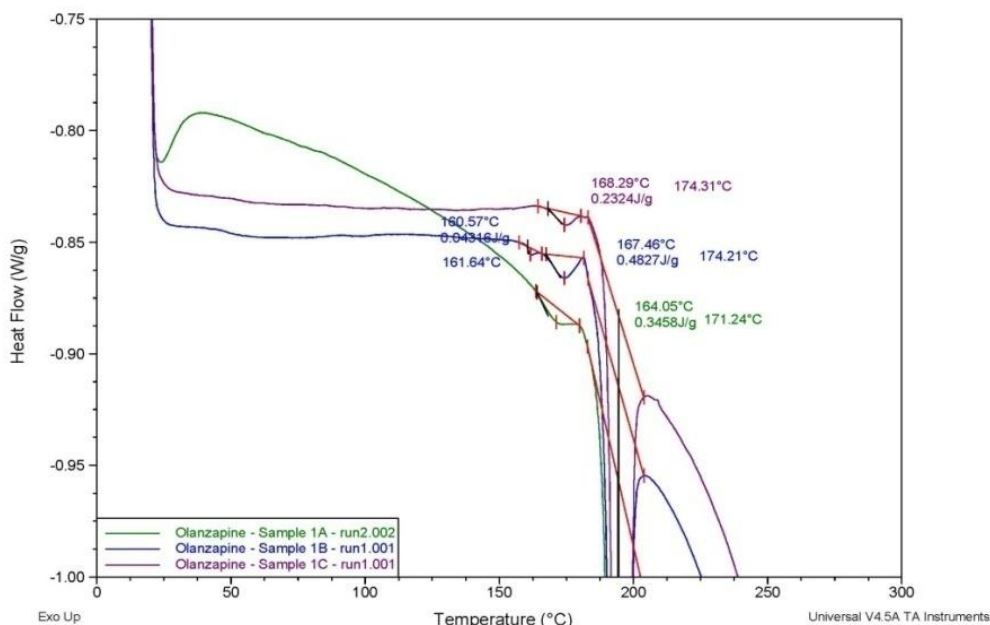
Rezultati čistog olanzapina nisu pokazali značajne razlike u temperaturi topljenja i toploti fuzije uzoraka izloženih kombinovanom uticaju povišene temperature i relativne vlage (1A) i povišenoj temperaturi (1B) u poređenju sa referentnim uzorkom (1C). Dobijene su vrednosti $194,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$ i $118,1 \pm 2,1 \text{ J/g}$. Uočeno je da je toplota fuzije referentnog uzorka nešto viša u odnosu na preostala dva što ukazuje na veoma male promene u kondicioniranim uzorcima koje se mogu pripisati degradaciji ili faznoj promeni (Slika 17a). Međutim, kada se DSC krive pogledaju detaljnije, kod uzorka 1B uočava se termalni proces koji prethodi topljenju olanzapina. U pitanju je energetski mali ($0,04 \text{ J/g}$) endoterman proces na $160,5^\circ\text{C}$ koji ukazuje na određen stepen degradacije pri ovim uslovima izlaganja. Takođe, proces koji se odigrava na $167,0^\circ\text{C}$ mogao bi da se objasni izvesnom malom količinom polimornog oblika II ili prisustvom male količine nečistoća u uzorku. Ukoliko su u pitanju nečistoće iz inicijalnog uzorka, ne očekuje se promena ovog procesa pri različitim uslovima kondicioniranja u različitim smešama. Sa druge strane, ukoliko u smešama sa različitim pomoćnim supstancama dođe do promene, veća je verovatnoća da je u pitanju degradacioni proces ili fazna promena (Slika 17b).

Rezultati ispitivanja smeša olanzapina i pomoćnih supstanci tabletna formulacije su generalno u saglasnosti sa rezultatima dobijenim HPLC analizom. Najveće i najznačajnije promene dobijene su u smešama sa anhidrovanom laktozom, a vrednosti toplote fuzije ukazuju na to da je samo jedan deo olanzapina u originalnom kristalnom obliku koji ne reaguje sa molekulima u svom okruženju (Slika 18a). Zapravo, na osnovu informacije o udelu olanzapina u formulaciji može se predvideti da je $74,6\%$ aktivne supstance u originalnom obliku kod referentnog uzorka (2C), odnosno $64,4\%$ i $49,4\%$ kod kondicioniranih uzoraka (2B i 2A). Takođe, poređenjem kondicioniranih sa referentnim uzorkom uočava se značajno smanjenje količine kristalnog olanzapina. Dodatno, kod uzorka 2A dobijen je endotermni pik na 132°C koji se tumači uklanjanjem vode iz laktoze monohidrat koja je nastala tokom izlaganja ovog uzorka visokim RH vrednostima (Slika 18b), što je kasnije i potvrđeno TGA i PXRD analizama. Takođe, kod istog uzorka, u intervalu $155\text{-}180^\circ\text{C}$ beleži se još jedan dodatan endotermni i egzotermni

dogadjaj koji se može povezati sa degradacijom olanzapina pod datim eksperimentalnim uslovima tj. degradacijom koja se odvija uz pomoć nekog svojstva pomoćne supstance (engl. *excipient mediated degradation*).

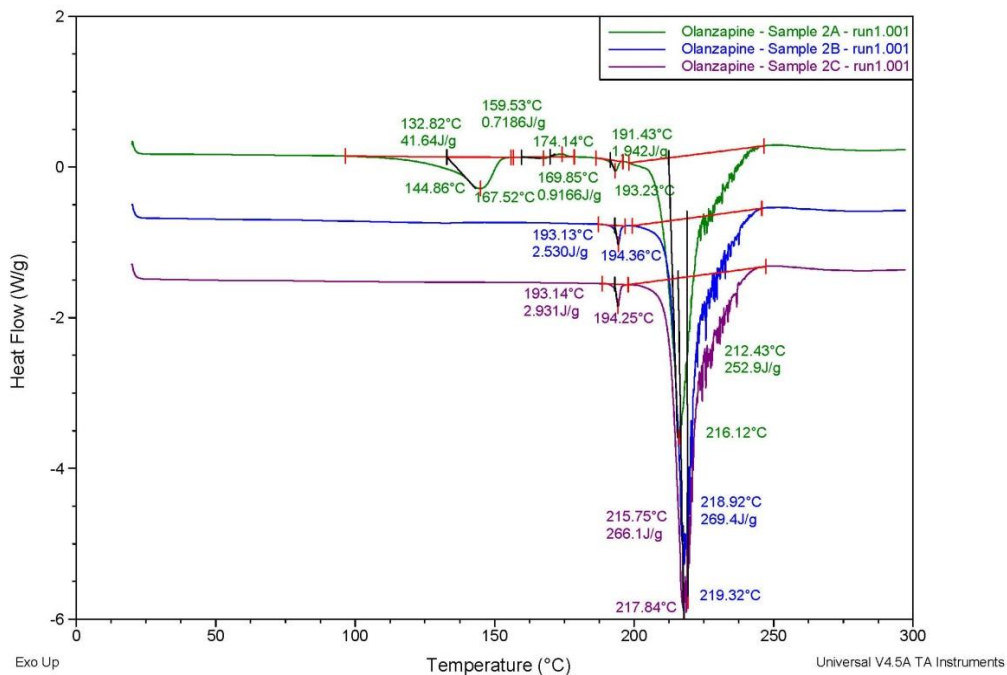


a)

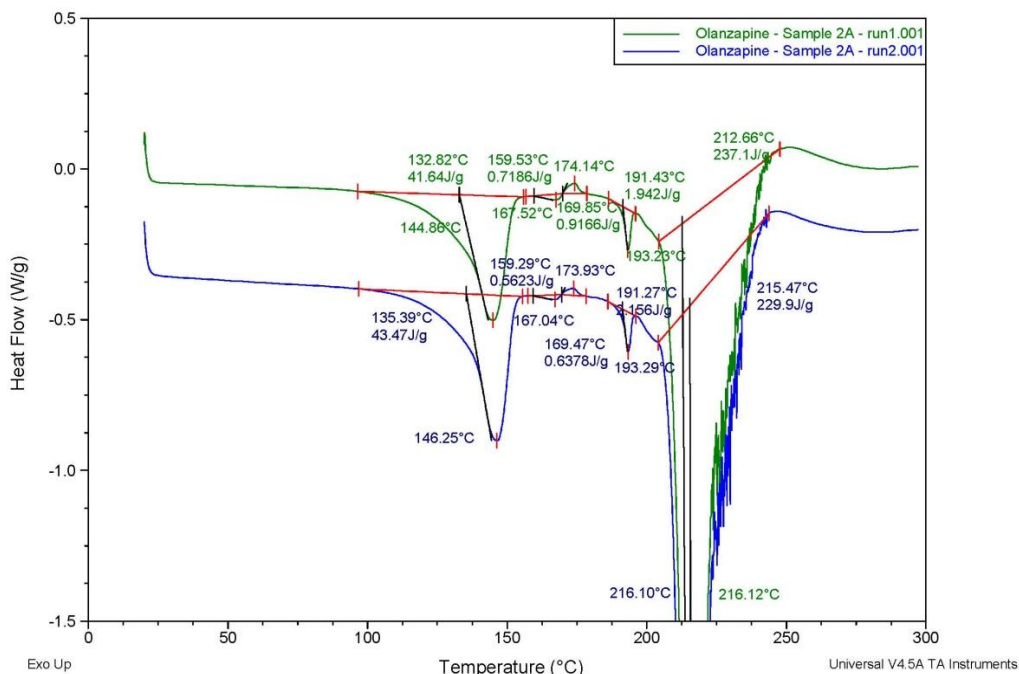


b)

Slika 17. DSC krive čistog olanzapina: 50°C/75% RH (1A), 50°C (1B) i referentni uzorak (1C); a) y-osa: -10 do 2 W/g b) y-osa: -1 do -0.75 W/g



a)



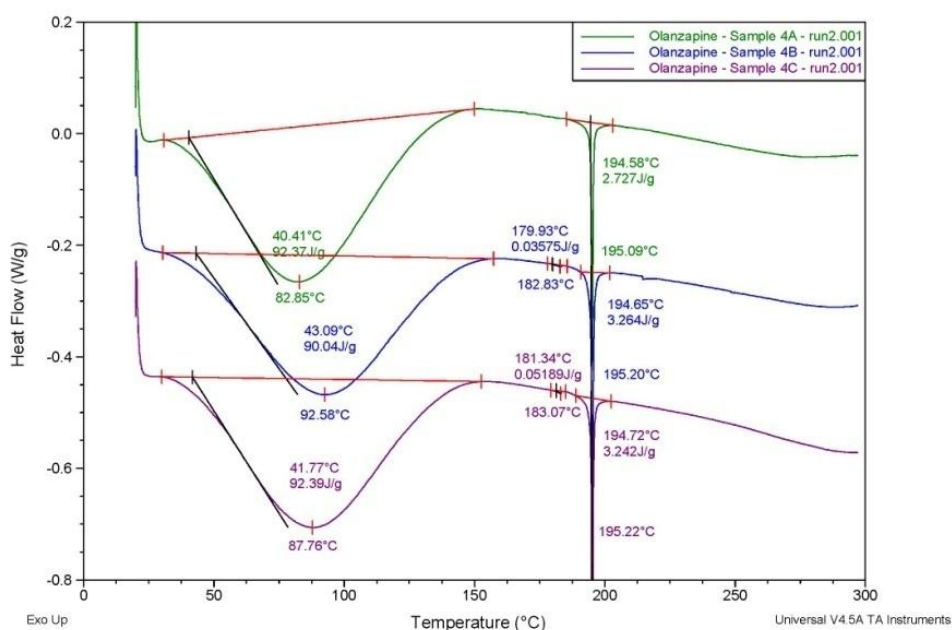
b)

Slika 18. DSC krive smeše olanzapina i laktoze anhidrovane: 50°C/75% RH (2A), 50°C (2B) i referentni uzorak (2C); a) y-osa: -6 do 2 W/g b) y-osa: -1.5 do 0.5 W/g

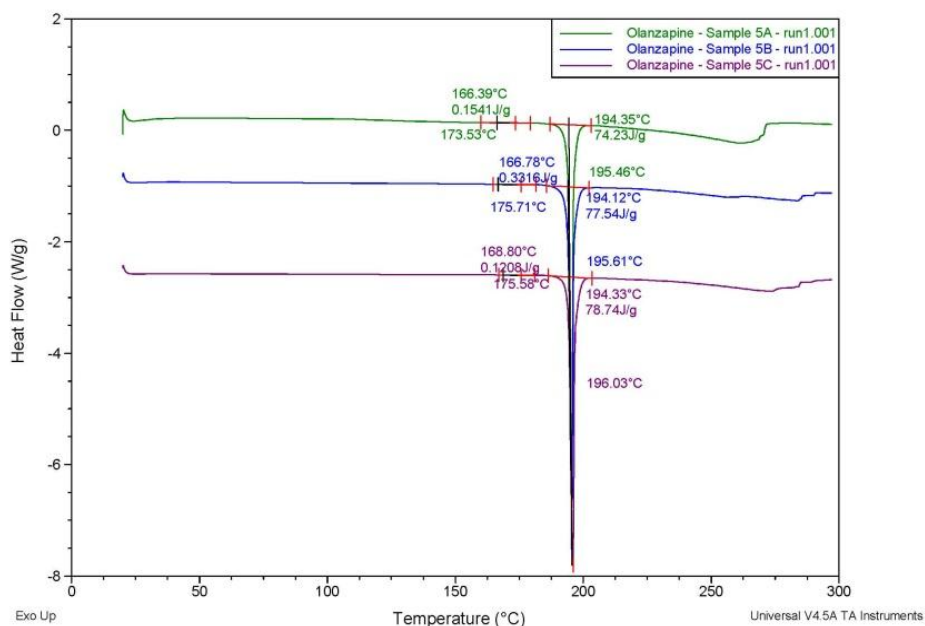
U uzorcima sa skrobom i mikrokrystalnom celulozom takođe je konstatovano smanjenje količine kristalnog olanzapina u poređenju sa odgovarajućim referentnim uzorcima, najizraženije kod uzoraka izloženih kombinovanom uticaju povišene temperature i relativne vlage (Slika 19), ali su te promene značajno manje u poređenju sa promenama koje su dobijene u smešama sa anhidrovanom laktozom.

Sa druge strane, analizirani uzorci smeše olanzapina i talka, odnosno olanzapina i magnezijum stearata pokazuju veliku sličnost, uz određene veoma male razlike između uzoraka izloženih kombinovanom uticaju povišene temperature i relativne vlage i povišenoj temperaturi u poređenju sa kontra uzorkom. DSC krive smeša olanzapina i talka prikazane su na Slici 20. Iako i u ovoj smeši uzorak 5A pokazuje nešto drugačije ponašanje olanzapina prilikom procesa topljenja u poređenju sa druga dva uzorka, što je dodatnim PXRD analizama pripisano promeni polimorfnog oblika (Tabela 8), ove razlike nisu značajne.

S obzirom da zaključci koji se donose samo na osnovu DSC analiza mogu voditi u pogrešnom pravcu, rezultate DSC analize treba interpretirati pažljivo, obično u kombinaciji sa nekom drugom tehnikom [12].



Slika 19. DSC krive smeše olanzapina i mikrokrystalne celuloze: 50°C/75% RH (5A), 50°C (5B) i referentni uzorak (5C)



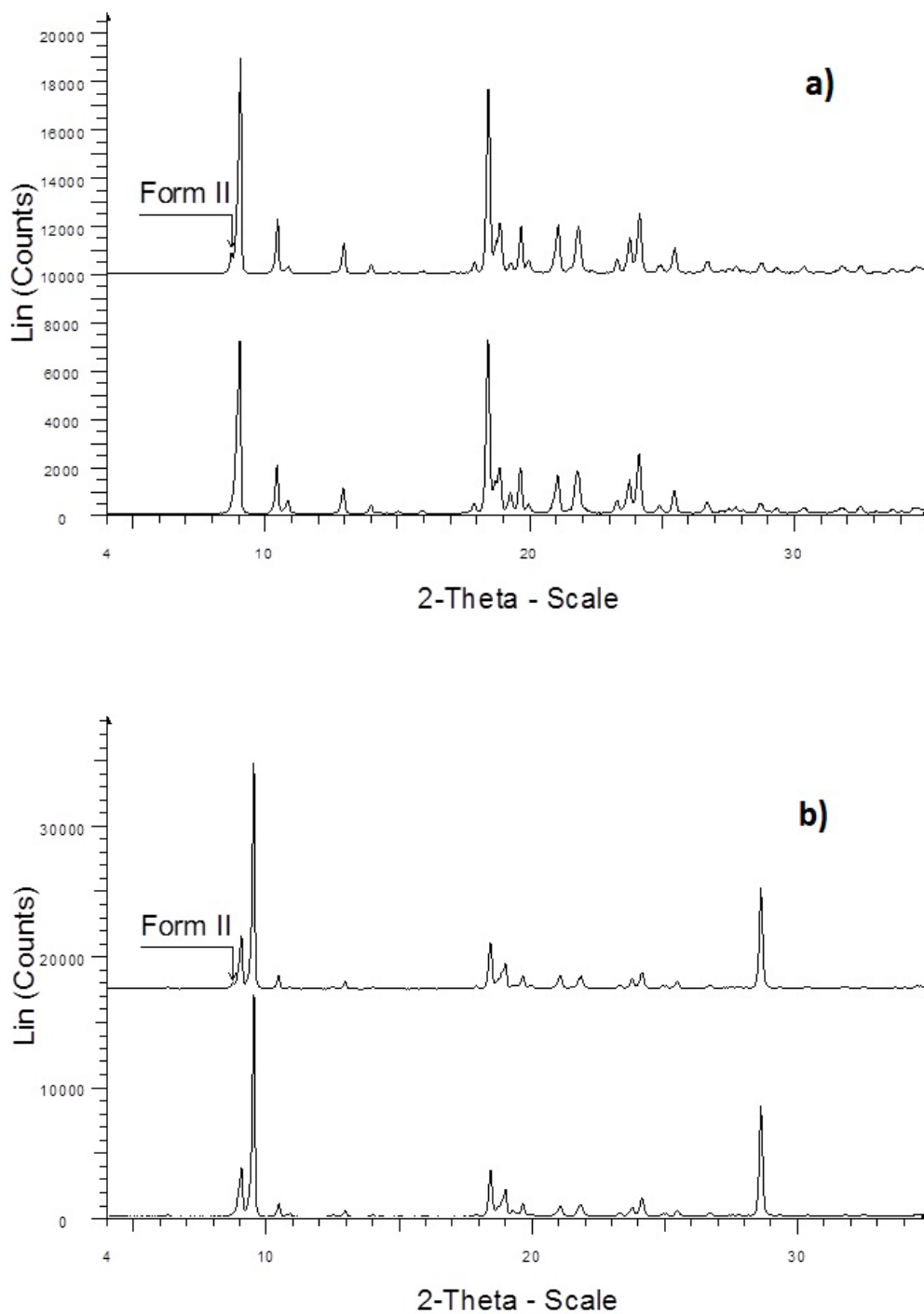
Slika 20. DSC krive smeše olanzapina i talka: 50°C/75% RH (5A), 50°C (5B) i referentni uzorak (5C)

4.1.2.2. Ispitivanje fizičke kompatibilnosti primenom XRPD

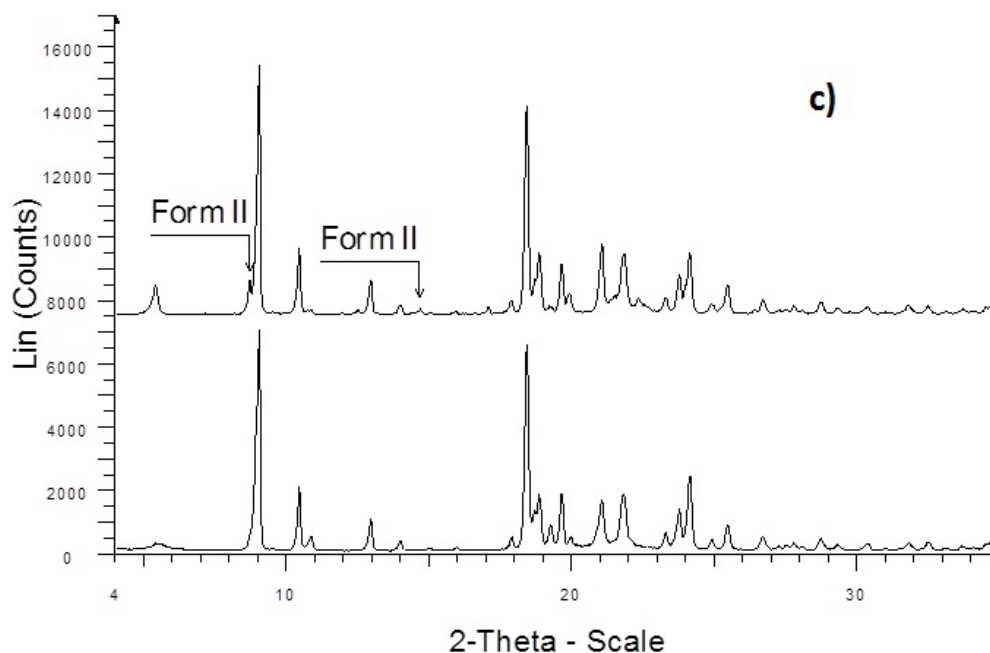
Kako bi se utvrdilo eventualno postojanje veze između hemijske degradacije i eventualne promene polimorfnog oblika olanzapina, uzorci smeša olanzapina i pomoćnih supstanci, kao i same pomoćne supstance, analizirani su XRPD metodom.

Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da se promena polimorfnog oblika olanzapina iz forme I u formu II u nivou 5%, pod uticajem povišene temperature i relativne vlage, beleži kod uzorka čistog olanzapina i smeša olanzapina sa talkom i magnezijum stearatom (Slika 21). U smešama olanzapina sa ostalim pomoćnim supstancama promene nisu detektovane. U smeši olanzapina i magnezijum stearata promena polimorfnog oblika zabeležena je i pod uticajem temperature, a bez uticaja vlage (Tabela 8). Trenutno nije moguće objasniti uzroke koji dovode do promene polimorfnog oblika olanzapina pod uticajem ove dve pomoćne supstance, kao i razloge za odsustvo promene u prisustvu ostalih ekscipijenasa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ova promena ne može da se poveže sa porastom degradacionih proizvoda. Naime, u smeši olanzapina i talka, gde dolazi do promene polimorfa I u polimorf II, ne dolazi do porasta nečistoće III (Tabele 8 i 6). Potvrdu ove činjenice nalazimo u i rezultatima smeše sa mikrokristalnom

celulozom, gde ne dolazi do promene polimorfnog oblika, ali se beleži porast vrednosti nečistoće III (Tabele 8 i 6).



Slika 21. Rezultati difrakcije x-zraka iz praha a) olanzapina, b) smeše olanzapina i talka i c) smeše olanzapina i magnezijum stearata



Slika 21. nastavak Rezultati difrakcije x-zraka iz praha a) olanzapina, b) smeše olanzapina i talka i c) smeše olanzapina i magnezijum stearata

Tabela 8. Prisustvo polimorfnog oblika II u smešama olanzapina i pomoćnih supstanci

Oznaka uzorka	Uslovi kondicioniranja	
	50°C, 28 dana	50°C/75% RH, 28 dana
1	x	✓
2	x	x
3	x	x
4	x	x
5	x	✓
6	✓	✓

4.1.3. Studije stabilnosti olanzapin film tableta

4.1.3.1. Studije preliminarne stabilnosti

Studija preliminarne stabilnosti olanzapin film tableta sprovedena je na uzorcima dve formulacije, sa laktozom anhidrovanom tip I i laktozom monohidrat tip IV. Rezultati stres ispitivanja, na 50°C i 50°C/75% RH posle 28 dana nisu pokazali promene u vrednostima nečistoća II, VI, VII i VIII, u poređenju sa inicijalnim rezultatima. Međutim, pri oba nevedena uslova zabeležen je porast nečistoće III (Tabela 9).

Tabela 9. Rezultati nečistoća (%) u olanzapin film tabletama pri stres uslovima

Uslovi kondicioniranja	Neč. II	Neč. III	Neč. VI	Neč. VII	Neč. VIII	Ukupno
Inicijalno, LA tip I	<0,05±0,01	0,06±0,01	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,06±0,01
Inicijalno, LM tip IV	<0,05±0,01	0,05±0,01	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,05±0,01
14 dana						
50°C, LA tip I	<0,05±0,01	0,20±0,02	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,20±0,02
50°C, LM tip IV	<0,05±0,01	0,10±0,01	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,10±0,01
50°C/75% RH, LA tip I	0,05±0,01	0,42±0,04	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,47±0,05
50°C/75% RH, LM tip IV	0,05±0,01	0,38±0,03	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,43±0,04
28 dana						
50°C, LA tip I	<0,05±0,01	0,34±0,03	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,34±0,03
50°C, LM tip IV	<0,05±0,01	0,16±0,01	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,16±0,01
50°C/75% RH, LA tip I	<0,05±0,01	0,62±0,06	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,62±0,06
50°C/75% RH, LM tip IV	<0,05±0,01	0,59±0,05	n.d.	<0,05±0,01	n.d.	0,59±0,05

Napomena: n.d.=nije detektovano

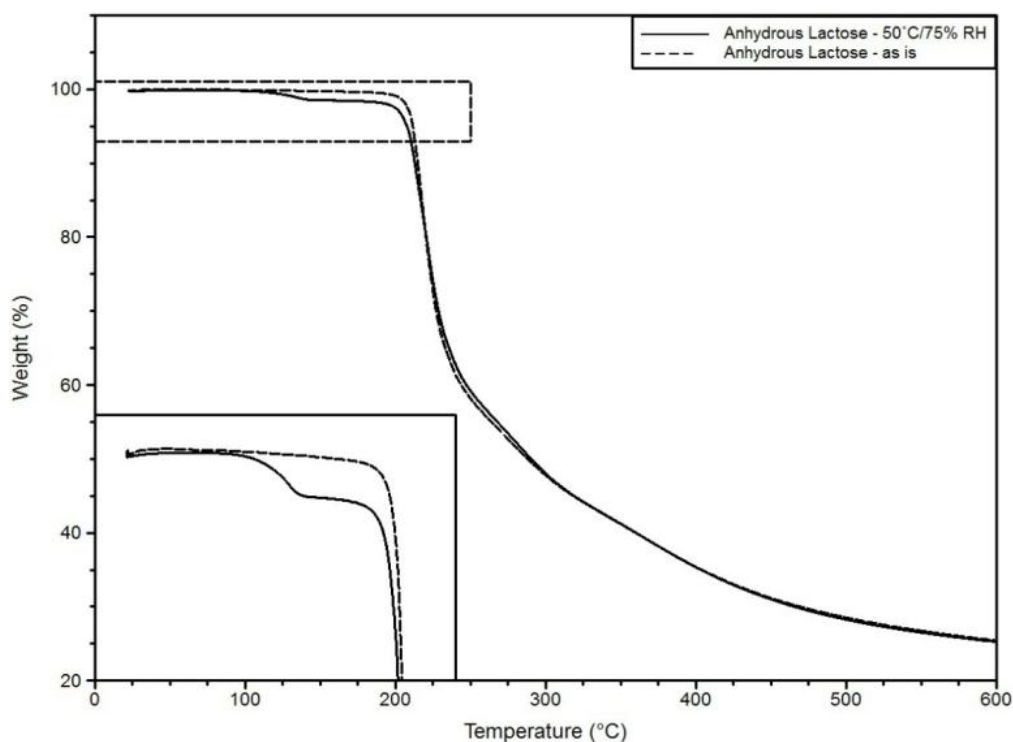
Porast nečistoće III u studiji preliminarne stabilnosti generalno prati pravilnosti uočene tokom studije kompatibilnosti. Naime, porast je izraženiji kod formulacije sa laktozom anhidrovanom tip I u poređenju sa laktozom monohidrat tip IV, kao pri povišenim uslovima temperature i relativne vlage. Međutim, suprotno očekivanjima, gotovo identičan porast ove nečistoće kod ovih formulacija dobijen je kod uzoraka koji su izloženi uslovima 50°C/75% RH. Ovakvi rezultati tumače se činjenicom da je u kompleksnim smešama, tipa tabletnih matriksa, prisutan veći broj pomoćnih supstanci, pa se mora uzeti u obzir činjenica da svaka od pomoćnih supstanci može da doprinese procesu adsorpcije vode i utiče na degradaciju aktivne supstance. Prethodna termoanalitička ispitivanja kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci pokazala su da olanzapin interaguje sa laktozom anhidrovanom, magnezijum stearatom i povidonom [180]. Međutim, značaj ovih rezultata nije veliki s obzirom da se povišena temperatura primenjena u tim eksperimentima nikada ne primenjuje tokom proizvodnje čvrstih farmaceutskih oblika.

Sa ciljem da se utvrdi priroda i sadržaj vode u ovim uzorcima i njen uticaj na rezultate preliminarne stabilnosti, urađene su XRPD i TGA analize pomoćnih supstanci. Laktoza monohidrat nije pokazala sposobnost da upija vodu tokom izlaganja visokim vrednostima relativne vlage, dok su rezultati XRPD analize (Slika 22) uzorka laktoze anhidrovane nakon njenog izlaganja uslovima 50°C/75% RH nedvosmisleno pokazali prisustvo laktoze monohidrat. Tačnije, pri uslovima povišene temperature i vlage došlo je do

hidratacije anhidrovane laktoze (Slika 22a i b). Ovo su potvrdili i rezultati TGA prikazani u Tabeli 10.

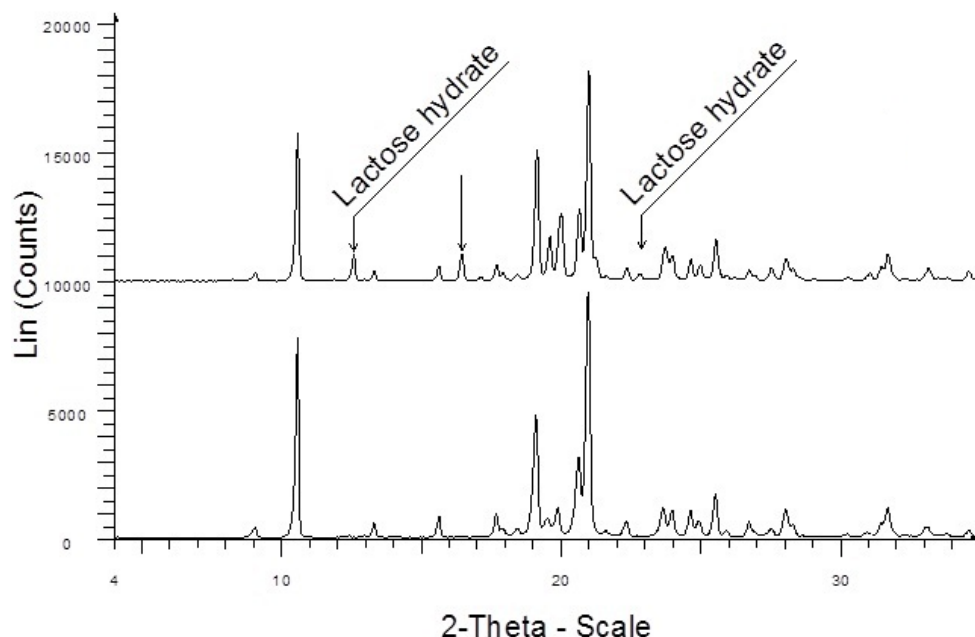
Tokom procesa prelaska u mohohidrat, laktoza anhidrovana podleže konformacionim promenama, a prelazno stanje koje ima visok sadržaj energije odgovorno je za interakciju sa olanzapinom, jer doprinosi približavanju molekula olanzapina i vode, što posledično dovodi do njegove degradacije. Pri visokim vrednostima temperature i relativne vlage povećava se pokretljivost molekula vode, što olakšava proces apsorpcije laktoze anhidrovane [181] i utiče na hemijsku stabilnost tableta. Dodatno, nečistoća III može da nastane od nečistoće VI koja može da zaostane tokom procesa sinteze olanzapina, a usled baznih reakcionih uslova [136]. Međutim, kako u našim eksperimentima, u uzorcima čistog olanzapina, nečistoća VI nije detektovana, moguće objašnjenje za nastanak nečistoće III je nestabilnost amidinske grupe olanzapina u uslovima povišene temperature i relativne vlažnosti, koja uslovljava hidrolitičku degradaciju olanzapina i nastajanje laktama [182].

a)



Slika 22. a) TGA rezultati anhidrovane laktoze, inicijalno (isprekidana linija) i nakon izlaganja 50°C/75% RH, 28 dana (puna linija) b) XRPD rezultati smeše olanzapina i anhidrovane laktoze, inicijalno (dole) i nakon izlaganja 50°C/75% RH, 28 dana (gore)

b)



Slika 22. nastavak a) TGA rezultati anhidrovane laktoze, inicijalno (isprekidana linija) i nakon izlaganja 50°C/75% RH, 28 dana (puna linija) b) XRPD rezultati smeše olanzapina i anhidrovane laktoze, inicijalno (dole) i nakon izlaganja 50°C/75% RH, 28 dana (gore)

Tabela 10. Sadržaj vode u uzorcima laktoze, TGA

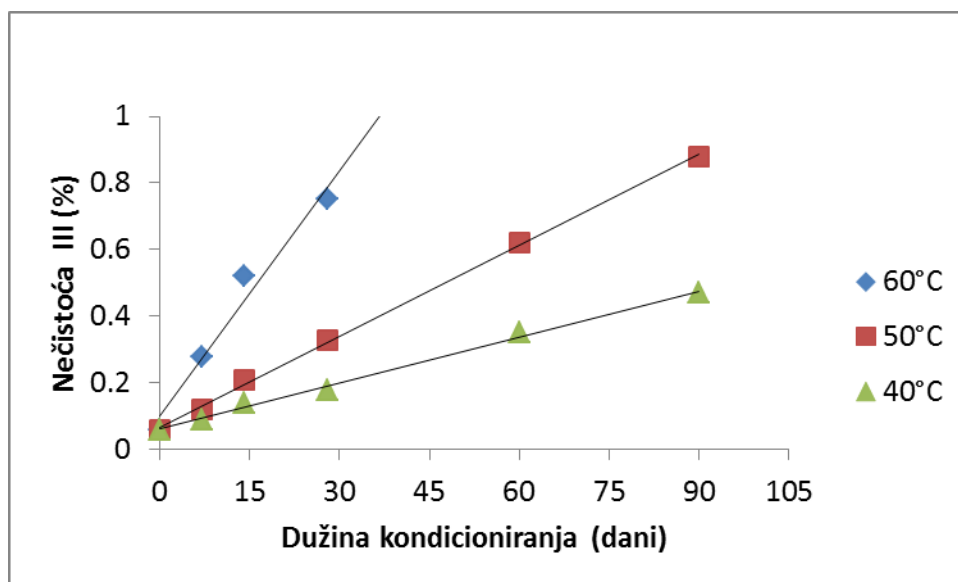
Oznaka uzorka	% (25-110°C)	% (110-180°C)
LA tip I (inicijalno)	0,24±0,02	0
LA tip I (50°C/75% RH)	0,51±0,04	3,82±0,04
LM tip IV (inicijalno)	0,39±0,03	4,45±0,05
LM tip IV (50°C/75% RH)	0,23±0,03	4,62±0,05

Studije preliminarne stabilnosti olanzapin film tableta pokazale su da tabletama treba obezbediti zaštitu od vlage. Iz tog razloga je kao kontaktna ambalaža za ovaj proizvod odabran OPA/Al/PVC//Al blister (propustljivost za vodenu paru <math><0,0005 \text{ g mm/m}^2\text{ dan}</math> na 38°C i 90% RH [183]), a formulacija sa laktozom anhidrovanom tip I je odabrana za dalji razvoj.

Međutim, kako nastanak nečistoće III zavisi i od temperature, neophodno je bilo proceniti i uticaj ovog faktora na stabilnost proizvoda. Nečistoća III je kritičan parametar stabilnosti olanzapin film tableta, koji ograničava njegov rok upotrebe, tako da je tokom ispitivanja praćen proces njenog nastanka. Korišćenjem Arenijusovog kinetičkog modela

[35] rezultati dobijeni pri višim temperaturama su korišćeni za predviđanje hemijske stabilnosti olanzapin film tableta pri dugotrajnim uslovima (25°C/60% RH).

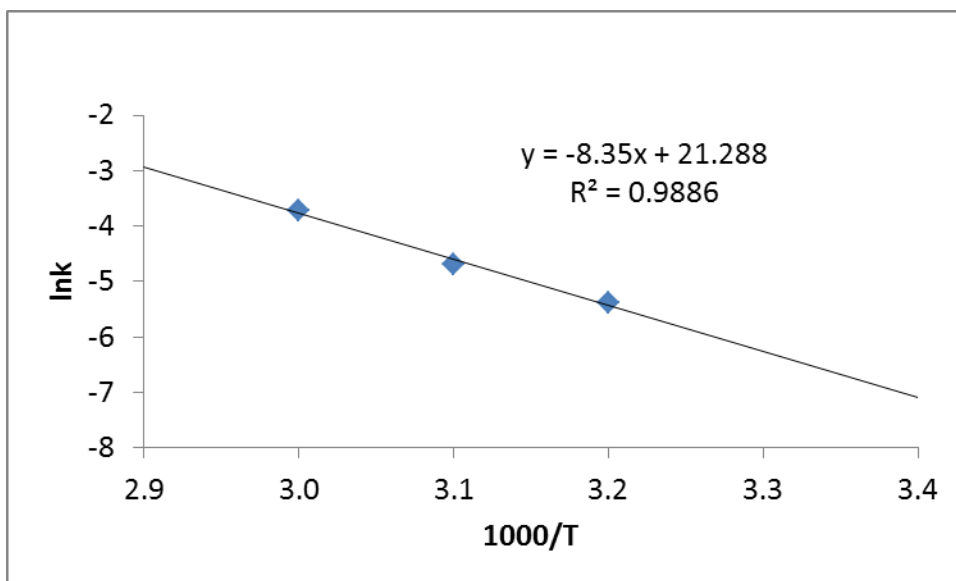
Olanzapin film tablete kondicionirane su pod stres uslovima, na temperaturama 40°C, 50°C i 60°C, a uzorci su analizirani u triplikatu. Porast nečistoće III u funkciji vremena prikazan je na Slici 23.



Slika 23. Brzina nastajanja nečistoće III u funkciji temperature

Analizom porasta nečistoće III na različitim temperaturama u funkciji vremena, zaključeno je da se međusobna zavisnost ovih parametara može opisati primenom linearne regresije, odnosno da je reakcija kojom nastaje nečistoća III reakcija nultog reda. Izneti zaključci su u skladu sa hipotezom prema kojoj se sve reakcije degradacije, odnosno nastajanja nečistoća iz aktivnih supstanci, zbog malog udela konverzije, mogu smatrati reakcijama nultog reda [35].

Izračunate vrednosti konstante brzine reakcije (k) na temperaturama 40, 50 i 60°C iznose 0,0005% d⁻¹, 0,009% d⁻¹ i 0,024% d⁻¹, a odgovarajući koeficijenti korelacije (r^2) 0,996, 0,999 i 0,967. Dobijene vrednosti pokazuju da se sa porastom temperature brzina degradacije povećava. Grafičkim prikazom prirodnog logaritma konstanti brzina reakcije u opsegu temperatura 40-60°C u funkciji 1000/T, gde je T temperatura u K, dobija se prava linija ($r^2 = 0,989$), kako je prikazano na Slici 24.



Slika 24. Grafički prikaz Arenijusovog modela

Jednačina koja odgovara Arenijusovom kinetičkom modelu glasi:

$$\ln k = -8.35 \times \frac{1000}{T} + 21.29 \quad (23.)$$

Primenom ove jednačine izračunati su energija aktivacije, E_a i brzina porasta nečistoće III pri dugotrajnim uslovima (na 25°C), k . Energija aktivacije, E_a , izračunata je iz nagiba prave linije koja pokazuje porast nečistoće III i iznosi 16,59 kcal mol⁻¹. Ova vrednost odgovara standardnim vrednostima E_a koje se kreću u opsegu 10-30 kcal mol⁻¹. Očekivana brzina nastajanja degradacionog proizvoda pri dugotrajnim uslovima (na 25°C), dobijena primenom jednačine 23. je $k = 0,00125\% \text{ d}^{-1}$, ($\ln k = -6,68$) ili $k = 0,037\% \text{ m}^{-1}$.

Na osnovu ovih parametara, primenom Arenijusove jednačine 24. moguće je predvideti rok upotrebe olanzapin film tableta. U ovoj jednačini D predstavlja maksimalno dozvoljenu koncentraciju degradacionog proizvoda (engl. shelf-life specification) koji ograničava rok upotrebe, D_0 inicijalnu koncentraciju degradacionog proizvoda, a T apsolutnu vrednost temperature čuvanja proizvoda; A je konstanta proporcionalnosti, tzv. „A-faktor“, R univerzalna gasna konstanta (1,987 calK⁻¹mol⁻¹ ili 8,341 JK⁻¹mol⁻¹), a E_a energija aktivacije.

$$shelf - life = \frac{(D - D_0)}{A} e^{\frac{Ea}{RT}} \quad (24.)$$

Na osnovu jednačine 24. izračunat je rok upotrebe (engl. *shelf-life*) olanzapin film tableta od 12 meseci koji predstavlja vreme potrebno da se dostigne maksimalno dozvoljena koncentracija nečistoće III (0,5%). Prema odgovarajućim ICH smernicama [37, 38] dozvoljena količina svake nečistoće zavisi od maksimalne dnevne doze leka i njegove toksičnosti. Da bi se izračunala dozvoljena količina neke nečistoće, neophodno je da se najpre odrede prag za identifikaciju (engl. *Identification Threshold*, IT) i prag za kvalifikaciju (engl. *Qualification Threshold*, QT). U slučaju olanzapin film tableta IT vrednost je 0,2%, a QT 0,5%.

4.1.3.2. Studije stabilnosti proizvodnih serija

Studija stabilnosti za potrebe registracije proizvoda sprovedena je u skladu sa smernicama Internacionalne konferencije za harmonizaciju (ICH) na dve proizvodne serije olanzapin film tableta upakovane u OPA/Al/PE//Al blistere. Uzorci su kondicionirani pod ubrzanim, intermedijernim i dugotrajnim uslovima u trajanju od 6, 12 i 36 meseci (Tabela 11). Analizirani su fizički, hemijski i mikrobiološki parametri i to: izgled, raspadljivost, čvrstina, brzina rastvaranja lekovite supstance, sadržaj olanzapina, sadržaj degradacionih proizvoda i mikrobiološka čistoća. Primenjene su validirane analitičke procedure. Rezultati sadržaja olanzapina i nečistoće III posle 36 meseci kondicioniranja prikazani su u Tabeli 12. i 13. Svi raspoloživi rezultati posle 36 meseci kondicioniranja nalaze se u Prilogu A (Tabele 31-36).

Tabela 11. Protokol studije stabilnosti proizvodnih serija

Uslovi kondicioniranja	Vreme kondicioniranja (meseci)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
40°C/75% RH		x	x					
30°C/65% RH		x	x	x	x			
25°C/60% RH	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabela 12. Rezultati sadržaja olanzapina iz studije stabilnosti proizvodnih serija

Uslovi kondicioniranja i serije	Dužina kondicioniranja (meseći)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
40°C/75% RH								
L ₁ – 3047/01	100,8 %	99,4%	97,0%					
L ₁ – 3047/02	100,2 %	99,2%	98,6%					
30°C/65% RH								
L ₁ – 3047/01	100,8 %	98,4%	99,4%	97,8%	97,8%			
L ₁ – 3047/02	100,2 %	99,8%	100,2%	96,8%	99,8%			
25°C/60% RH								
L ₁ – 3047/01	100,8 %	98,2%	99,0%	98,8%	98,6%	97,4%	96,8%	95,8%
L ₁ – 3047/02	100,2 %	100,0%	100,6%	99,8%	101,4%	99,2%	97,8%	97,8%

Napomena: Kriterijum prihvatljivosti: 95-105% od deklarisanog sadržaja

Tabela 13. Rezultati sadržaja nečistoće III iz studije stabilnosti proizvodnih serija

Uslovi kondicioniranja i serije	Dužina kondicioniranja (meseći)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
40°C/75% RH								
L ₁ – 3047/01	0,01%	0,41%	0,81%					
L ₁ – 3047/02	0,01%	0,40%	0,75%					
30°C/65% RH								
L ₁ – 3047/01	0,01%	0,11%	0,20%	0,30%	0,41%			
L ₁ – 3047/02	0,01%	0,11%	0,19%	0,28%	0,43%			
25°C/60% RH								
L ₁ – 3047/01	0,01%	0,06%	0,09%	0,14%	0,20%	0,28%	0,40%	0,48%
L ₁ – 3047/02	0,01%	0,06%	0,14%	0,14%	0,20%	0,27%	0,38%	0,46%

Napomena: Kriterijum prihvatljivosti: ne više od 0,5%

Rezultati ispitivanja pokazuju da tokom kondicioniranja ne dolazi do značajne promene izgleda i fizičkih karakteristika tableta. Nisu zabeležene promene u brzini rastvaranja lekovite supstance tokom 6 meseci pri ubrzanim, 12 meseci pri intermedijernim i 36 meseci pri dugotrajnim uslovima ispitivanja. Svi dobijeni rezultati su u skladu sa definisanim limitom.

Pri svim ispitivanim uslovima beleži se pad sadržaja olanzapina, manji od dozvoljenih 5% u odnosu na inicijalnu vrednost.

Rezultati ICH stabilnosti potvrdili su činjenicu da je porast nečistoće III proporcionalan sa uslovima ispitivanja i da predstavlja kritičan parametar stabilnosti olanzapin film tableta. Pri ubrzanim uslovima porast je značajan i prelazi dozvoljen limit od 0,5%. Ovakvi rezultati su očekivani i u skladu sa predviđanjima izvršenim na osnovu rezultata stres ispitivanja. Međutim, dobijene vrednosti su nešto niže od vrednosti tokom preliminarnih ispitivanja, što se može pripisati boljoj kontroli procesa tokom faze proporcionalnog uvećanja šarže (engl. *scale-up*). Posledično, porast nečistoće III pri intermedijernim i dugotrajnim uslovima je nešto niži od porasta koji je pretpostavljen na osnovu predviđanja, usled čega je niža i konstanta brzine reakcije, k na 25°C. Prava vrednost k , dobijena na osnovu rezultata dugotrajnog ispitivanja iznosi 0,016% m⁻¹. Na osnovu prethodno publikovanih podataka [2] postoji mogućnost da reakcije oksidacije u čvrstim farmaceutskim oblicima odstupaju od Arenijusovog kinetičkog modela, usled čega ponašanje proizvođača na povišenoj temperaturi ne odražava u potpunosti njegovo ponašanje pri nižim temperaturama. Takođe, u slučaju olanzapina film tableta do ovog odstupanja dolazi usled kompleksnog mehanizma procesa oksidacije ove supstance i činjenice da se na povišenoj temperaturi reakcija odvija veoma brzo, dok je ova reakcija na dugotrajnim uslovima značajno sporija.

4.2. Aripiprazol

4.2.1. Studija kompatibilnosti aripiprazola i pomoćnih supstanci formulacije tableta

Rezultati studije kompatibilnosti pokazali su da tokom 28 dana kondicioniranja pod ispitivanim uslovima ne dolazi do značajnog porasta nečistoća VIII (Dehidro aripiprazol) i IX (N-oksid aripiprazol) u većini smeša aripiprazola sa pomoćnim supstancama, u poređenju sa čistim aripiprazolom (uzorak 1). Izuzetak je smeša aripiprazola i sredstva za korekciju ukusa II (uzorak 11) gde je pri uslovima povišene temperature i vlage, zabeležena visoka vrednost nečistoće IX. Dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 14.

Tabela 14. Sadržaj nečistoća VIII i IX (%) u smešama aripiprazola i pomoćnih supstanci

Oznaka uzorka	60°C/75% RH, 28 dana	
	Nečistoća VIII	Nečistoća IX
1	0,05 ± 0,01	n.d.
2	0,05 ± 0,01	n.d.
3	0,05 ± 0,01	n.d.
4	0,05 ± 0,01	n.d.
5	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,02
6	0,03 ± 0,01	n.d.
7	0,07 ± 0,01	n.d.
8	0,03 ± 0,01	n.d.
9	0,05 ± 0,01	n.d.
10	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,02
11	0,08 ± 0,01	1,70 ± 0,05
12	0,04 ± 0,01	n.d.
13	0,05 ± 0,01	n.d.

Napomena: Uzorci sa uslova 60°C nisu analizirani.

S obzirom da je sredstvo za korekciju ukusa II bila alternativna pomoćna supstanca, na osnovu dobijenih rezultata studije kompatibilnosti odlučeno je da se naredna ispitivanja rade na formulaciji koja sadrži sredstvo za korekciju ukusa I (uzorak 10).

4.2.2. Karakterizacija aripiprazola i njegovih nečistoća

Aripiprazol je gotovo nerastvorljiv u vodi i pokazuje pH zavisnu rastvorljivost. Zahvaljujući svojoj hidrofobnosti, prolazi krvno-moždanu barijeru, što je bitan preduslov za njegovo terapijsko delovanje. Aripiprazol je baznog karaktera i sadrži piperazinski prsten. Na hromatografsko razdvajanje aripiprazola i njegovih nečistoća I-IX (zadržavanje u koloni i eluiranje) u najvećoj meri utiču kiselinško/bazni karakter,

lipofilnost i molekulska masa (Tabela 15). Navedeni parametri dobijeni su primenom programa ChemAxon MarvinSketch 5.5.1.0, Budimpešta, Mađarska, 2011, www.chemaxon.com/products.html.

Tabela 15. Molekulski parametri aripiprazola i njegovih nečistoća

Jedinjenje	logD pH 3,0	Dominantni oblik pri pH 3,0	Mw	pK _a /pK _b
Nečistoća I	-0.49	katjon	232.133	8.85 (pK _b)
Nečistoća II	-0.62	katjon	286.225	N/A
Nečistoća III	2.60	molekul	253.730	13.20 (pK _a)
Nečistoća IV	2.79	molekul	298.181	13.20 (pK _a)
Nečistoća V	1.21	molekul	163.177	9.20 (pK _a)
Nečistoća VI	3.12	molekul	380.446	13.10 (pK _a)
Nečistoća VII	3.07	katjon	666.671	7.45 (pK _b)
Nečistoća VIII	1.53	katjon	447.386	7.45 (pK _b)
Nečistoća IX	3.77	molekul	438.187	2.25 (pK _b)
Aripiprazol	1.45	katjon	449.402	7.45 (pK _b)

Na osnovu strukturnih karakteristika aripiprazola, posmatrane srodne supstance, odnosno nečistoće I-IX, se mogu grupisati u one sa baznim (I, II, VII, VIII i IX) i kiselim (III, IV, V i VI) osobinama. Usled različitih pK_a/pK_b vrednosti aripiprazola i njegovih nečistoća pri kiselim pH vrednostima postoje različiti dominantni oblici: katjoni, za aripiprazol, nečistoće I, II, VII, VIII i IX, odnosno molekuli za nečistoće III, IV, V i VI. Takođe, jedinjenja koja imaju izraženiji lipofilni karakter (logD>2,5: III, IV, VI, VII i IX) duže se zadržavaju u koloni od nečistoća koje imaju manje izražena lipofilna svojstva (logD<2,5: I, II, V, VIII). Sve nečistoće aripiprazola imaju molekulska masa u opsegu 230-450, osim nečistoća V i VII.

4.2.3. Optimizacija hromatografskih uslova za analizu nečistoća aripiprazola

Poznavanje fizičko-hemijskih karakteristika ispitivanih jedinjenja je od presudnog značaja za predviđanje njihovog hromatografskog ponašanja. Tokom preliminarnih ispitivanja razdvajanja aripiprazola i njegovih nečistoća I-IX analiziran je uticaj acetonitrila i metanola pri različitim vrednostima pH vodene faze. Uočeno je da metanol u mobilnoj fazi nije doveo do prihvatljivog razdvajanja ispitivane smeše. Takođe, dodatkom jon-par reagensa postignuto je razdvajanje i zadovoljavajuća rezolucija, a poboljšana je i simetrija pikova baznih jedinjenja. Najbolji rezultati dobijeni su korišćenjem natrijum pentan sulfonata (Na-PS).

Najbolje razdvajanje ispitivanih jedinjenja dobijeno je korišćenjem kolone Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) koja je odabrana za dalju optimizaciju eksperimentalnih uslova. Luna C18 se može koristiti u širokom opsegu pH vrednosti jer je gusto vezana – zaštićena (engl. *densely bonded end-capped*) kolona. Ima veliku slobodnu površinu, što utiče na zadržavanje hidrofobnih jedinjenja i poboljšava njihov oblik i simetriju. Dodatno, korišćenjem silikatnih kolona visokog stepena čistoće (engl. *high-purity silica*) za bazna jedinjenja se dobijanju značajno oštiri, pikovi visoke simetrije.

Na samom početku ispitivano je razdvajanje jedinjenja pri pH vrednostima preuzetim iz literature, odnosno od 2,5 do 5,5 [163-165, 168]. Mobilna faza je inicijalno pored vode sadržala i ortofosfornu kiselinu, radi korekcije pH vrednosti. Kako bi se poboljšala simetrija pika svih ispitivanih jedinjenja, analiziran je uticaj fosfatnog pufera, kao modifikatora jonske jačine, i Na-PS, kao jon-par reagensa. Optimalna rezolucija, vreme eluiranja i pikovi zadovoljavajućeg oblika dobijeni su korišćenjem KH₂PO₄ koncentracije 1,111g/l (0,008 mol/l), pri pH vrednosti 3,0 i koncentraciji Na-PS 1,2 g/l (0,0068 mol/l).

Kada je acetonitril korišćen kao organski modifikator u mobilnoj fazi postignuta je visoka rezolucija uz kraće vreme eluiranja u poređenju sa metanolom. Imajući ovo u vidu, acetonitril je odabran kao komponenta mobilne faze. Usled sličnih molekulskih svojstava kritičnih parova (Nečistoća VIII – aripiprazol i aripiprazol – Nečistoća IX) korišćeno je gradijentno eluiranje, tačnije kombinacija gradijentnog i izokratskog eluiranja. Za dobijanje prihvatljivog razdvajanja isprobani su različiti eksperimentalni uslovi, tj. procentni udeo acetonitrila u funkciji vremena. Najbolji rezultati dobijeni su korišćenjem sledećeg programa: t (min)/%B: 0 min/28%, 10 min/30%, 40 min/40%, 50 min/63%, 60 min/63%, 61 min/28%.

Na osnovu literaturnih podataka aripiprazol i njegove nečistoće su detektovani na talasnim dužinama 217-283 nm. U ovoj studiji korišćena je talasna dužina 215 nm, s obzirom da ne dolazi do interferencije sa pomoćnim supstancama formulacije tableta.

Tokom preliminarnih ispitivanja analiziran je i uticaj temperature na hromatografsko razdvajanje. Sa porastom temperature smanjeno je zadržavanje ispitivanih jedinjenja na koloni, ali je zbog dužeg korišćenja kolone, odabrana temperatura od 25°C (sobna temperatura).

Ovim preliminarnim eksperimentalnim ispitivanjima odabrani su faktori koji će biti korišćeni za modelovanje hromatografskog ponašanja aripiprazola i njegovih nečistoća. Odabrani faktori su: temperatura kolone od 20-30°C; pH vrednost vodene faze od 2,5 do 3,5; koncentracija kalijum-dihidrogenfosfata u vodenoj fazi od 0,555 do 1,665 g/l i koncentracija natrijum-pentansulfonata u vodenoj fazi 0,6 do 1,8 g/l. Za modelovanje hromatografskog ponašanja i optimizaciju RP–HPLC metode korišćen je eksperimentalni dizajn.

4.2.3.1. Eksperimentalni dizajn u modelovanju HPLC sistema

Za optimizaciju retencionog ponašanja aripiprazola i njegovih nečistoća primenom eksperimentalnog dizajna, kao optimalan, izabran je centralni kompozitni dizajn (engl. *Central Composite Face-Centered Design*, CCF). CCF predstavlja opšteprihvaćen metod za razvoj HPLC metode [67, 184]. Na ovaj način ispitana su četiri faktora (temperatura kolone, pH vrednost vodene faze, koncentracija kalijum-dihidrogenfosfata i koncentracija natrijum-pentansulfonata) na dva nivoa, a ukupan broj izvedenih eksperimenata bio je 25. Mobilne faze pripremljene su prema matrici eksperimenta prikazanoj u Tabeli 16.

Kao eksperimentalno dobijeni odgovori sistema praćeni su retenciono vreme (t_r), broj teoretskih podova (N), retencioni faktor (k), asimetrija pika (A_s) i rezolucija (R_s). Parovi pikova sa prosečnom rezolucijom manjom od 5 i minimalnom rezolucijom 4 odabrani su kao kritični parovi. Cilj optimizacije bio je da se pronađu uslovi za maksimalnu rezoluciju kritičnih parova (R_s 4/5 između nečistoće VIII i aripiprazola; R_s 5/6 između aripiprazola i nečistoće IX; R_s 9/10 između nečistoća VII i IV).

Tabela 16. Matrica eksperimenata za centralni kompozitni dizajn

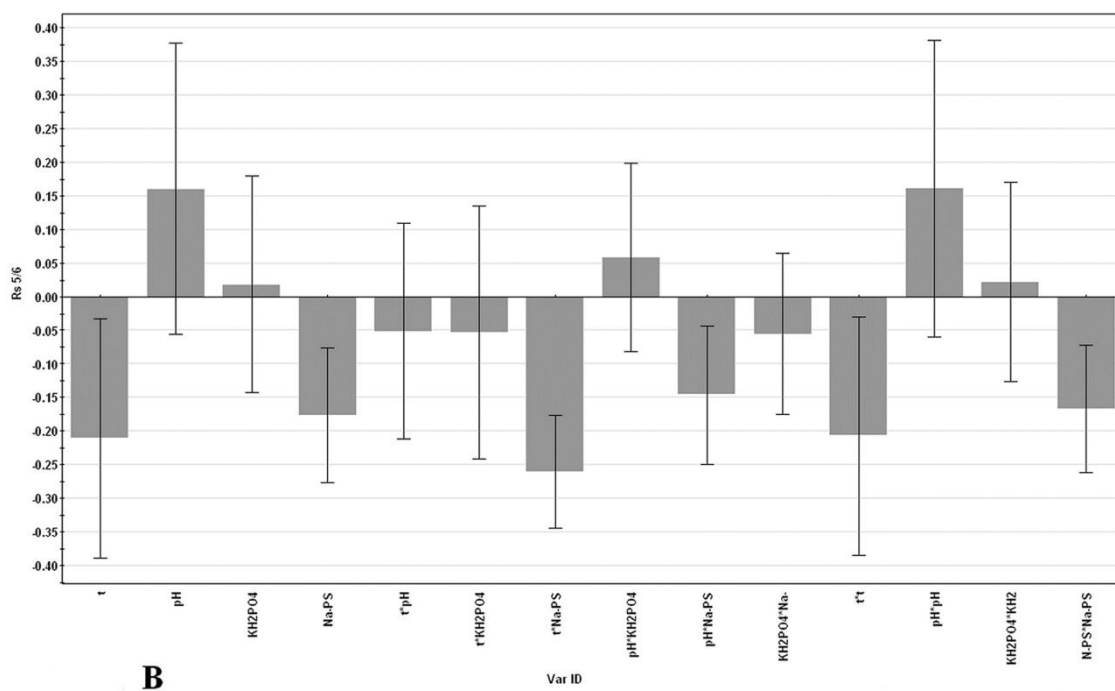
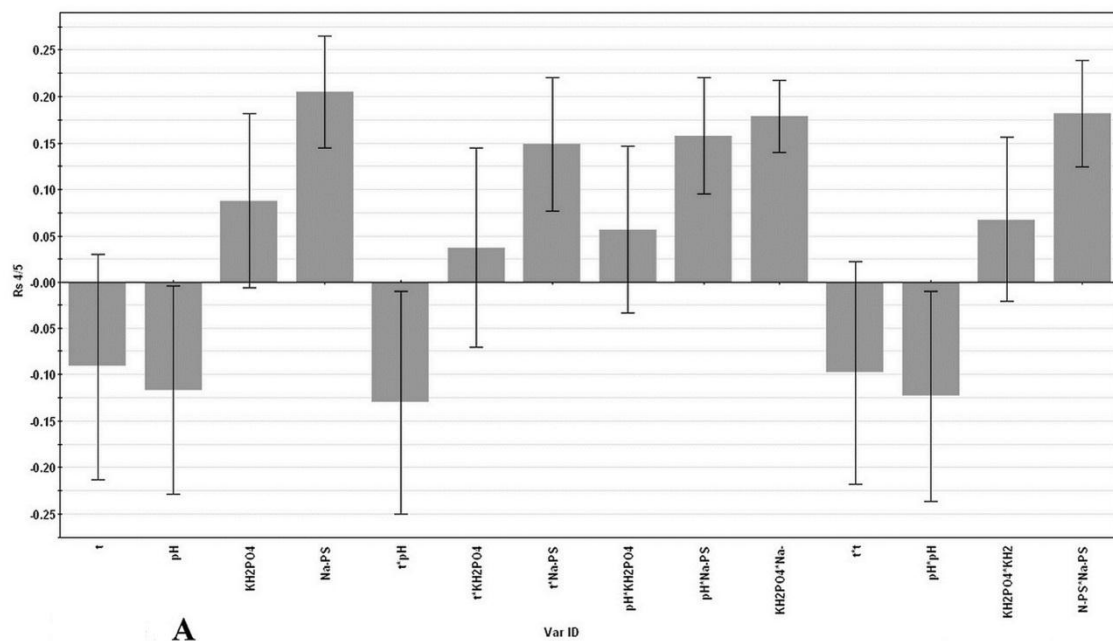
Broj eksperimenta	Eksperimentalni faktori			
	T	pH	KH ₂ PO ₄	Na-PS
1	20 (-1)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,2 (0)
2	25 (0)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,2 (0)
3	30 (+1)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,2 (0)
4	25 (0)	2.5 (-1)	1,110 (0)	1,2 (0)
5	25 (0)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,2 (0)
6	25 (0)	3.5 (+1)	1,110 (0)	1,2 (0)
7	25 (0)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,2 (0)
8	25 (0)	3.0 (0)	0,555 (-1)	1,2 (0)
9	25 (0)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,2 (0)
10	25 (0)	3.0 (0)	1,665 (+1)	1,2 (0)
11	25 (0)	3.0 (0)	1,110 (0)	0,6 (-1)
12	25 (0)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,2 (0)
13	25 (0)	3.0 (0)	1,110 (0)	1,8 (+1)
14	20 (-1)	2.5 (-1)	0,555 (-1)	0,6 (-1)
15	20 (-1)	3.5 (+1)	0,555 (-1)	0,6 (-1)
16	20 (-1)	2.5 (-1)	0,555 (-1)	1,8 (+1)
17	30 (+1)	3.5 (+1)	0,555 (-1)	0,6 (-1)
18	30 (+1)	2.5 (-1)	0,555 (-1)	1,8 (+1)
19	30 (+1)	3.5 (+1)	0,555 (-1)	1,8 (+1)
20	20 (-1)	2.5 (-1)	1,665 (+1)	0,6 (-1)
21	20 (-1)	2.5 (-1)	1,665 (+1)	1,8 (+1)
22	20 (-1)	3.5 (+1)	1,665 (+1)	1,8 (+1)
23	30 (+1)	2.5 (-1)	1,665 (+1)	0,6 (-1)
24	30 (+1)	3.5 (+1)	1,665 (+1)	0,6 (-1)
25	30 (+1)	3.5 (+1)	1,665 (+1)	1,8 (+1)

Rezolucije kritičnih parova (Y promenljive: R_s 4/5, R_s 5/6 i R_s 9/10) dobijene pod različitim eksperimentalnim uslovima (X promenljive: t, pH, koncentracija KH₂PO₄, koncentracija Na-PS, t x pH, t x koncentracija KH₂PO₄, t x koncentracija Na-PS, pH x koncentracija KH₂PO₄, pH x koncentracija Na-PS, koncentracija KH₂PO₄ x koncentracija Na-PS, t x t, pH x pH, koncentracija KH₂PO₄ x koncentracija KH₂PO₄, koncentracija Na-PS x koncentracija Na-PS) korišćene su za razvoj tri PLS modela (R_s 4/5, R_s 5/6 i R_s 9/10), kako je prikazano u Tabeli 17.

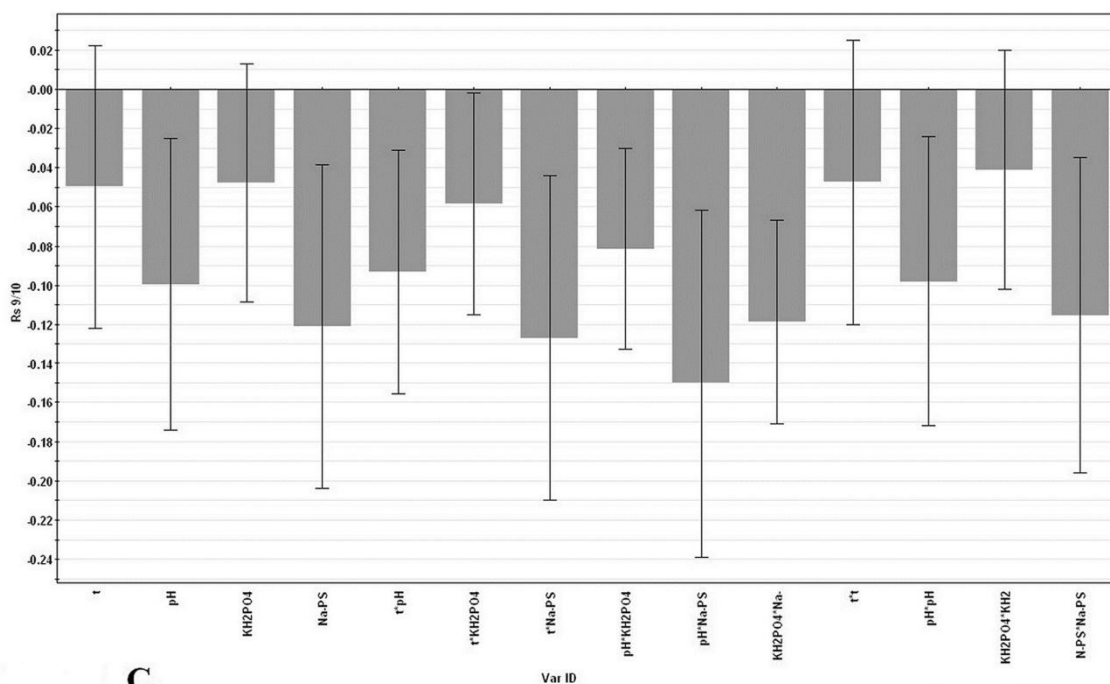
Tabela 17. Preliminarni rezultati optimizacije HPLC metode za analizu aripiprazola i njegovih nečistoća

Exp No	t	pH	KH ₂ PO ₄	Na-PS	Rs 4/5	Pred Rs 4/5	Rs 5/6	Pred Rs 5/6	Rs 9/10	Pred Rs 9/10
1	20	3	1.11	1.2	4.534	4.355	3.614	3.494	5.190	3.751
2	25	3	1.11	1.2	4.346	4.279	3.319	3.337	3.250	3.525
3	30	3	1.11	1.2	4.265	4.196	3.098	3.167	1.438	3.300
4	25	2.5	1.11	1.2	4.428	4.369	3.276	3.264	4.178	4.173
5	25	3	1.11	1.2	4.335	4.279	3.287	3.337	3.259	3.525
6	25	3.5	1.11	1.2	4.265	4.182	3.359	3.417	2.010	2.844
7	25	3	1.11	1.2	4.325	4.279	3.271	3.337	3.232	3.525
8	25	3	0.555	1.2	4.240	4.149	3.317	3.335	4.026	3.848
9	25	3	1.11	1.2	4.379	4.279	3.338	3.337	3.334	3.525
10	25	3	1.665	1.2	4.505	4.422	3.334	3.341	3.049	3.203
11	25	3	1.11	0.6	4.024	3.998	3.525	3.543	5.252	4.646
12	25	3	1.11	1.2	4.356	4.279	3.311	3.337	3.370	3.525
13	25	3	1.11	1.8	4.665	4.595	3.185	3.107	0.683	2.287
14	20	2.5	0.555	0.6	3.896	4.075	3.470	3.599	4.926	5.615
15	20	3.5	0.555	0.6	3.720	3.874	3.871	3.763	4.897	4.478
16	20	2.5	0.555	1.8	4.582	4.587	3.334	3.214	3.788	3.614
17	30	3.5	0.555	0.6	3.562	3.679	3.615	3.466	4.732	4.079
18	30	2.5	0.555	1.8	4.414	4.456	2.961	2.868	5.184	3.110
19	30	3.5	0.555	1.8	4.205	4.270	2.914	3.000	1.323	1.693
20	20	2.5	1.665	0.6	4.258	4.291	3.523	3.616	4.920	5.188
21	20	2.5	1.665	1.8	4.763	4.894	3.307	3.210	3.209	2.858
22	20	3.5	1.665	1.8	4.610	4.744	3.321	3.358	1.844	1.422
23	30	2.5	1.665	0.6	4.065	4.128	3.192	3.314	5.468	4.875
24	30	3.5	1.665	0.6	3.948	3.919	3.559	3.482	2.682	3.547
25	30	3.5	1.665	1.8	4.489	4.600	2.938	2.995	1.743	0.831
					Model Rs 4/5		Model Rs 5/6		Model Rs 9/10	
					R ²	0.889			0.862	0.631
					Q ²	0.801			0.642	0.563
					RMSEE	0.094			0.080	0.834
					r ² _{Obs/Pred}	0.943			0.928	0.795

Razvijen je Rs 4/5-PLS model sa najvećim R^2 (0,889), Q^2 (0,801) i najmanjim RMSEE (0,094). Formiran je Rs 5/6-PLS model sa najvećim R^2 (0,862), Q^2 (0,642) i najnižim RMSEE (0,080). Kreiran je Rs 9/10-PLS model sa najvećim R^2 (0,631), Q^2 (0,563) i najnižim RMSEE (0,834). Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 17.



Slika 25. Grafički prikaz koeficijenta odgovora sistema: (A) R_s 4/5, (B) R_s 5/6 i (C) R_s 9/10



Slika 25. nastavak Grafički prikaz koeficijena odgovora sistema: (A) R_s 4/5, (B) R_s 5/6 i (C) R_s 9/10

Analizom grafičkog prikaza koeficijena R_s 4/5-PLS modela može se zaključiti da na razdvajanje tj. rezoluciju para 4/5 najviše utiču sledeći faktori: Na-PS, pH, pH x Na-PS (interakcija), t x Na-PS (interakcija), t x pH (interakcija), KH_2PO_4 x Na-PS (interakcija) i Na-PS x Na-PS (nelinearni efekat), kako je prikazano na Slici 25A. Koncentracija Na-PS utiče pozitivno, a pH negativno na R_s 4/5. Takođe, faktori interakcije pH x Na-PS, t x Na-PS i KH_2PO_4 x Na-PS pokazuju pozitivan uticaj na R_s 4/5, dok faktor interakcije t x pH pokazuje negativan uticaj. Dodatno, nelinearni faktor Na-PS x Na-PS ima pozitivan uticaj na R_s 4/5. Ovi rezultati ukazuju da na rezoluciju kritičnog para 4/5 snažan uticaj ima koncentracija Na-PS.

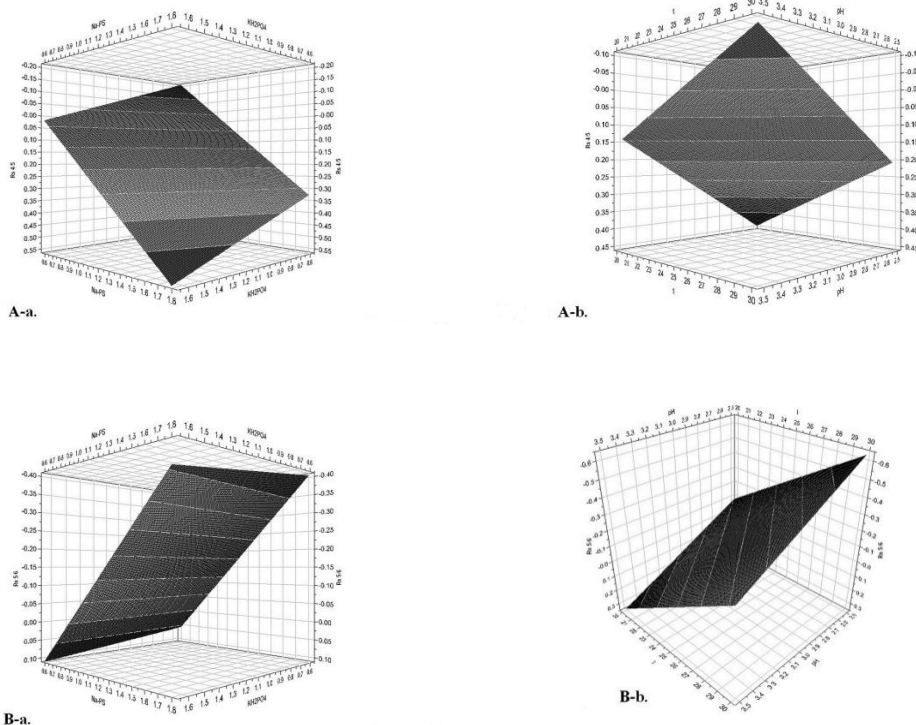
Grafički prikaz koeficijena (Slika 25B) R_s 5/6-PLS modela pokazuje da koncentracija Na-PS, t, t x Na-PS (interakcija), t x t (nelinearni efekat) i Na-PS x Na-PS (nelinearni efekat) najznačajnije utiču na razdvajanje kritičnog para 5/6. Faktor interakcije t x Na-PS negativno utiče na R_s 5/6. Takođe, nelinearni faktori Na-PS x Na-PS i t x t pokazuju negativan uticaj na R_s 5/6. Na osnovu ovih rezultata zaključuje se da na rezoluciju kritičnog para 5/6 najveći uticaj imaju temperatura kolone i koncentracija Na-PS.

Iz grafičkog prikaza koeficijena R_s 9/10-PLS modela uočava se da pH, Na-PS, t x pH (interakcija), t x Na-PS (interakcija), pH x KH_2PO_4 (interakcija), pH x Na-PS (interakcija), pH x pH (nelinearni efekat) i Na-PS x Na-PS (nelinearni efekat) značajno

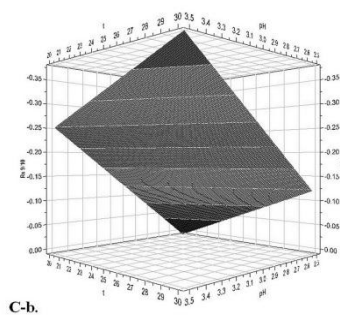
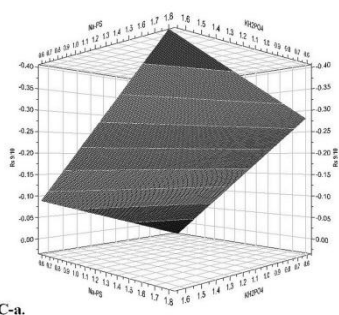
utiču na razdvajanje kritičnog para 9/10 (Slika 25C). Koncentracija Na-PS i pH pokazuju negativan uticaj na R_s 9/10. Takođe, $t \times \text{pH}$, $t \times \text{Na-PS}$, $\text{pH} \times \text{KH}_2\text{PO}_4$ i $\text{pH} \times \text{Na-PS}$ negativno utiču na R_s 9/10. Dodatno, nelinearni faktori $\text{pH} \times \text{pH}$ i $\text{Na-PS} \times \text{Na-PS}$ negativno utiču na R_s 9/10. Prema rezultatima na razdvajanje kritičnog para 9/10 najznačajniji uticaj imaju pH i koncentracija Na-PS.

Dodatno, optimalni eksperimentalni uslovi za efikasno razdvajanje kritičnih parova pikova definisani su na osnovu odgovarajućih grafika površine odgovora koji prikazuju zavisnost rezolucije kritičnog para pikova (R_s) od eksperimentalnih uslova (Slika 26). Na osnovu grafika koji prikazuje R_s 4/5 = $f(\text{KH}_2\text{PO}_4, \text{Na-PS})$ i R_s 4/5 = $f(t, \text{pH})$ zaključuje se da porast koncentracije KH_2PO_4 i Na-PS, kao i smanjenje t i pH doprinosi boljoj rezoluciji para 4/5, tj. većoj vrednosti R_s 4/5 (Slika 26A).

Grafici R_s 5/6 = $f(\text{KH}_2\text{PO}_4, \text{Na-PS})$ i R_s 5/6 = $f(t, \text{pH})$ pokazuju da porast pH, koncentracija KH_2PO_4 i Na-PS, zajedno sa sniženjem t dovode do boljeg razdvajanja pikova 5/6 tj. većih R_s 5/6 vrednosti (Slika 26B). Takođe, niže vrednosti pH, t , koncentracija KH_2PO_4 i Na-PS dovode do većih R_s 9/10 vrednosti (Slika 26C).



Slika 26. Grafički prikaz površina koje pokazuju uticaj koncentracije KH_2PO_4 , koncentracije Na-PS, pH i t na odgovor sistema: (A) R_s 4/5, (B) R_s 5/6 i (C) R_s 9/10



Slika 26. nastavak Grafički prikaz površina koje pokazuju uticaj koncentracije KH_2PO_4 , koncentracije Na-PS, pH i t na odgovor sistema: (A) R_s 4/5, (B) R_s 5/6 i (C) R_s 9/10

Kombinovanjem svih rezultata dobijenih primenom grafika površine odgovora (R_s 4/5, 5/6, 9/10 = f (KH_2PO_4 , Na-PS) i R_s 4/5, 5/6, 9/10 = f (t, pH) zaključeno je da je temperatura od 20°C , pH vrednost 3,0, kao i koncentracija KH_2PO_4 od 1,10 g/l i Na-PS od 1,2 g/l predstavljaju optimalnu kombinaciju eksperimentalnih faktora kojom se postiže maksimalna rezolucija sva tri kritična para pikova. Hromatografski parametri za ove eksperimentalne uslove prikazani su u Tabeli 18.

Tabela 18. Hromatografski parametri dobijeni pod optimalnim eksperimentalnim uslovima

Jedinjenje	Retenciono vreme (t_r)	Broj teoretskih podova (N)	Retencioni faktor (k)	Asimetrija pika (A_s)	Rezolucioni faktor (R_s)
Nečistoća V	5,0	10137	0,6	1,3	-
Nečistoća I	9,6	13677	2,0	1,3	17,6
Nečistoća II	11,7	14494	2,7	1,3	5,8
Nečistoća VIII	25,4	40049	6,9	1,3	30,6
Aripiprazol	28,6	15775	7,9	2,1	4,5
Nečistoća IX	31,2	48933	8,8	1,2	3,6
Nečistoća VI	40,2	59251	11,6	1,2	14,6
Nečistoća III	45,2	92493	13,1	1,1	8,0
Nečistoća VII	46,1	458703	13,4	1,2	2,1
Nečistoća IV	47,8	233659	13,9	1,1	5,2

Za sve HPLC eksperimente izračunata je CRF vrednost (engl. *Chromatographic Response Function*, CRF) svih pik parova (Tabela 19), kao i CRF vrednost kritičnih parova (Tabela 20) prema sledećoj jednačini [72]:

$$CRF = \sum_{i=1}^L R_i + L^{w_1} - w_2 |T_A - T_L| - w_3 |T_1 - T_0| \quad (25.)$$

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

Na oba načina najveća CRF vrednost dobijena je za eksperiment 1 čime je dodatno potvrđeno da su odabrani eksperimentalni uslovi: temperatura od 20°C, pH vrednost 3,0, kao i koncentracija KH_2PO_4 od 1,10 g/l i Na-PS od 1,2 g/l optimalni za separaciju aripiprazola i njegovih devet nečistoća (Slika 27A).

Na kraju, na osnovu CEF (engl. *Chromatographic Exponential Function*, CEF) vrednosti dobijenih iz podataka o rezoluciji svih pik parova i CEF vrednosti dobijenih korišćenjem vrednosti rezolucije kritičnih pik parova prema jednačini [74]

$$CEF = \left[\left(\sum_{i=1}^{n-1} \left(1 - e^{a(R_{opt} - R_i)} \right)^2 \right) + 1 \right] \left[1 + \frac{t_f}{t_{max}} \right] \quad (26.)$$

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

Na osnovu dobijenih CEF vrednosti potvrđeno je da se isti, odabrani eksperimentalni uslovi mogu smatrati optimalnim (Tabela 21).

Takođe, primenom ove HPLC metode izvršeno je uspešno razdvajanje još tri dodatne nečistoće aripiprazola (TC-1, TC-2 i TC-3) od ostalih komponenata u sistemu (Slika 27B).

Tabela 19. Parametri korišćeni za izračunavanje CRF vrednosti i optimizaciju HPLC metode za određivanje aripirpazola i njegovih nečistoća

Exp No	t	pH	KH ₂ PO ₄	Na-PS	$\sum_{i=1}^L Ri$	L	T _A	T _L	T ₁	T ₀	CRF
1	20	3	1.11	1.2	91.901	9	60	47.8	5.0	4.0	160.201
2	25	3	1.11	1.2	85.893	9	60	47.3	5.0	4.0	153.693
3	30	3	1.11	1.2	82.108	9	60	46.6	4.8	4.0	149.308
4	25	2.5	1.11	1.2	90.466	9	60	47.3	4.9	4.0	158.316
5	25	3	1.11	1.2	85.522	9	60	47.3	4.9	4.0	153.372
6	25	3.5	1.11	1.2	84.173	9	60	47.3	4.9	4.0	152.023
7	25	3	1.11	1.2	85.329	9	60	47.3	4.9	4.0	153.179
8	25	3	0.555	1.2	88.016	9	60	47.4	4.9	4.0	155.966
9	25	3	1.11	1.2	87.273	9	60	47.3	4.9	4.0	155.123
10	25	3	1.665	1.2	86.597	9	60	47.2	4.9	4.0	154.347
11	25	3	1.11	0.6	91.131	8	60	47.3	4.9	4.0	141.981
12	25	3	1.11	1.2	86.524	9	60	47.3	4.9	4.0	154.374
13	25	3	1.11	1.8	85.109	9	60	47.2	4.9	4.0	152.859
14	20	2.5	0.555	0.6	83.158	9	60	48.0	5.0	4.0	151.658
15	20	3.5	0.555	0.6	82.928	9	60	48.1	5.0	4.0	151.528
16	20	2.5	0.555	1.8	84.629	9	60	47.9	5.0	4.0	153.029
17	30	3.5	0.555	0.6	78.443	9	60	46.7	4.8	4.0	145.743
18	30	2.5	0.555	1.8	78.853	8	60	46.5	4.8	4.0	128.953
19	30	3.5	0.555	1.8	77.802	9	60	47.2	4.8	4.0	145.602
20	20	2.5	1.665	0.6	85.539	9	60	48.0	5.0	4.0	154.039
21	20	2.5	1.665	1.8	84.333	9	60	47.9	5.0	4.0	152.733
22	20	3.5	1.665	1.8	82.707	9	60	48.0	5.0	4.0	151.207
23	30	2.5	1.665	0.6	80.760	9	60	46.7	4.8	4.0	148.060
24	30	3.5	1.665	0.6	75.177	9	60	46.6	4.8	4.0	142.377
25	30	3.5	1.665	1.8	78.686	9	60	47.3	4.8	4.0	146.586

Napomena: L – broj parova pikova, T_A – specificirano vreme analize, T_L – retenciono vreme poslednjeg pika, T₁ – retenciono vreme prvog pika, T₀ – definisano minimalno retenciono vreme, w₁: 2, w₂: 1, w₃: 0.5.

Tabela 20. Parametri korišćeni za izračunavanje modifikovane CRF vrednosti i optimizaciju HPLC metode za određivanje aripirpazola i njegovih nečistoća

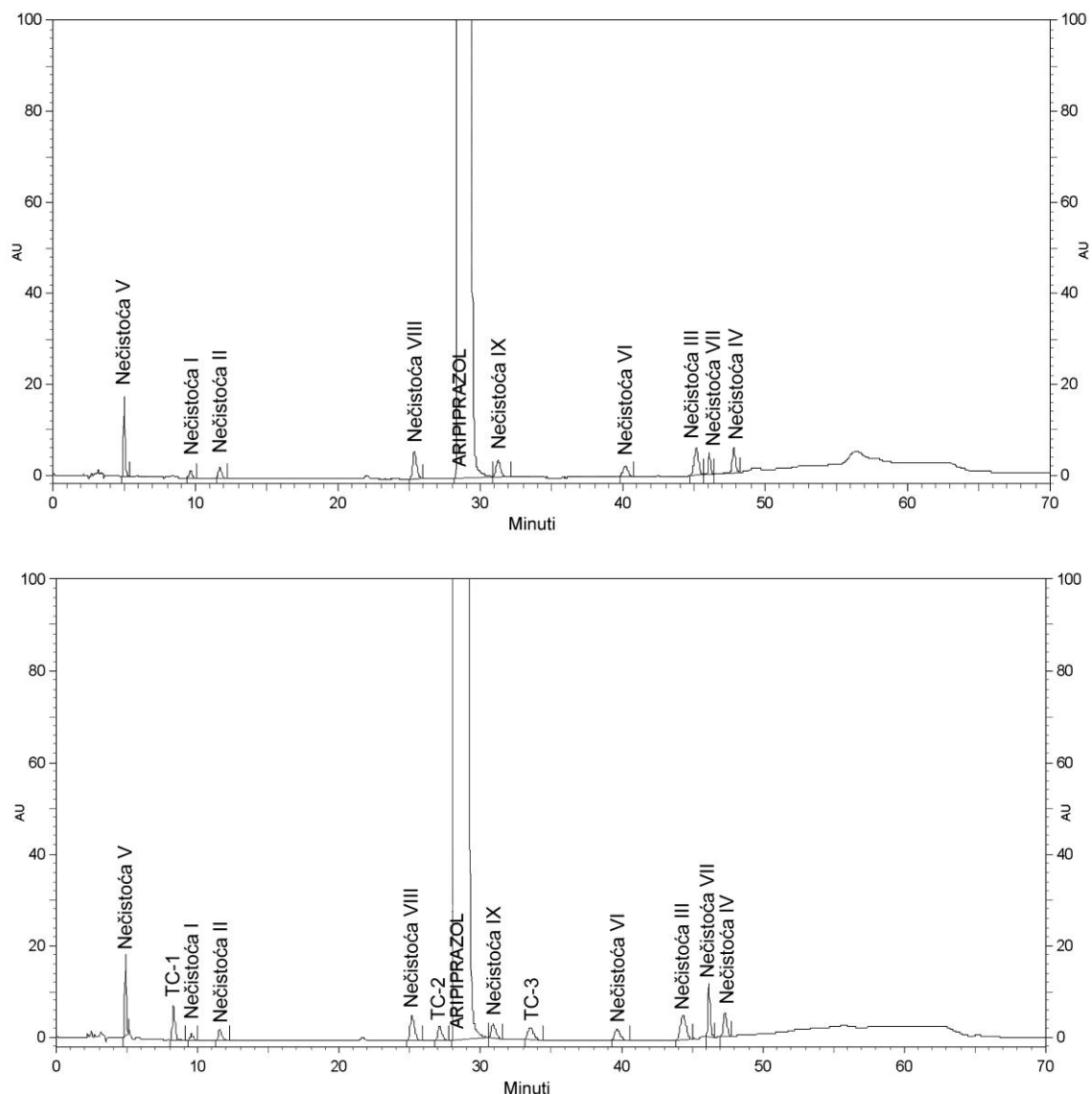
Exp No	t	pH	KH ₂ PO ₄	Na-PS	Rs 4/5	Rs 5/6	Rs 9/10	$\sum_{i=1}^L R_i$	L	T _A	T _L	T ₁	T ₀	CRF kritični pik parovi
1	20	3	1.11	1.2	4.534	3.614	5.190	13.338	9	60	47.8	5.0	4.0	81.638
2	25	3	1.11	1.2	4.346	3.319	3.250	10.915	9	60	47.3	5.0	4.0	78.715
3	30	3	1.11	1.2	4.265	3.098	1.438	8.801	9	60	46.6	4.8	4.0	76.001
4	25	2.5	1.11	1.2	4.428	3.276	4.178	11.882	9	60	47.3	4.9	4.0	79.732
5	25	3	1.11	1.2	4.335	3.287	3.259	10.881	9	60	47.3	4.9	4.0	78.731
6	25	3.5	1.11	1.2	4.265	3.359	2.010	9.634	9	60	47.3	4.9	4.0	77.484
7	25	3	1.11	1.2	4.325	3.271	3.232	10.828	9	60	47.3	4.9	4.0	78.678
8	25	3	0.555	1.2	4.240	3.317	4.026	11.583	9	60	47.4	4.9	4.0	79.533
9	25	3	1.11	1.2	4.379	3.338	3.334	11.051	9	60	47.3	4.9	4.0	78.901
10	25	3	1.665	1.2	4.505	3.334	3.049	10.888	9	60	47.2	4.9	4.0	78.638
11	25	3	1.11	0.6	4.024	3.525	5.252	12.801	8	60	47.3	4.9	4.0	63.651
12	25	3	1.11	1.2	4.356	3.311	3.370	11.037	9	60	47.3	4.9	4.0	78.887
13	25	3	1.11	1.8	4.665	3.185	0.683	8.533	9	60	47.2	4.9	4.0	76.283
14	20	2.5	0.555	0.6	3.896	3.470	4.926	12.292	9	60	48.0	5.0	4.0	80.792
15	20	3.5	0.555	0.6	3.720	3.871	4.897	12.488	9	60	48.1	5.0	4.0	81.088
16	20	2.5	0.555	1.8	4.582	3.334	3.788	11.704	9	60	47.9	5.0	4.0	80.104
17	30	3.5	0.555	0.6	3.562	3.615	4.732	11.909	9	60	46.7	4.8	4.0	79.209
18	30	2.5	0.555	1.8	4.414	2.961	5.184	12.559	8	60	46.5	4.8	4.0	62.659
19	30	3.5	0.555	1.8	4.205	2.914	1.323	8.442	9	60	47.2	4.8	4.0	76.242
20	20	2.5	1.665	0.6	4.258	3.523	4.920	12.701	9	60	48.0	5.0	4.0	81.201
21	20	2.5	1.665	1.8	4.763	3.307	3.209	11.279	9	60	47.9	5.0	4.0	79.679
22	20	3.5	1.665	1.8	4.610	3.321	1.844	9.775	9	60	48.0	5.0	4.0	78.275
23	30	2.5	1.665	0.6	4.065	3.192	5.468	12.725	9	60	46.7	4.8	4.0	80.025
24	30	3.5	1.665	0.6	3.948	3.559	2.682	10.189	9	60	46.6	4.8	4.0	77.389
25	30	3.5	1.665	1.8	4.489	2.938	1.743	9.170	9	60	47.3	4.8	4.0	77.070

Napomena: L – broj parova pikova, T_A – specificirano vreme analize, T_L – retenciono vreme poslednjeg pika, T₁ – retenciono vreme prvog pika, T₀ – definisano minimalno retenciono vreme, w₁: 2, w₂: 1, w₃: 0.5.

Tabela 21. Parametri korišćeni za izračunavanje CEF vrednosti i optimizaciju HPLC metode za određivanje aripirpazola i njegovih nečistoća

Exp No	t	pH	KH ₂ PO ₄	Na-PS	t _{max}	t _r	CEF svi pikovi	CEF kritični pik parovi
1	20	3	1.11	1.2	60	47.8	8.724	3.334
2	25	3	1.11	1.2	60	47.3	15.624	5.654
3	30	3	1.11	1.2	60	46.6	16.245	6.066
4	25	2.5	1.11	1.2	60	47.3	14.347	5.460
5	25	3	1.11	1.2	60	47.3	15.784	5.729
6	25	3.5	1.11	1.2	60	47.3	15.568	5.753
7	25	3	1.11	1.2	60	47.3	15.832	5.775
8	25	3	0.555	1.2	60	47.4	15.798	5.830
9	25	3	1.11	1.2	60	47.3	15.341	5.546
10	25	3	1.665	1.2	60	47.2	14.888	5.234
11	25	3	1.11	0.6	60	47.3	12.488	4.361
12	25	3	1.11	1.2	60	47.3	15.601	5.643
13	25	3	1.11	1.8	60	47.2	13.043	5.049
14	20	2.5	0.555	0.6	60	48.0	14.248	5.386
15	20	3.5	0.555	0.6	60	48.1	15.136	4.660
16	20	2.5	0.555	1.8	60	47.9	15.006	5.041
17	30	3.5	0.555	0.6	60	46.7	15.938	5.381
18	30	2.5	0.555	1.8	60	46.5	15.194	4.657
19	30	3.5	0.555	1.8	60	47.2	16.346	6.343
20	20	2.5	1.665	0.6	60	48.0	14.727	4.823
21	20	2.5	1.665	1.8	60	47.9	14.125	4.790
22	20	3.5	1.665	1.8	60	48.0	13.512	5.019
23	30	2.5	1.665	0.6	60	46.7	14.957	4.490
24	30	3.5	1.665	0.6	60	46.6	16.319	5.691
25	30	3.5	1.665	1.8	60	47.3	16.036	5.716

Napomena: t_{max} – maksimalno prihvatljivo vreme, t_r – retenciono vreme poslednjeg pika, a:3, R_{opt} – optimalna rezolucija (maksimalno dobijena R_i vrednostje korišćena kao optimalna rezolucijai-tog pik para).



Slika 27. (A) Hromatogram uzorka aripiprazola (0,5 mg/ml) kome je dodato devet nečistoća (0,0005 mg/ml) dobijen primenom razvijene metode. (B) Hromatogram uzorka aripiprazola (0,5 mg/ml) kome je dodato dvanaest nečistoća (0,0005 mg/ml).

4.2.4. QSRR studija

QSRR modelovanje aripiprazola i njegovih devet nečistoća izvršeno je primenom PLS regresije. U ovoj QSRR studiji retenciona vremena (t_R) aripiprazola i njegovih nečistoća dobijena primenom razvijene HPLC metode korišćena su kao zavisno promenljive, dok su izračunate vrednosti za 21 molekularni parametar ispitivanih jedinjenja korišćene kao nezavisno promenljive.

Primenom PLS regresije identifikovani su najznačajniji deskriptori i izvršeno je njihovo rangiranje. Zapravo, svakom deskriptoru je dodeljena VIP vrednost koja sumira njegov uticaj na matrice sa nezavisno (molekulski parametri) i zavisno (retencione vrednosti) promenljivim. Deskriptori sa najnižim VIP vrednostima izostavljeni su iz PLS modela, nakon čega je kreiran nov PLS model bez njih.

U ovom PLS modelovanju, kao najznačajniji identifikovani su sledeći deskriptori: *Connolly* molekulska površina (engl. *Connolly Molecular Area*, MS), koeficijent raspodele ($\log D_{\text{pH}3.0}$), broj akceptora vodonične veze (engl. *Hydrogen Bond Acceptors*, HBA) i broj donora vodonične veze (engl. *Hydrogen Bond Donors*, HBD) HBD-HBA. Njihova kombinacija je odabrana za razvoj optimalnog QSRR modela, izračunavanje statističkih parametara modela i predviđanje retencionog vremena (t_R) trening i test seta jedinjenja ($R^2 = 0,899$ i $Q^2 = 0,832$, RMSEE: 4,761, RMSEP: 6,614), kako je prikazano u Tabeli 25. Statistički parametri QSRR modela pokazali su dobar prognostički kapacitet.

QSRR studija je pokazala da porast vrednosti MS, lipofilnosti pri pH vrednosti 3,0 ($\log D_{\text{pH} 3.0}$) i broja HBD grupa, zajedno sa smanjenjem broja HBA grupa dovodi do porasta t_R analiziranih jedinjenja pod ispitivanim HPLC uslovima.

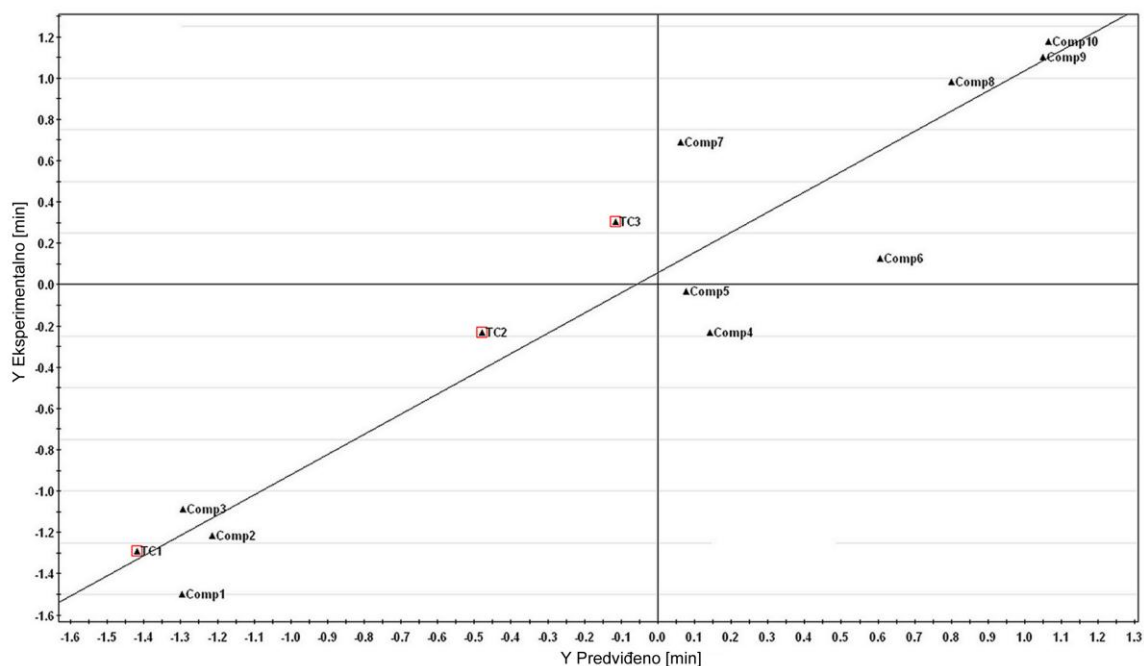
Konačno, kako bi se ispitala statistička značajnost R^2 i Q^2 i isključila mogućnost da usled slučajne korelacije postoji prekomerna prilagođenost modela trening setu, na razvijeni QSRR model primenjen je test permutacije odgovora (engl. *Response Permutation Test*) [65, 67, 172]. Dobijena je vrednost za R^2 manja od 0,4 i Q^2 manja od 0,05 što pokazuje da je razvijeni model dobar.

QSRR model je dalje iskorišćen za predviđanje retencionih vremena (Tabela 22) tri dodatne nečistoće aripiprazola (TC-1, TC-2 i TC-3). Hromatogram aripiprazola i njegovih 12 nečistoća dobijen primenom razvijene HPLC metode pokazao je da se predložena HPLC metoda može uspešno koristiti za njihovo razdvajanje (Slika 27B).

Izračunata RMSEP vrednost test seta jedinjenja odgovara opsegu RMSEE vrednosti trening seta jedinjenja. Optimalna vrednost za RMSEE/RMSEP odnos potvrdila je dobar kvalitet razvijenog QSRR modela [65, 67, 172]. Slaganje između eksperimentalnih rezultata i QSRR studije potvrdilo je dobru moć predviđanja formiranog QSRR modela (Slika 28).

Tabela 22. Odabrani molekularni parametri aripiprazola i njegovih devet nečistoća korišćeni za formiranje QSRR modela.

Naziv	Drugi naziv	MS, Conolly	logD_{pH 3.0}	HBA	HBD-HBA	Eksperimentalna R_t (min)	Predvidena R_t (min)	
Comp1	Nečistoća V	154,758	1,21	3	-1	5,0	8,194	
Comp2	Nečistoća I	199,990	-0,49	1	1	9,5	9,527	
Comp3	Nečistoća II	250,755	-0,62	1	-1	11,5	8,266	
Comp4	Nečistoća VIII	396,377	1,53	4	-2	25,0	30,967	
Comp5	Aripiprazol	399,314	1,45	4	-2	28,2	29,925	
Comp6	Nečistoća IX	333,905	3,77	5,72	-4,58	30,7	38,306	
Comp7	Nečistoća VI	367,367	3,12	6	-4	39,6	29,712	
Comp8	Nečistoća III	246,447	2,60	3	-2	44,2	41,352	
Comp9	Nečistoća VII	603,441	3,07	7	-5	46,1	45,296	
Comp10	Nečistoća IV	253,422	2,79	3	-2	47,3	45,556	
TEST Set	Drugi naziv	MS, Conolly	logD_{pH 3.0}	HBA	HBD-HBA	Exp R_t (min)	Pred R_t (min)	
TC-1	Nečistoća X	236,896	1,25	4	-2	8,3	6,278	
TC-2	Nečistoća XI	399,259	0,95	4	-2	25,0	21,132	
TC-3	Nečistoća XII	282,629	2,25	4	-3	33,5	26,886	
				F-odnos	1,03		R²	0,899
				p-vrednost	0,50	LOO-CV	Q²	0,832
					Trening set	RMSEE	4,761	
					Test set	RMSEP	6,614	



Slika 28. Grafički prikaz eksperimentalno dobijenih vs. predviđenih t_R [min] za jedinjenja tening seta i test seta

4.2.5. Validacija HPLC metode za analizu nečistoća aripiprazola

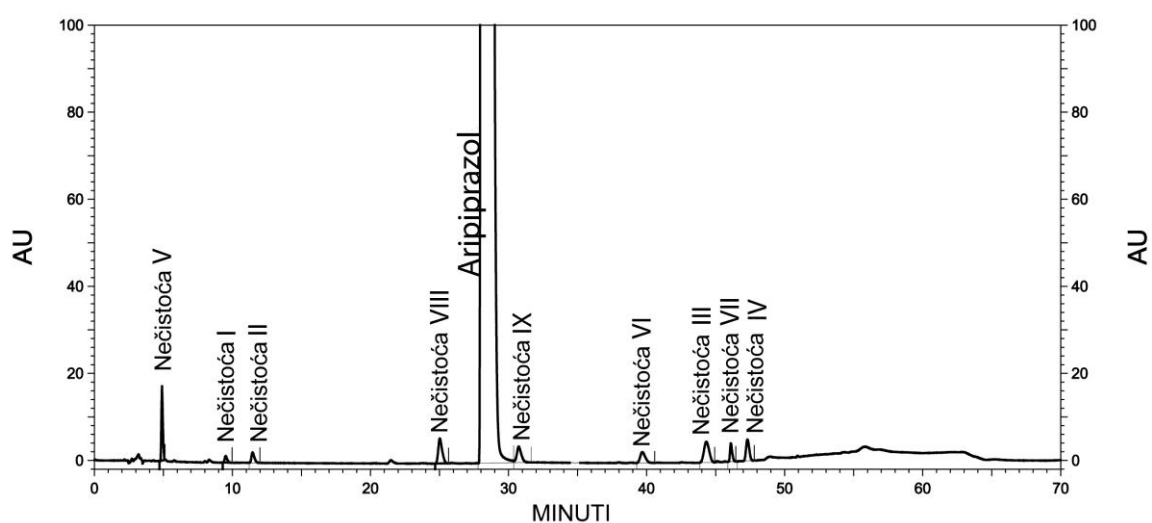
Validacija HPLC metode i određivanje sadržaja nečistoća u aripiprazol sirovini i tabletama izvedeni su pod uslovima prikazanim u poglavlju 3.3.5.

Pod optimalnim hromatografskim uslovima dobijeni su zadovoljavajući hromatografski parametri aripiprazola i njegovih devet nečistoća: simetrija pika, $1,1 < A_s < 1,4$, retencioni faktor, $0,5 < k < 15$, vreme eluiranja poslednje komponente 47,3 minuta, odgovarajući oblik pikova i njihova rezolucija, $R_s > 2$. Vremena retencije i ostali hromatografski parametri svih komponenata prikazani su u Tabeli 23.

Hromatogram čistog aripiprazola kome je dodato 0,1% svih nečistoća prikazan je na Slici 29. Iz ovog hromatograma vidi se da su sva ispitivana jedinjenja razdvojena, kao i da su dobijeni oštri pikovi dobre rezolucije.

Tabela 23. Hromatografski parametri RP-HPLC metode

Jedinjenje	Vreme retencije, min	Broj teoretskih platoa, N	Retencioni faktor, k	Asimetrija pika, A_s	Rezolucioni faktor, R_s
Nečistoća V	4,9	9870	0,5	1,3	-
Nečistoća I	9,5	12156	2,0	1,4	17,0
Nečistoća II	11,5	12784	2,6	1,4	5,2
Nečistoća VIII	25,0	34737	6,8	1,3	28,8
Aripiprazol	28,2	14703	7,8	2,0	4,3
Nečistoća IX	30,7	40466	8,6	1,3	3,3
Nečistoća VI	39,7	51437	11,4	1,2	13,7
Nečistoća III	44,3	59610	12,8	1,1	6,5
Nečistoća VII	46,1	386234	13,4	1,4	3,5
Nečistoća IV	47,3	181726	13,8	1,1	3,2

**Slika 29.** Hromatogram aripiprazola (500 µg/ml) kome je dodato devet nečistoća (0,5 µg/ml)

Analiti koji se nalaze u katjonskom obliku pri pH 3,0 (aripiprazol, I, II i VIII) eluiraju se pre analita koji se nalaze u molekulskom obliku pri pH 3,0 (III, IV i VI) (Tabela 15). Izuzetak od ovog pravila su analiti sa značajno manjom molekulskom masom (nečistoća V (Mw: 163)) i značajno većom molekulskom masom (nečistoća VII (Mw: 667)) od ostalih jedinjenja. Takođe, analiti sa slabije izraženim lipofilnim karakteristikama ($\log D < 2,5$: aripiprazol, I, II, V i VIII) eluiraju se pre analita sa izraženijim lipofilnim svojstvima ($\log D > 2,5$: III, IV, VI, VII i IX) (Tabela 15).

Nakon odabira optimalnih hromatografskih uslova za razdvajanje RP-HPLC metoda za analizu nečistoća aripiprazola je validirana kako bi se pokazalo da odgovara svojoj nameravanoj upotrebi. Procenjeni su selektivnost, linearnost, LOD (engl. *Limit Of Detection*) i LOQ (engl. *Limit of Quantification*), preciznost, tačnost, robusnost, osnovni atributi jedne analitičke procedure [52].

Linearnost metode ispitana je u opsegu koncentracija navedenom u poglavlju 3.3.5.1. Statistička analiza dobijenih podataka izvršena je primenom linearne regresije korišćenjem metode najmanjih kvadrata. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 24, gde je x koncentracija $\mu\text{g/ml}$, a y površina pika aripiprazola i nečistoća I-IX, redom. Kako su dobijeni koeficijenti korelacije (r) za kalibracione krive ispitivanih jedinjenja veći od 0,998, potvrđena je proporcionalnost eksperimentalno dobijenih rezultata i koncentracije analita u ispitivanom opsegu koncentracija. Odgovarajuće kalibracione krive prikazane su na Slikama 30 – 35.

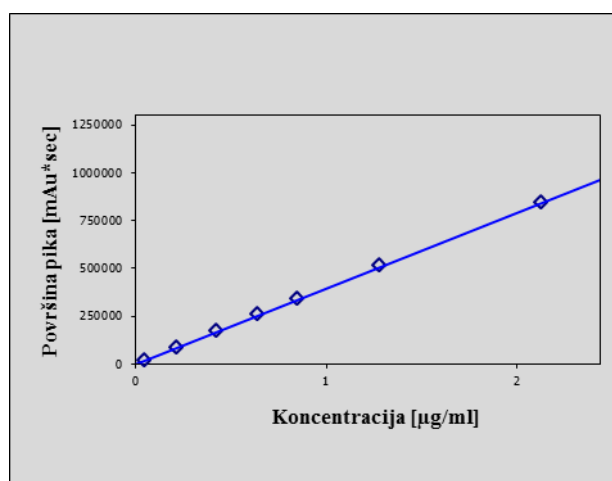
Tabela 24. Parametri kalibracione krive aripiprazola i njegovih nečistoća

Jedinjenje	$y = ax + b$	r	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)
Aripiprazol	$y = 321728x + 5906$	0,9999	0,055	0,016
Nečistoća I	$y = 167868x + 5616$	0,9999	0,078	0,023
Nečistoća II	$y = 107531x + 1876$	0,9999	0,126	0,038
Nečistoća III	$y = 343024x - 1071$	0,9998	0,060	0,018
Nečistoća IV	$y = 338476x + 4888$	0,9999	0,044	0,013
Nečistoća V	$y = 460896x + 6160$	0,9999	0,018	0,005
Nečistoća VI	$y = 440359x - 3080$	0,9997	0,052	0,016
Nečistoća VII	$y = 162262x + 5579$	0,9987	0,056	0,016
Nečistoća VIII	$y = 412004x + 2050$	0,9999	0,044	0,013
Nečistoća IX	$y = 322569x + 3427$	0,9999	0,047	0,014

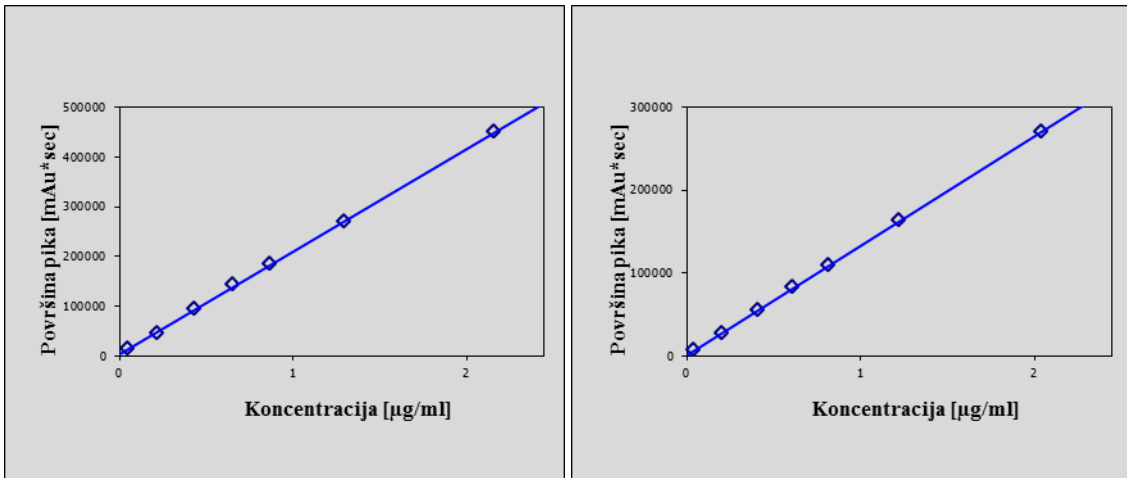
r – koeficijent korelacije

LOQ (engl. *Limit Of Quantification*) – limit kvantifikacije

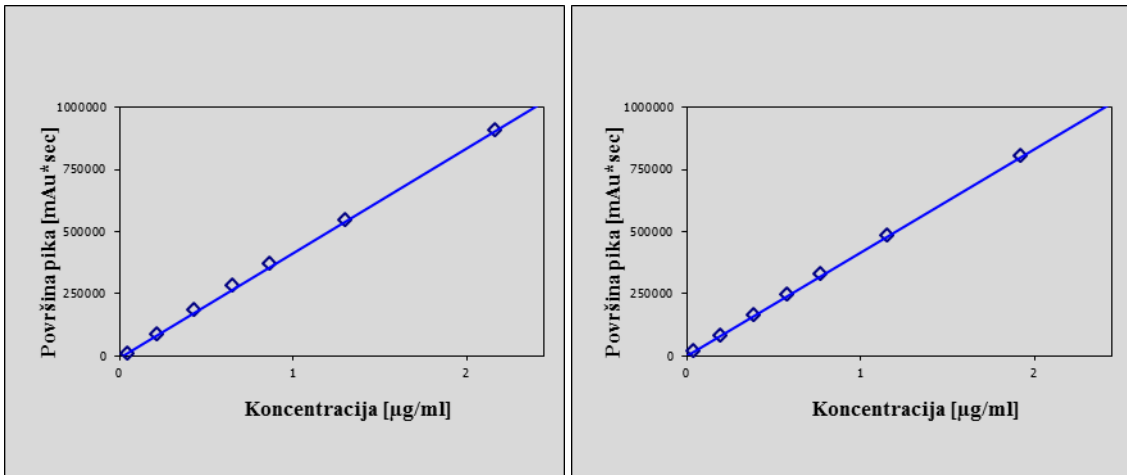
LOD (engl. *Limit Of Detection*) – limit detekcije



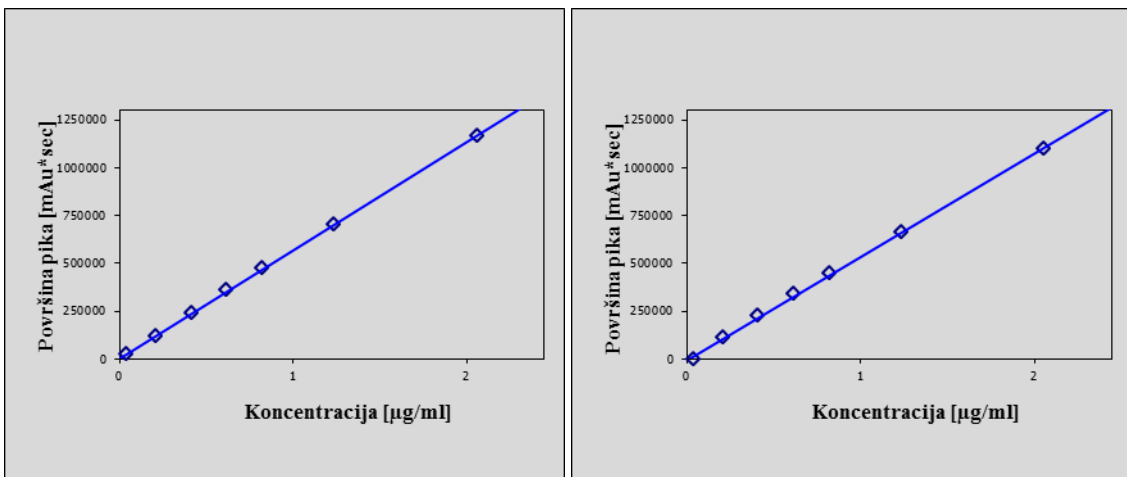
Slika 30. Kalibraciona kriva aripiprazola



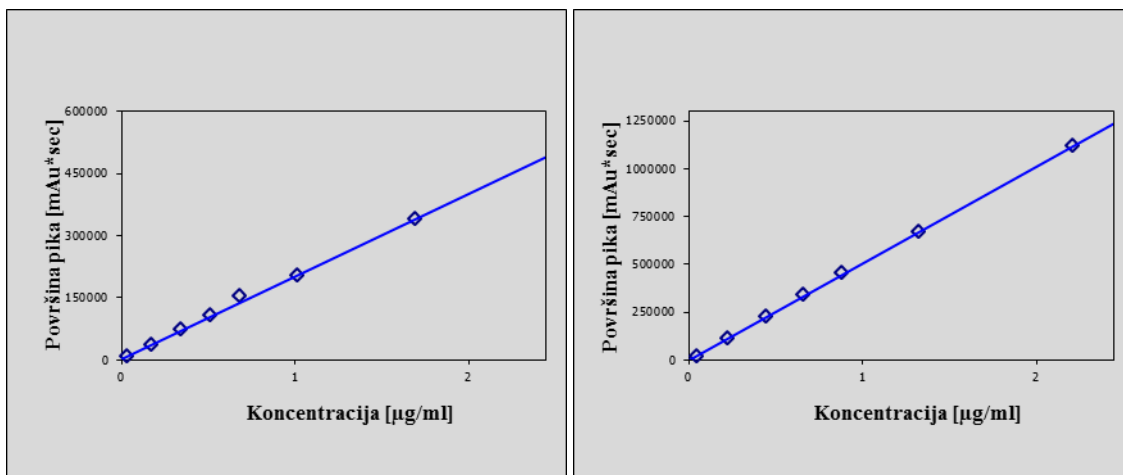
Slika 31. Kalibracione krive nečistoće I i nečistoće II



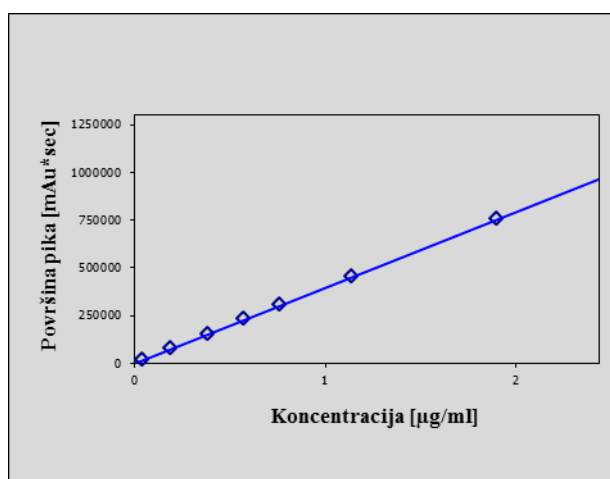
Slika 32. Kalibracione krive nečistoće III i nečistoće IV



Slika 33. Kalibracione krive nečistoće V i nečistoće VI



Slika 34. Kalibracione krive nečistoće VII i nečistoće VIII



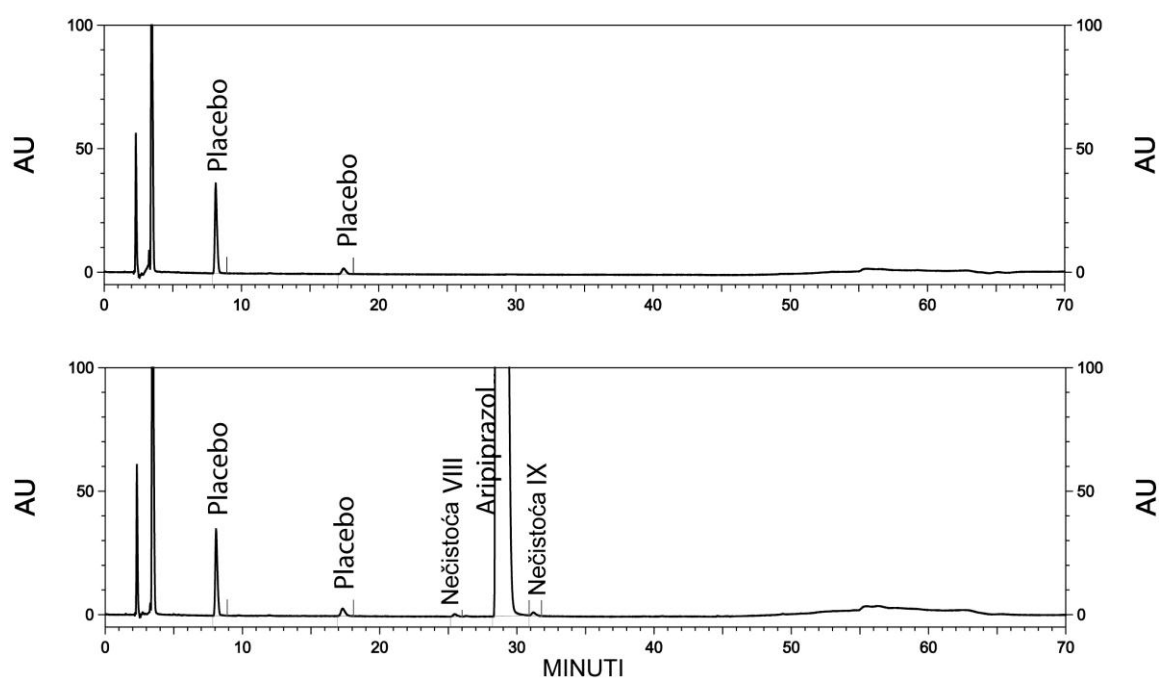
Slika 35. Kalibraciona kriva nečistoće IX

Dobijeni rezultati za LOQ i LOD za aripiprazol i njegove nečistoće pokazuju da je metoda dovoljno osjetljiva i da se može koristiti za praćenje njihovih koncentracija u sirovini i tabletama, u nivou većem od 0,05% koliko iznosi limit za odbacivanje. Dobijene LOD vrednosti analiziranih nečistoća su od 0,005 do 0,038 µg/ml, što odgovara nivou nečistoća od 0,001 do 0,008%, računato u odnosu na aripiprazol. Dobijene LOQ vrednosti analiziranih nečistoća su od 0,018 do 0,126 µg/ml, što odgovara nivou nečistoća 0,004 do 0,025%, računato u odnosu na aripiprazol.

Tačnost metode ispitana je tako što su uzorcima aripiprazola dodate određene, poznate količine aripiprazola i nečistoća I-IX. Analizirana su tri uzorka za svaki nivo koncentracije, a dobijene vrednosti su iznosile 103,5-107,9% za aripiprazol, 102,3-

104,5% za nečistoću I, 103,3-104,4% za nečistoću II, 97,3-100,1% za nečistoću III, 98,2-101,5% za nečistoću IV, 100,0-102,0% za nečistoću V, 98,8-101,4% za nečistoću VI, 99,5-101,2% za nečistoću VII, 99,8-101,3% za nečistoću VIII i 99,5-101,6% za nečistoću IX. Relativna standardna devijacija (RSD) za sve analizirane nečistoće bila je u intervalu 0,06-5,44%.

Dodatno, dobijeni rezultati su pokazali da pikovi pomoćnih supstanci ne ometaju određivanje pikova aripiprazola i nečistoća I-IX, odnosno da se predložena analitička procedura može koristiti za analizu nečistoća u tabletama (Slika 36).



Slika 36. Reprezentativni hromatogram placeba (gore) i aripiprazol tableta (dole)

Preciznost metode ispitana je na način opisan u poglavlju 3.3.5.2., a vrednosti dobijenih statističkih parametara, kao što su standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD) prikazane su u Tabeli 25. RSD vrednost za aripiprazol 1,07% i RSD vrednosti za nečistoće I-IX 0,18-5,70% nalaze se u dozvoljenim granicama, tako da se metoda može smatrati preciznom.

Tabela 25. Preciznost RP-HPLC metode

Jedinjenje	Injektovano ($\mu\text{g/ml}$)	Nađeno ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD ^a	RSD (%)
Aripiprazol	0,50	0,5365 \pm 0,0058	1,07
Nečistoća I	0,75	0,8258 \pm 0,0118	1,43
Nečistoća II	0,75	0,7862 \pm 0,0140	1,79
Nečistoća III	0,75	0,7857 \pm 0,0146	1,86
Nečistoća IV	0,75	0,7005 \pm 0,0081	1,16
Nečistoća V	0,75	0,7632 \pm 0,0014	0,18
Nečistoća VI	0,75	0,7777 \pm 0,0042	0,54
Nečistoća VII	0,75	0,7140 \pm 0,0407	5,70
Nečistoća VIII	0,75	1,0481 \pm 0,0065	0,62
Nečistoća IX	0,75	0,7601 \pm 0,0051	0,66

^a n = 6

Robustnost predložene metode ispitivana je namernim variranjem nekoliko parametara: temperature kolone, pH vrednosti pufera, koncentracije KH_2PO_4 kao komponente pufera u primenjenoj mobilnoj fazi i količine dodatog Na-PS i praćenjem njihovog uticaja na odgovor sistema. Dobijeni rezultati, sumirani u Tabeli 26, pokazali su da navedene promene analitičkih uslova nisu uticale na funkcionalnost metode.

Validirana HPLC metoda primenjena je za određivanje sadržaja nečistoća u aripiprazol sirovini i tabletama. U uzorcima sirovine detektovane su nečistoće VI, VII, VIII i IX, a sve dobijene vrednosti bile su niže od dozvoljenog limita koji je predložio proizvođač (ne više od 0,15%). Tačnije, rezultati su bili: <LOQ, 0,02%, 0,04% i 0,01% za nečistoće VI, VII, VIII i IX, redom.

Tabela 26. Rezultati testa robustnost predložene RP-HPLC metode

	Temperatura kolone			pH pufera			KH ₂ PO ₄			Na-PS		
	20°C	25°C	30°C	2,5	3,0	3,5	0,555 g	1,11 g	1,665 g	0,6 g	1,2 g	1,8 g
Nečistoća V												
t _R	5,0	5,0	4,8	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9
R _s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nečistoća I												
t _R	9,6	9,5	9,2	9,2	9,5	9,8	9,5	9,5	9,3	7,7	9,5	10,9
R _s	17,58	16,88	17,36	19,72	17,03	17,69	17,29	17,48	16,95	11,79	17,24	20,76
Nečistoća II												
t _R	11,7	11,5	11,1	11,0	11,5	11,9	11,4	11,5	11,3	9,4	11,4	13,0
R _s	5,76	5,24	5,06	5,63	5,21	5,34	5,18	5,30	5,38	5,13	5,24	5,31
Nečistoća VIII												
t _R	25,4	25,0	24,3	24,4	25,0	25,7	24,8	25,1	24,8	21,9	25,0	27,1
R _s	30,57	28,98	27,58	29,22	28,78	28,40	29,46	29,29	29,18	29,24	29,15	28,60
Aripiprazol												
t _R	28,6	28,2	27,5	27,5	28,2	28,9	27,9	28,3	28,0	24,8	28,2	30,5
R _s	4,53	4,35	4,26	4,43	4,33	4,26	4,24	4,38	4,50	4,02	4,36	4,66
Nečistoća IX												
t _R	31,2	30,7	29,9	30,0	30,7	31,6	30,5	30,8	30,6	27,5	30,7	32,9
R _s	3,61	3,32	3,10	3,28	3,29	3,36	3,32	3,34	3,33	3,52	3,31	3,18
Nečistoća VI												
t _R	40,2	39,6	38,9	39,6	39,7	39,7	39,8	39,8	39,5	39,7	39,7	39,6
R _s	14,56	13,77	12,91	14,92	13,67	12,26	14,86	14,00	13,93	19,19	13,86	10,18
Nečistoća III												
t _R	45,2	44,2	43,0	44,3	44,3	44,3	44,4	44,4	44,2	44,3	44,3	44,2
R _s	7,95	6,57	5,20	6,37	6,50	6,45	6,64	6,62	6,56	6,49	6,54	6,44
Nečistoća VII												
t _R	46,1	46,1	46,0	45,7	46,1	46,6	45,9	46,1	46,1	44,3	46,1	47,0
R _s	2,14	3,54	5,19	2,72	3,47	4,40	2,99	3,53	3,71	6,49	3,46	5,28
Nečistoća IV												
t _R	47,8	47,3	46,6	47,3	47,3	47,3	47,4	47,3	47,2	47,3	47,3	47,2
R _s	5,19	3,25	1,44	4,18	3,26	2,01	4,03	3,33	3,05	5,25	3,37	0,68

t_R – retenciono vreme; R_s – faktor rezolucije;

4.2.6. Studije stabilnosti aripiprazol tableta

4.2.6.1. Studije preliminarne stabilnosti

Studija preliminarne stabilnosti aripiprazol tableta sprovedena je na uzorcima formulacije tableta proizvedenim korišćenjem pomoćnih supstanci odabranih tokom studije kompatibilnosti. Rezultati stres ispitivanja nisu pokazali promene u vrednostima većine nečistoća u poređenju sa inicijalnim rezultatima. Međutim, pri navedenim uslovima, a naročito pri uslovima povećane relativne vlage, zabeležen je porast nečistoće IX (N-oksida aripiprazola) i u manjoj meri nečistoće VIII (Dehidro aripiprazola), kako je prikazano u Tabeli 27.

Tabela 27. Rezultati nečistoća VIII i IX (%) u aripiprazol tabletama pri stres uslovima

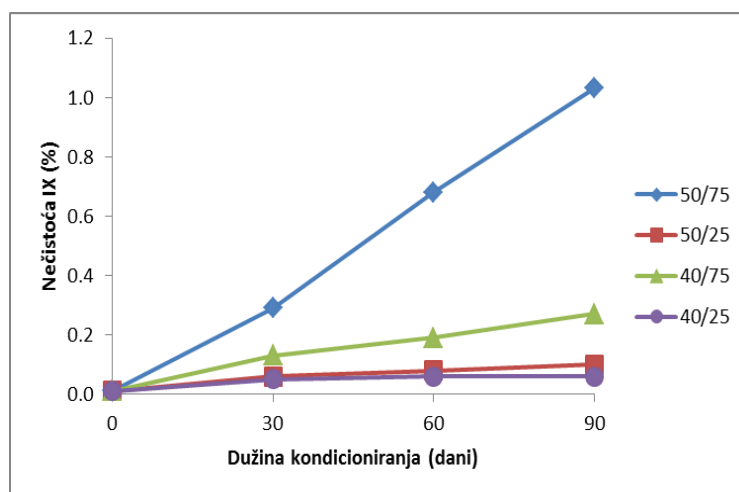
Temperatura (°C)	Relativna vlaga (%RH)	Vreme (dani)	Nečistoća VIII (%)	Nečistoća IX (%)
50	75	14	0,11±0,02	0,24±0,03
60	40	14	0,06±0,01	0,11±0,02
70	5	14	0,07±0,01	0,12±0,02
70	75	1	0,08±0,01	0,30±0,04
80	40	2	0,10±0,01	0,13±0,02

Napomena: inicijalne vrednosti, nečistoća VIII 0,03% i nečistoća IX 0,04%;

Dobijeni rezultati pokazuju da na hemijsku stabilnost aripiprazola utiče vrednost relativne vlage kojoj su uzorci izloženi. Zbog značaja koji relativna vlaga ima izuzetno je važno da se tokom studije ona kontroliše, odnosno da se uzorci izlažu direktno, bez kontaktne ambalaže. Naime, kod upakovanih uzoraka relativna vlaga kojoj je uzorak izložen nije poznata i ne odgovara spoljašnjoj, kontrolisanoj relativnoj vlažnosti. Iz tog razloga nije moguće izvršiti tačnu procenu uticaja. Sa druge strane, kada su uzorci direktno izloženi, relativna vlaga uzorka je poznata i odgovara poznatoj kontrolisanoj vrednosti. Porast nečistoće IX u studiji preliminarne stabilnosti zavisi i od temperature i relativne vlage, s tim da je u uslovima niske relativne vlage (25%) uticaj temperature gotovo zanemarljiv, dok je u uslovima visoke relativne vlage (75%) i uticaj temperature veći, kako je prikazano na Slici 37. Iz tog razloga je kao kontaktna ambalaža za ovaj proizvod odabran OPA/Al/PVC//Al blister.

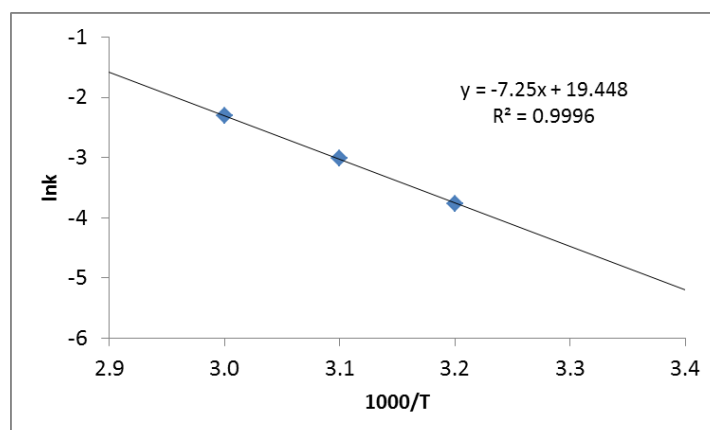
Međutim, s obzirom da nastanak nečistoće IX u određenoj meri zavisi i od temperature, izvršena je procena uticaja ovog faktora na stabilnost proizvoda primenom Arenijusovog

kinetičkog modela [35]. Aripiprazol tablete su kondicionirane pod stres uslovima, na temperaturama 40°C, 50°C i 60°C, a uzorci su analizirani u triplikatu.



Slika 37. Brzina nastajanja nečistoće III u funkciji relativne vlage

Nakon mesec dana kondicioniranja na 60°C dobijena vrednost nečistoće IX iznosila je $0,11\% \pm 0,01\%$, dok su nakon 3 meseca kondicioniranja na 50°C i 40°C dobijeni rezultati $0,10\% \pm 0,01\%$ i $0,08\% \pm 0,01\%$, redom. Analizom dobijenih vrednosti može se zaključiti da porast nečistoće IX nije značajan, ali je navedene procene potrebno potvrditi i matematički. Izračunate vrednosti konstante brzine reakcije (k) na temperaturama 40°C, 50°C i 60°C iznose $0,02\% \text{ m}^{-1}$, $0,03\% \text{ m}^{-1}$ i $0,10\% \text{ m}^{-1}$. Dobijene vrednosti pokazuju da se sa porastom temperature brzina degradacije povećava. Grafičkim prikazom prirodnog logaritma konstanti brzine reakcije u opsegu temperatura 40-60°C u funkciji $1000/T$, gde je T temperatura u K, dobija se prava linija ($r^2 = 0,9996$), kako je prikazano na Slici 38.



Slika 38. Grafički prikaz Arenijusovog modela

Jednačina koja odgovara Arenijusovom kinetičkom modelu glasi:

$$\ln k = -7.25 \times \frac{1000}{T} + 19.45 \quad (27.)$$

Primenom ove jednačine izračunati su energija aktivacije, E_a i brzina porasta nečistoće III pri dugotrajnim uslovima (na 25°C), k . Energija aktivacije, E_a , izračunata je iz nagiba prave linije koja pokazuje porast nečistoće IX i iznosi 15,07 kcal mol⁻¹. Ova vrednost odgovara standardnim vrednostima E_a koje se kreću u opsegu 10-30 kcal mol⁻¹. Očekivana brzina nastajanja degradacionog proizvoda pri dugotrajnim uslovima (na 25°C), dobijena primenom jednačine (27.) je $k = 0,0070\% \text{ m}^{-1}$, ($\ln k = -4,97$). Izračunat rok upotrebe aripiprazol tableta iznosi 71 mesec, što predstavlja vreme potrebno da se dostigne maksimalno dozvoljena koncentracija nečistoće IX koja odgovara pragu za kvalifikaciju i iznosi 0,5%.

4.2.6.2. Studije stabilnosti pilot serija

Studija stabilnosti za potrebe registracije proizvoda sprovedena je u skladu sa smernicama Internacionalne konferencije za harmonizaciju (ICH) na tri pilot serije aripiprazol tableta upakovanih u OPA/Al/PE//Al blistere. Uzorci su kondicionirani pod ubrzanim i dugotrajnim uslovima u trajanju od 6, odnosno 60 meseci i ispitivani u vremenskim intervalima prikazanim u Tabeli 28. Analizirani su fizički, hemijski i mikrobiološki parametri i to: izgled, raspadljivost, čvrstina, voda, brzina rastvaranja lekovite supstance, sadržaj aripiprazola, sadržaj degradacionih proizvoda i mikrobiološka čistoća. Primenjene su validirane analitičke procedure. Rezultati sadržaja olanzapina i nečistoće III posle 36 meseci kondicioniranja prikazani su u Tabeli 29. i 30. Svi raspoloživi rezultati posle 36 meseci kondicioniranja nalaze se u Prilogu B (Tabele 37-42). Studija se nastavlja.

Tabela 28. Protokol studije stabilnosti pilot serija

Uslovi kondicioniranja	Vreme (meseci)									
	0	3	6	9	12	18	24	36	48	60
40°C/75% RH		x	x							
25°C/60% RH	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabela 29. Rezultati sadržaja aripiprazola iz studije stabilnosti pilot serija

Uslovi kondicioniranja i serije	Dužina kondicioniranja (meseći)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
40°C/75% RH								
P – RS0037/10/01	100,3 %	99,9%	100,2%					
P – RS0037/10/02	100,1 %	100,7%	98,9%					
P – RS0037/10/03	101,1 %	100,3%	101,4%					
25°C/60% RH								
P – RS0037/10/01	100,3 %	100,5%	100,6%	100,2%	99,7%	98,9 %	99,6%	100,7%
P – RS0037/10/02	100,1 %	100,8%	100,1%	101,1%	99,3%	100,0 %	99,2%	99,9%
P – RS0037/10/03	101,1 %	100,7%	101,7%	100,7%	102,0 %	99,4%	100,5%	102,0 %

Napomena: Kriterijum prihvatljivosti: 95-105% od deklarisanog sadržaja

Tabela 30. Rezultati sadržaja nečistoće IX iz studije stabilnosti pilot serija

Uslovi kondicioniranja i serije	Dužina kondicioniranja (meseci)							
	0	3	6	9	12	18	24	36
40°C/75% RH								
P – RS0037/10/01	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%					
P – RS0037/10/02	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%					
P – RS0037/10/03	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%					
25°C/60% RH								
P – RS0037/10/01	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
P – RS0037/10/02	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
P – RS0037/10/03	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%

Napomena: Kriterijum prihvatljivosti: ne više od 0,5%

Rezultati ispitivanja pokazuju da tokom kondicioniranja ne dolazi do značajne promene izgleda i fizičkih karakteristika tableta. Nisu zabeležene promene u brzini rastvaranja lekovite supstance tokom 6 meseci pri ubrzanim i 36 meseci pri dugotrajnim uslovima ispitivanja. Svi dobijeni rezultati su u skladu sa definisanim limitom.

Pri svim ispitivanim uslovima ne beleži se pad sadržaja aripiprazola, a dobijeni rezultati kreću se u opsegu 98,9-102,0% deklarisanog sadržaja nezavisno od uslova kondicioniranja.

Rezultati ICH stabilnosti potvrdili su činjenicu da nečistoće VIII i IX nisu kritični parametri stabilnosti ovog proizvoda. Svi dobijeni rezultati niži su od praga za izveštavanje (engl. *Reporting Threshold*, RT) koji prema ICH smernici iznosi 0,10%.

Ovakvi rezultati su očekivani i u skladu sa predviđanjima izvršenim na osnovu rezultata stres ispitivanja. Dodatno, na osnovu zadovoljavajućih rezultata ubrzanog ispitivanja, poznatog načina na koji se odvija degradacija, kao i rezultata preliminarnog ispitivanja pod stres uslovima, izvršena je ekstrapolacija rezultata tj. produženje roka upotrebe proizvoda izvan perioda koji je obuhvaćen rezultatima dugotrajnog ispitivanja [21]. Tačnije, za aripiprazol tablete nakon 36 meseci dugotrajnog ispitivanja moguće je definisati rok upotrebe od 48 meseci tj. 4 godine.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Tokom ispitivanja kompatibilnosti olanzapina i pomoćnih supstanci formulacije tableta primenom HPLC, DSC i TGA metoda pokazano je da odabir pomoćnih supstanci, a posebno pravilan odabir sredstva za dopunjavanje, ima važnu ulogu u formulisanju olanzapin film tableta. Higroskopnost laktoze anhidrovane, laktoze monohidrata i manitola, odnosno njihova sposobnost da upijaju vodu, određuje stepen fizičkih i hemijskih promena olanzapina. Na ove promene utiče i oblik u kome je voda prisutna u smešama olanzapina i pomoćnih supstanci, kao i njena pokretljivost u sistemu. Degradacija olanzapina predstavlja kritičan parametar stabilnosti na koji utiču temperatura i vlaga. Takođe, primenom XRPD metode utvrđeno je da u smešama olanzapina sa talkom i magnezijum stearatom postoji polimorfni prelaz olanzapina forme I u formu II, ali ova promena nije u korelaciji sa procesom degradacije aktivne supstance.
- Primenom HPLC-MS metode, kao i preparativnom HPLC u kombinaciji sa IR i NMR spektroskopijom izvršena je karakterizacija degradacionih proizvoda olanzapina u odabranoj formulaciji tableta. Izolovane su nečistoća II, 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-*b*][1,5]benzo-diazepin-4-N-oksid i nečistoća III, 5,10-dihidro-2-metil-4H-tieno[2,3-*b*][1,5]benzodiazepin-4-on. Ovim je pokazano da kod hemijski nestabilnih supstanci faktori formulacije pokazuju značajan uticaj na put degradacije aktivne supstance.
- Usled osetljivosti na uticaje vlage, kao kontaktna ambalaža za olanzapin film tablete odabran je OPA/Al/PVC//Al blister. Tokom preliminarnih studija stabilnosti primenom stres uslova temperature i Arenijusovog kinetičkog modela izračunata je konstanta brzine reakcije nastajanja ove nečistoće na 25°C (0,037% mesec⁻¹). Rezultati ispitivanja stabilnosti sprovedenih na proizvodnim serijama olanzapin film tableta pokazali su nešto nižu vrednost 0,016% mesec⁻¹. Na osnovu dobijenih vrednosti i pokazane stabilnosti tokom 12 meseci pri intermedijernim i 36 meseci pri dugotrajnim uslovima definisan je način čuvanja:

„čuvati do 30°C, u originalnom pakovanju u cilju zaštite od svetlosti i vlage“ i rok upotrebe od 3 godine.

- Razvijena je i optimizovana HPLC metoda za analizu devet nečistoća aripirazola, a prikazana studija predstavlja prvo hemometrijsko ispitivanje. Tokom preliminarnih ispitivanja četiri faktora su odabrana za optimizaciju HPLC uslova: pH vrednost, temperatura kolone, koncentracija KH_2PO_4 i koncentracija Na-PS. Rezolucija tri kritična para pikova (R_s 4/5, R_s 5/6 i R_s 9/10) praćena je kao odgovor sistema. Optimizacija je izvršena primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog dizajna, a podaci analizirani primenom PLS regresione analize i metodom površine odgovora. Izbor optimalnih uslova potvrdile su i maksimalna CRF i minimalna CEF vrednost: temperatura kolone 20°C, pH 3, koncentracija KH_2PO_4 1,2 g/l i koncentracija Na-PS od 1,11 g/l. Navedeni uslovi omogućavaju efikasno razdvajanje svih ispitivanih jedinjenja.
- QSRR studija razvijena je korišćenjem PLS modelovanja kako bi se predvidelo retenciono vreme derivata aripirazola, kao što su jedinjenja koja mogu biti degradacioni proizvodi, nečistoće i metaboliti. Za formiranje QSRR modela korišćeni su podaci o retencionim vremenima (t_r) aripirazola i njegovih nečistoća, kao i vrednosti odabranih značajnih molekulskih deskriptora navedenih jedinjenja: MS, $\log D_{\text{pH}3,0}$, HBA i HBD-HBA. Slaganje dobijenih eksperimentalnih vrednosti t_r sa predviđenim vrednostima potvrdilo je kvalitet, odnosno dobru moć predviđanja razvijenog QSRR modela, što omogućava njegovo korišćenje za procenu t_r drugih jedinjenja strukturno srodnih aripirazolu.
- Razvijena HPLC metoda za analizu nečistoća aripirazola je validirana tj. ispitani su selektivnost, linearnost, preciznost i određeni limiti kvantifikacije i limiti detekcije. Takođe, metoda je primenjena za farmaceutsku analizu nečistoća u aripirazol sirovini i tabletama, kao i za potrebe analize nečistoća tokom ispitivanja stabilnosti. Kao prva metoda koja se odnosi na kvantitativnu analizu devet nečistoća aripirazola, pogodna je za poređenje uzoraka iz različitih izvora.

- Usled osetljivosti na uticaje vlage, kao kontaktna ambalaža za aripiprazol tablete odabran je OPA/Al/PVC//Al blister. Tokom preliminarnih studija stabilnosti primenom stres uslova temperature i Arenijusivog kinetičkog modela izračunata je konstanta brzine reakcije nastajanja ove nečistoće na 25°C (0,0070% mesec⁻¹). Rezultati ispitivanja stabilnosti na pilot serijama aripiprazol tableta potvrdili su rezultate preliminarne stabilnosti. Na osnovu dobijenih vrednosti i pokazane stabilnosti tokom 6 meseci pri ubrzanim i 36 meseci pri dugotrajnim uslovima definisan je način čuvanja „proizvod ne zahteva posebne temperaturne uslove čuvanja; čuvati u originalnom pakovanju u cilju zaštite od vlage“ i rok upotrebe od 4 godine.

6. LITERATURA

- [1] A.S. Narang, D. Desai, S. Badawy, Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. *Pharm Res.* 2012; 29:2660-2683.
- [2] S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation 2005, Taylor & Francis Group, New York, USA
- [3] A.S. Narang, V.M. Rao, K. Raghavan, Excipient Compatibility. In: Y. Qiu, Y. Chen, G. G. Z. Zhang, L. Liu, W. Porter, editors. Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice 2009, Elsevier Inc. New York, USA, 125–146.
- [4] H. Bundgaard, C. Larsen, Kinetics and mechanism of the sucrose accelerated degradation of penicillins in aqueous solution, *Int J Pharm.* 1978;1:95–104.
- [5] R.I. Mahato, A.S. Narang, Pharmaceutical dosage forms and drug delivery 2011, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- [6] K.J. Hartauer, G.N. Arnuthnot, S.W. Beartschi, R.A. Johnson, W.D. Luke, N.G. Pearson, E.C. Rickard, C.A. Tingle, P.K.S. Tsang, Influence of peroxide impurities in povidone and crospovidone on the stability of raloxifene hydrochloride in tablets: identification and control of an oxidative degradation product, *Pharm Dev Technol.* 2000, 5: 303-10.
- [7] C.A. Janicki, H.R. Almond Jr, Reaction of haloperidol with 5-(hydroxymethyl)-2-furfuraldehyde, an impurity in anhydrous lactose, *J Pharm Sci.* 1974;63:41–3.
- [8] J. Mollica, C. Rehm, J. Smith, Hydrolysis of hydrochlorotiazide, *J Pharm Sci.* 1969; 58:1380–4.
- [9] K.C. Waterman, W.B. Arikpo, M.B. Fergione, T.W. Graul, B.A. Johnson, B.C. Macdonald, M.C. Roy, R.J. Timpano, N-methylation and N-formylation of a secondary amine drug (Varenicline) in an osmotic tablet, *J Pharm Sci.* 2008;97:1499–507.
- [10] D. Desai, V. Rao, H. Guo, D. Li, M. Bolgar, Stability of low concentrations of guanine-based antivirals in sucrose or maltitol solutions, *Int J Pharm.* 2007;342:87–94.
- [11] G.A. Digenis, T.B. Gold, V.P. Shah, Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *J Pharm Sci.* 1994;83:915–21.
- [12] S.S. Bharate, S.B. Bharate, A.N. Bajaj, Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review, *Journal of Excipients and Food Chemicals* 2010, 1:3–26.
- [13] J.L. Sims, J.A. Carreira, D.J. Carrier, S.R. Crabtree, L. Easton, S.A. Hancock, C.E. Simcox, A New approach to accelerated drug-excipient compatibility testing, *Pharm.Dev. Technol.* 2003, 8, 119-126.
- [14] B. Tita, A. Fúlias, G. Bandur, E. Marian, D. Tita, Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid doage forms, *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 56: 221-227.
- [15] C.D. Bertol, A.P. Cruz, H.K. Stulzer, F.S. Murakami, M.A.S. Silva, Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions, *J. Therm. Anal. Calorim.* 2010, 102, 187-192.

- [16] S. Thumma, M.A. Repka, Compatibility studies of promethazine hydrochloride with tablet excipients by means of thermal and non-thermal methods, *Pharmazie* 2009, 64, 183-189.
- [17] N. Sarisuta, P. Lawanprasert, S. Puttipipatkachorn, K. Srikummoon, The influence of drug-excipient and drug-polymer interactions on butt adhesive strength of Ranitidine Hydrochloride film-coated tablets, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2006, 32, 463-471.
- [18] R.K. Verma, S. Garg, Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 38, 633-644.
- [19] F.D. Freire, C.F.S. Aragao, T.F. AdLe Moura, F.N. Raffin, Compatibility study between chlorpropamide and excipients in their physical mixtures, *J. Therm. Anal. Calorim.* 2009, 97, 5-357.
- [20] G. Bruni, V. Berbenni, C. Milanese, A. Girella, A. Marini, Drug-excipient compatibility studies in binary and ternary mixtures by physico-chemical techniques, *J. Therm. Anal. Cal.* 2010, 102, 193-201.
- [21] S. Bohanec, T. Rozman Peterka, P. Blažič, R. Jurečič, J. Grmaš, A. Krivec, J. Zakrajšek, Using different experimental designs in drug-excipient compatibility studies during the preformulation development of a stable solid dosage formulation, *Acta Chim.Slov.* 57, 895-903, 2010.
- [22] N. Wyttenbach, C. Birringer, J. Alsenz, M. Kuentz, Drug-excipient compatibility testing using a high-throughput approach and statistical design, *Pharm Dev Technol.* 2005;10:499-505.
- [23] F. Monajjemzadeh, D. Hassanzadeh, H. Valizadeh, M.R. Siahi-Shadbad, J.S. Mojarrad, T.A. Robertson, M.S. Roberts, Compatibility studies of acyclovir and lactose in physical mixtures and commercial tablets, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, (3), 404-413, 2009.
- [24] L.A.E.B. de Carvalho, M.P.M. Marques, J. Tomkinson, Drug-excipient interactions in Ketoprofen: A vibrational spectroscopy study, *Biopolymers* 2006, 82, 420- 424.
- [25] A. Abdoh, M.M. Al-Omari, A.A. Badwan, A.M.Y. Jaber, Amlodipine besylate-excipients interaction in solid dosage form, *Pharm. Dev. Technol.* 2004, 9, 15-24.
- [26] S. Agatonović-Kuštrin, N: Marković, M. Ginić-Marković, M. Mangan, B.D. Glass, Compatibility studies between mannitol and omeprazole sodium isomers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 356-360.
- [27] H.K. Stulzer, P.O. Rodrigues, T.M. Cardoso, J.S.R. Matos, M.A.S. Silva, Compatibility studies between Captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations, *J. Therm. Anal. Cal.* 2008, 91, 323-328.
- [28] W.T. Cheng, S.L. Wang, S.Y. Lin, Solid-state interaction study on the captopril/lubricants systems accelerated by grinding process, *J. Phys. Chem.* 2008, 69, (4), 1007-1016.
- [29] R. Teraoka, Y. Matsushima, I. Sugimoto, K. Inoue, S.Y. Morita, S. Kitagawa, Effect of pharmaceutical excipients on the stability of Trichlormethiazide tablets under humid conditions, *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 57, (12), 1343-1347.
- [30] W.C. Cory, C. Harris, S. Martinez, Accelerated degradation of ibuprofen in tablets, *Pharm. Dev. Technol.* 2010, 15, 636-643.

- [31] A. Stroyer, J.W. McGinity, C.S. Leopard, Solid State Interactions between the Proton Pump Inhibitor Omeprazole and Various Enteric Coating Polymers, *J. Pharm. Sci.* 2006, 95, 1342-1353.
- [32] R.L.O. Rezende, M. I.R.M. Santoro, J.R. Matos, Stability and compatibility study of Enalapril maleate using thermoanalytical techniques, *J. Therm. Anal. Cal.* 2008, 93, 881-886.
- [33] H. Patel, A. Stalcup, R. Dansereau, A. Sakr, The effect of excipients on the stability of levothyroxine sodium pentahydrate tablets, *Int. J. Pharm.* 2003, 264, 35- 43.
- [34] V. Kumar, R.P. Shah, S. Malik, S. Singh, Compatibility of atenolol with excipients: LC-MS/TOF characterization of degradation/interaction products, and mechanisms of their formation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 49, 880-888.
- [35] Huynh-Ba K., Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development 2008, Springer Science Business Media, New York, USA.
- [36] Q3A (R2) ICH Harmonized Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Substances, 2006. Available from:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf
- [37] Q3B (R2) ICH Harmonized Tripartite Guideline, Impurities in New Drug Products, 2006. Available from:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf
- [38] Guidance for Industry, ANDAs: Impurities in Drug Products, FDA Center for Drug Evaluation and Research, 2006. Available from:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072861.pdf>
- [39] S. Gorog. Identification and determination of impurities in drugs 2000, Elsevier, Amsterdam The Netherlands.
- [40] N. Rahman, S. N. H. Azmi, H. Wu, The importance of impurity analysis in pharmaceutical products: an integrated approach, *Accred Qual Assur* 2006, 11: 69-74.
- [41] J. Kowaleski, B. Kraut, A. Mattiuz, M. Giangiulio, G. Brobst, W. Cagno, P. Kulkarni, T. Rauch, Impurities in generics pharmaceutical development, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59: 56-63.
- [42] K.C. Waterman, A. J. Carella, M. J. Gumkowski, P. Lukulay, B. C. Macdonald, M. C. Roy, et al. Improved protocol and data analysis for accelerated shelf-life estimation of solid dosage forms. *Pharm Res.* 2007; 24 (4) 780-790.
- [43] K.C. Waterman, S. T. Colgan, A science-based approach to setting expiry dating for solid drug products, *Regulatory Rapporteur.* 2008, 5(7) 9-14.
- [44] Q. Chan Li, F. Qiu, K. Cohen, T. Tougas, J. Li, J. McCaffrey, T. Purdue, J.J. Song, F. Swanek, S. Abelaira, Best Practices for Drug Substance Stress and Stability Studies During Early-Stage Development Part I - Conducting Drug Substance Solid Stress to Support Phase Ia Clinical Trials, *J Pharm Innov* 2012, DOI 10.1007/s12247-012-9136-8.
- [45] K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv Drug Deliv Rev* 59 (2007) 29-37.

- [46] M. W. Dong, Modern HPLC for Practicing Scientists, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA, 2006.
- [47] S. Ahuja, K.M. Alsante, Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals, Elsevier Science, USA, 2003.
- [48] S. Ahuja, Impurities evaluation of pharmaceuticals, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1998.
- [49] R.M. Veronika, Practical high-performance liquid chromatography, John Wiley & Sons Ltd, UK, 2004.
- [50] S. Ahuja, M.W. Dong, Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC 2005, Elsevier Inc., London, United Kingdom
- [51] Y. Kazakevich, R. LoBrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists 2007, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA
- [52] Q2(R1) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (2005).
- [53] OMCL Network/EDQM of the Council of Europe, PA/PH/OMCL (05) 47 DEF, Guideline on validation of analytical procedures, Strasbourg Cedex 2005.
- [54] J. Mehta, Y. Pancholi, V. Patel, N. Kshatri, N. Vyas, Development and Validation of a Sensitive Stability Indicating Method for Quantification of Levofloxacin related substances and degradation products in pharmaceutical dosage forms, *Int. J. Pharm Tech Res.* 2010, 2(3): 1932-1942.
- [55] S. A. Patil, P. B. Patil, D. B. Shinde, B. R. Chaudhari, A validated stability-indicating HPLC related substances method for rivastigmine tartrate in bulk drug and dosage form, *Int J Pharm Biomed Sci* 2012, 3(3), 122-127.
- [56] A. Sathyaraj, V. Satyanarayana, M. V. Basaveswara Rao, Gradient RP-HPLC method for the determination of Purity and Assay of Raloxifenehydrochloride in Bulk Drug, *Res. J. Chem. Sci.* 2011, Vol. 1(2), 9-16.
- [57] V. A. Chatpalliwar, P. K. Porwal, N. Upmanyu, Validated gradient stability indicating HPLC method for determining Diltiazem Hydrochloride and related substances in bulk drug and novel tablet formulation, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2012; 2(3): 226-237.
- [58] M. A. Khan, S. Sinha, M. Todkar, V. Parashar, K. S. Reddy, U. Kulkarni, Validated HPLC-UV method for simultaneous estimation of Deferasirox and its impurities, *Int J Pharm Biomed Res* 2011, 2(2): 128-134.
- [59] S. Kafkala, S. Matthaiou, P. Alexaki, M. Abatzis, A. Bartzeliotis, M. Katsiabani, New gradient high-performance liquid chromatography method for determination of donepezil hydrochloride assay and impurities content in oral pharmaceutical formulation. *J Chromatogr A.* 2008, 1189(1-2): 392-7.
- [60] S. Wang, D. Zhang, Y. Wang, X. Liu, Y. Liu, L. Xu, Gradient high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of ilaprazole and its related impurities in commercial tablets, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015, 10 (2), 146–151.

- [61] S. Pandey, P. Pandey, D. Mishra, U. K. Singh, A validated stability indicating HPLC method for the determination of process-related impurities in pantoprazole bulk drug and formulations, *Braz. J. Pharm. Sci.* 2013, Vol.49 No.1 175-184.
- [62] N. Rashmitha, H. K. Sharma, K. Mukkanti, Development of Stability indicating HPLC method for the Determination of impurities in Zaleplon, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2012, Vol. 3(4) 1424-1431.
- [63] L.Z. Cao, Q. Fan, X.H. Liu, Z. H. Wang, Ion-pair RP-HPLC simultaneous determination in gradient elution mode of rizatriptan benzoate and its related substances, *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* 2011, Vol. 13, No 2, 274-278.
- [64] N.A. Armstrong, *Pharmaceutical experimental design and interpretation* Second Ed. 2006, Taylor & Francis Group, London, England.
- [65] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikstrom, S. Wold, *Multi-and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I*, Second Ed. 2001, Umetrics Academy, Umeå, Sweden.
- [66] S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental design: a chemometric approach* 1993, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- [67] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikstrom, S. Wold, *Design of Experiments, Principles and Applications*, Third Ed. 2008, Umetrics Academy, Umeå, Sweden.
- [68] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nystrom, J. Pettersen, R. Bergman, *Experimental design and optimization, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1998, 42: 3-40.
- [69] R. H. Myers, D.C. Montgomery, *Response surface methodology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, USA, 2002.
- [70] R. Mason, R. Gunst, J. Hess, *Statistical design and analysis of experiments*, John Wiley & Sons Inc., NJ, USA, 2003.
- [71] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L. A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 2008, 76: 965-977.
- [72] J.C. Berridge, Unattended optimization of reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations using modified simplex algorithm, *J. Chromatogr.* 1982, 244, 1-14.
- [73] T.D. Schlabach, J.L. Excoffier, Multivariate ranking function for optimizing separations. *J. Chromatogr.* 1988, 439: 173-184.
- [74] V.M. Morris, J.G. Hughes, P.J. Marriott, Examination of a new chromatographic function, based on an exponential resolution term, for use in optimization strategies: application to capillary gas chromatography separation of phenols. *J. Chromatogr. A* 1996, 755: 235-243.
- [75] S.L. Morgan, S.N. Deming, Optimization strategies for the development of gas-liquid chromatographic methods. *J. Chromatogr.* 1975, 112: 267-285.
- [76] E.N. Dose, Off-line optimization of gas chromatographic temperature programs. *Anal. Chem.* 1987, 59: 2420-2423

- [77] D. Bylund, A. Bergens, S.R. Jacobson, Optimization of chromatographic response function, empirical modelling and multivariate analysis, *Chromatographia* 1997, 44:74-80.
- [78] J.L. Glajch, J.J. Kirkland, K.M. Squire, J.M. Minor, Optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique, *J. Chromatogr.* 1980, 199: 57-79.
- [79] R.M.B.O. Duarte, A.C. Duarte, A new chromatographic response function for use in size-exclusion chromatography optimization strategies: Application to complex mixtures. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217: 7556-7563.
- [80] B. Jančić Stojanović, T. Rakić, N. Kostić, A. Vemić, A. Malenović, D. Ivanović, M. Medenica, Advancement in optimization tactic achieved by newly developed chromatographic response function: Application to LC separation of raloxifene and its impurities, *Talanta* 2011, 85: 1453-1460.
- [81] T. Rakić, B. Jančić Stojanović, M. Jovanović, A. Malenović, D. Ivanović, M. Medenica, Evaluation of Seven Chromatographic Response Functions on Simulated and Experimentally Obtained Chromatograms in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography System, 2013, *Analytical Letters* 2013, 46: 1198-1212,
- [82] A.M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 75 –106.
- [83] R. Cela, J.A. Martinez, C. Gonzales-Barreiro, M. Lores, Multi-objective Optimisation Using Evolutionary Algorithms: Its Application to HPLC Separations. *Chemometr.Intell. Lab* 2003, 69: 137-156.
- [84] K.H. Esbensen, D. Guyot, F. Westad, L.P. Houmoller, Multivariate Data Analysis: In Practice : an Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design, Fifth Ed. 2002, Camo Process AS Oslo, Norway.
- [85] S.Wold, Chemometrics; what do we mean with it and what do we want from it? *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 30 (1995) 109-115.
- [86] S. Wold, M. Sjostrom, L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2001, 58, 109–130.
- [87] R. Kramer, *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis* 1998, Marcel Dekker, New York, USA.
- [88] K. Heberger, Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships, *J. Chromatogr. A* 2007, 1158: 273-305.
- [89] R. Kaliszan, M.A. van Straten, M. Markuszewski, C.A. Cramers, H.A. Claessens, Review of research on quantitative structure-retention relationships in thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A* 1999, 855: 455-486.
- [90] R. Kaliszan, Quantitative structure-retention relationships, *Anal. Chem.* 1992, 64: 619A-631A.
- [91] R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography: A Chemometric Approach* 1997, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- [92] A.R. Katritzky, V.S. Lobanov, M. Karelson, QSPR: The Correlation and Quantitative Prediction of Chemical and Physical Properties from Structure, *Chem. Soc. Rev.* 1995, 24: 279-287.

- [93] K.K. Sahu, V. Ravichandran, P.K. Jain, S. Sharma, V.K. Mourya, R.K. Agrawal, *Acta Chim. Slov.* 2008, 55: 138–145.
- [94] S.Z. Kovačević, L.R. Jevrić, S.O. Podunavac Kuzmanović, Nataša D. Kalajdzija, E.S. Lončar, Quantitative Structure-Retention Relationship Analysis of Some Xylofuranose Derivatives by Linear Multivariate Method, *Acta Chim. Slov.* 2013, 60, (2), 420–428.
- [95] R. Todeschini, V. Consonni, Handbook of Molecular Descriptors: Methods and Principles in Medicinal chemistry 2000, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- [96] V. Consonni, R. Todeschini, Molecular descriptors. In: T. Puzyn, J. Leszczynski, M.T.D. Cronin, editors. Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications 2009, Springer, New York, USA.
- [97] R. Kaliszan, Quantitative Structure-Retention Relationships (QSRR) in Chromatography III (2000) 4063-4075.
- [98] S. Pous-Torresa, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coquea, Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds: II: Benefits of the simultaneous optimization, *J. Chromatogr. A* 2008; 1193(1–2): 117–128.
- [99] N.M. De Aragão, M.C.C. Veloso, M.S. Bispo, S.L.C. Ferreira, J.B. De Andrade, Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Talanta* 2005; 67(5): 1007–1013.
- [100] R. Petkovska, A. Dimitrovska, Use of chemometrics for development and validation of an RP-HPLC method for simultaneous determination of haloperidol and related compounds, *Acta Pharmaceutica* 2008, 58(3): 243–256.
- [101] R. Petkovska, C. Cornett, A. Dimitrovska, Development and validation of rapid resolution RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and related compounds by use of chemometrics, *Anal. Lett.* 2008, 41(6): 992–1009.
- [102] M. Crevar-Sakač, Z. Vujić, J. Brborić, V. Kuntić, S. Uskoković-Marković, An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocol: Simultaneous Determination of Atorvastatin and Its Metabolites in Plasma, *Molecules* 2013, 18, 2469–2482; doi:10.3390/molecules18032469.
- [103] T. Rakić, I. Kasagić-Vujanović, M. Jovanović, B. Jančić-Stojanović, D. Ivanović, Comparison of Full Factorial Design, Central Composite Design and Box Behnken Design in Chromatographic Method Development for the Determination of Fluconazole and Its Impurities, *Analytical Letters* 2014, 47: 1334–1347.
- [104] Z. Jovic, Lj. Zivanovic, M. Radisic, A. Protic, M. Malesevic, Chemometrically assisted development and validation of LC/UV and LC/MS methods for simultaneous determination of torasemide and its impurities, *Journal of Chromatographic Science* 2012, 50, 324–334.
- [105] B. Jancic-Stojanovic, I. Popovic, A. Malenovic, D. Ivanovic, M. Medenica, Factorial Design in Optimization of Chromatographic Separation of Ramipril and Its Impurities, *Chromatographia* 2010, 71, 799–804.

- [106] I. Kasagić, A. Malenović, M. Jovanović, T. Rakić, B. Jančić Stojanović, D. Ivanović, Chemometrically assisted optimization and validation of RP-HPLC method for the analysis of itraconazole and its impurities, *Acta Pharm.* 2013, Jun;63(2):159-73.
- [107] B. Jančić, D. Ivanović, M. Medenica, A. Malenović, Experimental design in chromatographic analysis of pramipexole and its impurities, *Acta Chim.Slov.* 2007; 54(1): 49–54.
- [108] R. Sathiyasundar, K. Valliappan, An improved RP-HPLC method for the simultaneous estimation of aspirin, atorvastatin and clopidogrel in pharmaceutical formulation using experimental design methodology, *Int J Pharm Pharm Sci* 2014, Vol 6, Issue 11, 279-283.
- [109] R. Ficarra, M.L. Calabrò, P. Cutroneo, S. Tommasini, S. Melardi, M. Semreen, S. Furlanetto, P. Ficarra, G. Altavilla, Validation of a LC method for the analysis of oxaliplatin in a pharmaceutical formulation using experimental design, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002; 29(6): 1097–1103.
- [110] L. Shi-yin, S. Cheng, W. Yu, X. Shi-fen, Y. Shu-chun, W. Lian-sheng, Quantitative structure retention relationship studies for predicting relative retention times of chlorinated phenols on gas chromatography, *Journal of Environmental Sciences* 2002, Volume 14, Issue 3, 418-422.
- [111] X. Liu, H. Tanaka, A. Yamauchi, B. Testa, H. Chuman, Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Influence of 1-octanol in the mobile phase, *J. Chromatogr. A* 2005, 1091: 51-59.
- [112] C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou, Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 2008, 31: 79-96.
- [113] K. Heberger, T. Kowalska, Thermodynamic significance of boiling point correlations for alkylbenzenes in gas chromatography: Extension of Trouton's rule, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 13-20.
- [114] D. A. Hinckley, T. F. Bidleman, W. T. Foreman, J. R. Tuschall, Determination of vapor pressures for nonpolar and semipolar organic compounds from gas chromatographic retention data, *J. Chem. Eng. Data* 35 (1990) 232-237.
- [115] M. Szaleniec, A. Dudzik, M. Pawul, B. Kozik, Quantitative structure enantioselective retention relationship for high-performance liquid chromatography chiral separation of 1-phenylethanol derivatives, *J. Chromatogr. A* 2009, 1216: 6224-6235.
- [116] J. Ghasemi, S. Saaidpour, QSRR Prediction of the Chromatographic Retention Behavior of Painkiller Drugs, *Journal of Chromatographic Science* 2009, Vol. 47, 156-163.
- [117] A. Rajkumar, S. S. Pancholi, Quantitative Structure-Retention Relationship Studies on a Series of 1,2,4-triazoles using HPTLC, *International Journal of Pharmaceutical Erudition* 2014 2(2) 45-56.
- [118] G. Carlucci, A. A. D'Archivio, M. A. Maggi, P. Mazzeo, F. Ruggieri, Investigation of Retention Behaviour of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in High-Performance Liquid Chromatography by Using Quantitative Structure-Retention Relationships, *Anal Chim Acta* 2007, 601(1): 68-76.

- [119] S. Filipić, K. Nikolić, M. Križman, D. Agbaba, The Quantitative Structure–Retention Relationship (QSRR) Analysis of Some Centrally Acting Antihypertensives and Diuretics, *QSAR Comb. Sci.* 27 2008, No. 8, 1036-1044.
- [120] K. Nikolić, M. Pavlović, A. Smolinski, D. Agbaba, The Chemometric Study and Quantitative Structure Retention Relationship Modeling of Liquid Chromatography Separation of Ziprasidone Components, *Comb Chem High Throughput Screen.* 2012, 15 (9):730-44.
- [121] K. Nikolić, S. Filipić, A. Smoliński, R. Kaliszan, D. Agbaba, Partial Least Square and Hierarchical Clustering in ADMET Modeling: Prediction of Blood – Brain Barrier Permeation of α -Adrenergic and Imidazoline Receptor Ligands, *J Pharm Pharm Sci* 2013, 16 (4) 622 - 647.
- [122] T. Durcekova., K. Boronova, J. Mocak, Y. Lehotay, J. Cizmarik, QSRR models for potential local anaesthetic drugs using high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 59, 2012, 209-216.
- [123] K.R. Wadekar, P. Ravi, M. Bhalme, S. Srinivasa Rao, K. V. Reddy, E. Balasubrahmanyam, Evaluating Impurities in Drugs (Part II of III), *Pharmaceutical Technology* 2012, 36 (3), 58-72.
- [124] J.A. Bristol, Annual Reports in Medicinal Chemistry Volume 33, CNS agents 1998, Academic Press, San Diego, USA.
- [125] AHFS Drug Information 2008, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, USA.
- [126] B.G. Katzung, Basic & Clinical Pharmacology, Antipsychotic agents & Lithium 2004, Lange Medical Books/McGraw-Hill, San Francisco, USA.
- [127] J.F. Liegeois, J. Bruhwyler, F. Rogister, J. Delarge, Diarylazepine Derivatives as Potent Atypical Neuroleptic Drugs: Recent Advances. In: A. ur-Rahman, editor. Current Medicinal Chemistry Volumen 1, No 6, 1995, Bentham Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- [128] S. W. Baertschi, H. Brunner, A.C. Bunnell, G.G. Cooke, B. Diserod, D.E. Dorman, P.J. Jansen, C.A.J. Kemp, S.R. Maple, K.A. McCune, J.L. Speakman, Isolation, identification, and synthesis of two oxidative degradation products of olanzapine (LY170053) in solid oral formulations, *J. Pharm. Sci.* 2008, 97, 883–892.
- [129] D. Cui, Y. Li, M. Lian, F. Yang, O. Meng, Development of a simple and stability indicating RP-HPLC method for determining olanzapine and related impurities generated in the preparative process, *Analyst* 2011, 136, 3149-3156.
- [130] R.N. Rao, A.N. Raju, R. Narsimha, G.R. Babu, Isolation and characterization of process related impurities of olanzapine using HPLC and ESI-MS/MS, *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 107-118.
- [131] S.G. Hiriyanna, K. Basavaiah, P.S.K. Goud, V. Dhayanithi, K. Raju, H.N. Pati, Identification and characterization of olanzapine degradation products under oxidative stress conditions, *Acta Chromatographica* 2008, 20, 81-93.
- [132] P.S. Rao, U.K. Ray, S.G. Hiriyanna, S.V. Rao, H.K. Sharma, V.K. Handa, K. Mukkanti, Identification of oxidative degradation impurities of olanzapine drug substance as well as drug product, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 56, 413-418.
- [133] European Pharmacopoeia Ed 7.3, 2012. Council of Europe, Strasbourg, France.

- [134] United States Pharmacopoeia, 34 NF-29, 2011. Olanzapine, US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA pp.3708-3711.
- [135] C.B.V.V.N. Sekhar, R.N. Kumar, A. Chakravarthy, K. Mukkanti, Novel synthetic approaches for the synthesis of antipsychotic drug olanzapine, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2011, 2, 426-432.
- [136] P. Thatipalli, R. Kumar, C. Bulusu, R. Chakka, P.R. Pati, A.A. Yerra, S. Bollikonda, Synthesis and characterisation of impurities of an anti-psychotic drug substance, Olanzapine, *ARKIVOC* 2008, xi 195-201.
- [137] Ch. Krishnaiah, M.V. Murphy, R. Kumar, K. Mukkanti, Development of a stability indicating UPLC method for determining olanzapine and its associated degradation products present in active pharmaceutical ingredients and pharmaceutical dosage forms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 54, 667-673.
- [138] M.J. Peres-Filho, M.P.N. Gaeti, S.R. de Oliveira, R.N. Marreto, E.M. Lima, *J. Therm. Anal. Calorim.* 2011, 104, 255-260.
- [139] T. Hirose, T. Kikuchi, Aripiprazole, a novel antipsychotic agent: dopamine D2 receptor partial agonist, *J Med Invest.* 2005, 52 Suppl: 284-90.
- [140] F. Ardiana, M.L.A.D. Lestari, G. Indrayanto, Aripiprazole In: A.A. Al-Badr, Y. Goldberg, G. Indrayanto, editors. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology Volume 38 2013, Elsevier, San Diego, USA.
- [141] European Pharmacopoeia Ed 8.1, 2014. Council of Europe, Strasbourg, France.
- [142] United States Pharmacopoeia, 37 NF-32, 2014. Aripiprazole, US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA 1831-1832.
- [143] Y. Akamine, N.Yasui-Furukori, M. Kojima, Y. Inoue, T. Uno, A sensitive column-switching HPLC method for aripiprazole and dehydroaripiprazole and its application to human pharmacokinetic studies, *J Sep Sci.* 2010, 33: 3292-8.
- [144] F. Lancelin, K. Djebrani, K. Tabaouti, L. Kraoul, S. Brovedani, P. Paubel, M.L. Piketty, Development and validation of a high-performance liquid chromatography method using diode array detection for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydro-aripiprazole in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008, 867, 15-9.
- [145] K.M. Kirschbaum, M.J. Muller, G. Zernig, A. Saria, A. Mobascher, J. Malevani, C. Hiemke, Therapeutic monitoring of aripiprazole by HPLC with column-switching and spectrophotometric detection, *Clin Chem.* 2005, 51, 1718-21.
- [146] Y. Shimokawa, H. Akiyama, E. Kashiyama, T. Koga, G. Miyamoto, High performance liquid chromatographic methods for the determination of aripiprazole with ultraviolet detection in rat plasma and brain: application to the pharmacokinetic study, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005, 821: 8-14.
- [147] A. Musenga, M.A. Saracino, D. Spinelli, E. Rizzato, G. Boncompagni, E. Kenndler, M.A. Raggi, Analysis of the recent antipsychotic aripiprazole in human plasma by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with diode array detection, *Anal Chim. Acta.*, 2008, 612, 204-11.
- [148] C.J. Tsai, Y.H. Yu, H.J. Chiu, el-W. Loh, J.T. Wang, C.H. Chan, T.H. Lan, The quantitative detection of aripiprazole and its main metabolite by using capillary-electrophoresis, *J Chin Med Assoc.*, 2011, 74, 267-71.

- [149] P.L. Hwang, S.Y. Wei, H.H. Yeh, J.Y. Ko, C.C. Chang, S.H. Chen, Simultaneous determination of aripiprazole and its active metabolite, dehydroaripiprazole, in plasma by capillary electrophoresis combining on-column field-amplified sample injection and application in schizophrenia, *Electrophoresis.*, 2010, 31, 2778-86.
- [150] M. Caloro, L. Lionetto, I. Cuomo, A. Simonetti, D. Pucci, S. De Persis, B. Casolla, G.D. Kotzalidis, A. Sciarretta, S. De Filippis, M. Simmaco, P. Girardi, An improved simple LC-MS/MS method for the measurement of serum aripiprazole and its major metabolite, *J Pharm Biomed. Anal.* 2012, 62, 135-9.
- [151] E. Choong, S. Rudaz, A. Kottelat, D. Guillarme, J.L. Veuthey, C.B. Eap, Therapeutic drug monitoring of seven psychotropic drugs and four metabolites in human plasma by HPLC-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 50,1000-8.
- [152] S.N. Lin, L. Lamm, T.F. Newton, M.S. Reid, D.E. Moody, A. Foltz, A liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantitation of aripiprazole in human plasma, *J Anal Toxicol.* 2009, 33,237-42.
- [153] M. Song, X. Xu, T. Hang, A. Wen, L. Yang, Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of aripiprazole and dehydroaripiprazole in human plasma, *Anal Biochem.* 2009, 385, 270-7.
- [154] M. Kubo, Y. Mizooku, Y. Hirao, T. Osumi, Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantitative determination of aripiprazole and its main metabolite, OPC-14857, in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005, 822, 294-9.
- [155] X.C. Zuo, F. Wang, P. Xu, R.H. Zhu, H.D. Li, LC-ESI-MS for Rapid and Sensitive Determination of Aripiprazole in Human Plasma, *Chromatographia* 2006, 64, 387-391.
- [156] K.Y. Li, Y.G. Zhou, H.Y. Ren, F. Wang, B.K. Zhang, H.D. Li, Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of atypical antipsychotics and some metabolites in in vitro samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007, 850, 581-5.
- [157] H.C. Huang, C.H. Liu, T.H. Lan, T.M. Hu, H.J. Chiu, Y.C. Wu, Y.L. Tseng, Detection and quantification of aripiprazole and its metabolite, dehydroaripiprazole, by gas chromatography-mass spectrometry in blood samples of psychiatric patients, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007, 856, 57-61.
- [158] Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review(s), FDA Center for Drug Evaluation and Research, 2001, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2002/21-436_Abilify_biopharmr_P1.pdf
- [159] H.S. Patle, A.V. Chandewar, M.D. Kshirsagar, Development and Validation of UV Spectrophotometric Determination of Aripiprazole in Bulk and Tablet Formulation, *Int.J.Curr.Pharm.Res.* 2011, 3, 59-61.
- [160] R. Kalaichelvi, B. Thangabalan, D. Srinivasa Rao, E. Jayachandran, UV Spectrophotometric Determination of Aripiprazole in Bulk and Pharmaceutical Formulation, *E-Journal of Chemistry* 2009, 6, S87-S90.
- [161] D. Asangil, H.I. Tasdemir, E. Kılıc, Adsorptive stripping voltammetric methods for determination of aripiprazole, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2012, 2, 193–199.
- [162] Z.R. Dedania, R. Dedania, N. Sheth, B. Gajra, J. Patel, Development and Validation of A Stability-Indicating High Performance Liquid Chromatography Assay For Aripiprazole In Bulk Drug Substance, *Asian J Pharm Biol Res* 2011, 1(2): 123-8.

- [163] G. Raveendra Babu, J. Srinivasa Rao, K. Suresh Kumar, P. Jayachandra Reddy, Stability indicating Liquid Chromatographic Method for Aripiprazole, *Asian J. Pharm. Ana.* 2011,1, 03-07.
- [164] B. Bhanotu, P. Srinath, J. Kedarnath, Development, Estimation and Validation of Aripiprazole in Bulk and Its Pharmaceutical Formulation by HPLC Method, *Int.J. ChemTech Res.* 2012, 4(1): 124-8.
- [165] P. Nerkar, P. Gide, A. Chitnis, H. Mahajan, S. Gattani, Development of Stability Indicating Reverse Phase HPLC Method for Aripiprazole from Solid Dosage form, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* 2009, 2(2): 572-581.
- [166] K.S.V. Srinivas, R. Buchireddy, G. Madhusudhan, K. Mukkanti, P. Srinivasulu, Stress Degradation Studies on Aripiprazole and Development of a Validated Stability Indicating LC Method, *Chromatographia* 2008, 68, 635-640.
- [167] N.R. Pai, D.S. Dubhashi, Development of stability indicating, validated HPLC method for quantitative determination of aripiprazole and its impurities, *Der Pharmacia Lettre* 2010, 2, 1-10.
- [168] G.V.R. Reddy, A.P. Kumar, B.V. Reddy, P. Kumar, H.D. Gauttam, Identification of degradation products in aripiprazole tablets by LC-QToF mass spectrometry, *Eur. J. Chem.* 2010, 1, 20-27.
- [169] ACD/ChemSketch program, version 11.01, Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto, ON, Kanada, 2014.
<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>
- [170] MarvinSketch 5.5.1.0 program, ChemAxon, Budapest, Hungary, 2011.
- [171] SIMCA P+ program, Version 12.0, Umetrics AB, Umea, Sweden, 2008.
- [172] A. Tropsha, Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inf.* 2010, 29, 476-488.
- [173] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method, *J. Comput. Chem.* 1989, 10, 209-220.
- [174] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications, *J. Comput. Chem.* 1989, 10, 221-264.
- [175] CS Chem3D Ultra 7.0 (Property Picker ActiveX Control), Cambridge Soft Corporation, 100 Cambridge Park Dr. Cambridge, MA 02140-2317 U.S.A., 2001.
- [176] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A.Jr. Montgomery, R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B.G. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, M.H. Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, Gaussian 98 (Revision A.7), Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [177] A.D. Becke, Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange, *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 5648-5652.

- [178] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density, *Phys. Rev.* 1988, B37, 785-789.
- [179] S. Airaksinen, M. Karjalainen, A. Shevchenko, S. Westermarck, E. Leppanen, J. Rantanen, J. Yliruusi. Role of water in the physical stability of solid dosage form formulations. *J Pharm Sci* 2005; 94: 2147–65.
- [180] M.J. Peres-Filho, M.P.N. Gaeti, S.R. de Oliveira, R.N. Marreto, E.M. Lima, Thermoanalytical investigation of olanzapine compatibility with excipients used in solid oral dosage forms, *J. Therm. Anal. Calorim.* 2011, 104, 255-260.
- [181] R. Jain, A.S. Railkar, A.W. Malick, C.T. Rhodes, N.H. Shah, 1998. Stab in presence of hydrous and anhydrous lactose, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998, 46, 177-182.
- [182] C.L. Perrin, O. Nuiiez, Absence of Stereoelectronic Control in Hydrolysis of Cyclic Amidines, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 5997-6003
- [183] R.J. Smith, M.L. Webb, *Analysis of drug impurities* 2007, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- [184] A.S. Fayed, S.A. Weshahy, M.A. Shehata, N.Y. Hassan, J. Pauwels, J. Hoogmartens, A.V. Schepdael, Separation and determination of clopidogrel and its impurities by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 49, 193–200.
- [185] Q1E ICH Harmonized Tripartite Guideline: Evaluation for Stability Data, 2003. Available from:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1E/Step4/Q1E_Guideline.pdf

7. PRILOZI

PRILOG A

Tabela 31. Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/01, ubrzani uslovi (40°C/75% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)		
		0	3	6
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	4 minuta	5 minuta	3 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	47-68 N	66-81 N	61-69 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	98,2-104,4%	95,2-100,1%	91,6-96,8%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	100,8 %	99,4%	97,0%
Degradacioni proizvodi				
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,01%	0,41%	0,81%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,01%	0,09%	0,14%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,11%	0,69%	1,13%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	odgovara
Napomene: -				

Tabela 32. Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/02, ubrzani uslovi (40°C/75% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)		
		0	3	6
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	3 minuta	3 minuta	2 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	50-65 N	64-71 N	48-62 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	99,7-102,1%	97,1-102,4%	93,3-95,8%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	100,2 %	99,2%	98,6%
Degradacioni proizvodi				
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,01%	0,40%	0,75%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,01%	0,09%	0,14%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,13%	0,67%	1,07%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	odgovara
Napomene: -				

Tabela 33. Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/01, intermedijerni uslovi (30°C/65% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		0	3	6	9	12
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	4 minuta	4 minuta	3 minuta	3 minuta	3 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	47-68 N	50-65 N	51-66 N	46-68 N	49-78 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	98,2-104,4%	95,6-102,9%	92,0-96,2%	96,9-101,4%	96,7-101,3%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	100,8 %	98,4%	99,4%	97,8%	97,8%
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,01%	0,11%	0,20%	0,30%	0,41%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,01%	0,05%	0,06%	0,07%	0,11%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,11%	0,35%	0,46%	0,59%	0,81%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	-	-	odgovara
Napomene: -						

Tabela 34. Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/02, intermedijerni uslovi (30°C/65% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		0	3	6	9	12
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	3 minuta	2 minuta	2 minuta	2 minuta	3 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	50-65 N	62-66 N	49-54 N	54-82 N	45-54 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	99,7-102,1%	98,7-103,6%	93,8-97,2%	100,8-103,8%	98,3-102,3%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	100,2 %	99,8%	100,2%	96,8%	99,8%
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,01%	0,11%	0,19%	0,28%	0,43%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,01%	0,05%	0,06%	0,06%	0,11%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,13%	0,35%	0,46%	0,55%	0,80%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	-	-	odgovara
Napomene: -						

Tabela 35. Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/01, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		0	3	6	9	12
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	4 minuta	3 minuta	4 minuta	3 minuta	3 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	47-68 N	49-72 N	52-64 N	55-82 N	46-68 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	98,2-104,4%	97,1-99,9%	92,6-97,2%	95,9-99,8%	97,4-104,3%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	100,8 %	98,2%	99,0%	98,8%	98,6%
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,01%	0,06%	0,09%	0,14%	0,20%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,01%	0,04%	0,04%	0,04%	0,08%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,11%	0,27%	0,32%	0,39%	0,55%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	-	-	odgovara
Napomene: -						

Tabela 35. (nastavak) Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/01, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)		
		18	24	36
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	4 minuta	3 minuta	2 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	55-75 N	54-67 N	47-60 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	97,5-102,4%	88,0-93,3%	94,3-98,8%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	97,4%	96,8%	95,8%
Degradacioni proizvodi				
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,28%	0,40%	0,48%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,08%	0,11%	0,12%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,61%	0,74%	0,86%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	odgovara	odgovara
Napomene: -				

Tabela 36. Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/02, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		0	3	6	9	12
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	3 minuta	3 minuta	2 minuta	3 minuta	3 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	50-65 N	58-70 N	47-62 N	51-58 N	43-63 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	99,7-102,1%	96,2-99,2%	94,7-97,8%	97,6-102,2%	100,5-101,9%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	100,2 %	100,0%	100,6%	99,8%	101,4%
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,01%	0,06%	0,14%	0,14%	0,20%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,01%	0,05%	0,05%	0,04%	0,08%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,13%	0,28%	0,40%	0,39%	0,54%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	-	-	odgovara
Napomene: -						

Tabela 36. (nastavak) Rezultati ispitivanja Olanzapin 5 mg film tableta, šarža L₁ – 3047/02, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)		
		18	24	36
Izgled	okrugle bikonveksne tablete bele do skoro bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje	okrugle bikonveksne tablete bele boje
Raspadljivost	30 minuta	3 minuta	2 minuta	3 minuta
Čvrstina	ne manje od 40 N	59-71 N	57-77 N	48-55 N
Ispitivanje brzine rastvaranja - Olanzapin	ne manje od 75% (Q) za 30 minuta	96,7-102,4%	97,9-102,0%	97,1-101,4%
Sadržaj - Olanzapin	95-105% deklarisanog sadržaja	99,2%	97,8%	97,8%
Degradacioni proizvodi				
- Nečistoća III	ne više od 0,50%	0,27%	0,38%	0,46%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	0,08%	0,10%	0,16%
- Ukupne	ne više od 1,5%	0,58%	0,73%	0,97%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	odgovara	odgovara
Napomene: -				

PRILOG B

Tabela 37. Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/01, ubrzani uslovi (40°C/75% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)		
		0	3	6
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	2 minuta	1 minut	1 minut
Čvrstina	ne manje od 10 N	18-24 N	16-22 N	18-24 N
Voda	ne više od 3,0%	2,1%	2,0%	2,7%
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	99% (97-102%)	102% (100-103%)	100% (98-101%)
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	100,3 %	99,9%	100,2%
Degradacioni proizvodi				
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	odgovara
Napomene: -				

Tabela 38. Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/02, ubrzani uslovi (40°C/75% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)		
		0	3	6
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	1 minut	1 minut	1 minut
Čvrstina	ne manje od 10 N	17-23 N	18-22 N	16-24 N
Voda	ne više od 3,0%	2,3%	2,2%	2,1%
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	98% (96-100%)	101% (100-102 %)	101% (100-102 %)
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	100,1 %	100,7%	98,9%
Degradacioni proizvodi				
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	odgovara
Napomene: -				

Tabela 39. Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/03, ubrzani uslovi (40°C/75% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)		
		0	3	6
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	< 1 minut	< 1 minut	< 1 minut
Čvrstina	ne manje od 10 N	23-29 N	22-28 N	22-29 N
Voda	ne više od 3,0%	2,3%	1,9%	2,4%
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	100% (98-102%)	102% (101-104%)	102% (102-103%)
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	101,1 %	100,3%	101,4%
Degradacioni proizvodi				
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	odgovara
Napomene: -				

Tabela 40. Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/01, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		0	3	6	9	12
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	2 minuta	1 minut	2 minuta	2 minuta	1 minut
Čvrstina	ne manje od 10 N	18-24 N	17-22 N	17-21 N	18-23 N	17-22 N
Voda	ne više od 3,0%	2,1%	1,8%	1,7%	1,8%	1,9%
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	99% (97-102%)	101% (100-102%)	101% (99-103%)	101% (100-103%)	99% (98-101%)
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	100,3 %	100,5%	100,6%	100,2%	99,7%
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	-	-	odgovara
Napomene: -						

Tabela 40. (nastavak) Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/01, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		18	24	36	48*	60*
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama		
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	1 minut	1 minut	< 1 minuta		
Čvrstina	ne manje od 10 N	15-25 N	17-22 N	16-24 N		
Voda	ne više od 3,0%	2,0%	2,1%	2,2%		
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	100% (99-103%)	99% (98-100%)	100% (99-101%)		
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	98,9 %	99,6%	100,7%		
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	-	odgovara	odgovara		

Napomene: * Uzorci izlaze iz testa jula 2015 i jula 2016. godine.

Tabela 41. Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/02, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		0	3	6	9	12
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	1 minut	1 minut	1 minut	1 minut	1 minut
Čvrstina	ne manje od 10 N	17-23 N	15-22 N	16-27 N	17-23 N	17-23 N
Voda	ne više od 3,0%	2,3%	2,0%	2,0%	1,9%	2,0%
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	98% (96-100%)	101% (100-103%)	100% (98-102%)	102% (101-103%)	99% (98-100%)
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	100,1 %	100,8%	100,1%	101,1%	99,3%
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	-	-	odgovara
Napomene: -						

Tabela 41. (nastavak) Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/01, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		18	24	36	48*	60*
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama		
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	1 minut	1 minut	< 1 minuta		
Čvrstina	ne manje od 10 N	17-23 N	18-22 N	13-19 N		
Voda	ne više od 3,0%	2,1%	2,1%	2,3%		
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	99% (97-100 %)	98% (97-100%)	99% (99-101%)		
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	100,0 %	99,2%	99,9%		
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	-	odgovara	odgovara		

Napomene: * Uzorci izlaze iz testa jula 2015 i jula 2016. godine.

Tabela 42. Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/03, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		0	3	6	9	12
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	<1 minut	<1 minut	<1 minut	<1 minut	<1 minut
Čvrstina	ne manje od 10 N	23-29 N	20-28 N	23-30 N	20-28 N	20-26 N
Voda	ne više od 3,0%	2,3%	1,9%	2,2%	2,0%	2,9%
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	100% (98-102%)	102% (100-103%)	100% (99-101%)	102% (101-103%)	100% (99-101%)
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	101,1 %	100,7%	101,7%	100,7%	100,3%
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	odgovara	-	-	-	odgovara
Napomene: -						

Tabela 42. (nastavak) Rezultati ispitivanja Aripiprazol 10 mg tableta, šarža P – RS0037/10/01, dugotrajni uslovi (25°C/60% RH)

Test	Kriterijum prihvatljivosti	Dužina kondicioniranja (meseći)				
		18	24	36	48*	60*
Izgled	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama	okrugle ravne tablete svetlo roze boje sa razbacanim tačkicama		
Raspadljivost	ne više od 15 minuta	<1 minut	<1 minut	<1 minut		
Čvrstina	ne manje od 10 N	22-27 N	20-26 N	21-25 N		
Voda	ne više od 3,0%	2,1%	2,1%	2,4%		
Ispitivanje brzine rastvaranja - Aripiprazol	ne manje od 75% (Q) za 45 minuta	100% (98-102%)	98% (97-99%)	99% (98-99%)		
Sadržaj - Aripiprazol	95-105% deklarisanog sadržaja	102,0 %	99,4%	100,5%		
Degradacioni proizvodi						
- Nečistoća VIII	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Nečistoća IX	ne više od 0,50%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Nespecificirane, pojedinačno	ne više od 0,20%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
- Ukupne	ne više od 1,5%	< 0,10%	< 0,10%	< 0,10%		
Mikrobiološka čistoća	prema Ph.Eur. 5.1.4.	-	odgovara	odgovara		

Napomene: * Uzorci izlaze iz testa jula 2015 i jula 2016. godine.

8. BIOGRAFIJA

Nataša Đorđević Filijović je rođena 4. novembra 1975. godine u Vršcu gde je završila osnovnu i srednju školu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1994/95. godine, a diplomirala je 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,84. Diplomski rad odbranila je na Katedri za farmakokinetiku sa ocenom 10. Kao student bila je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije, a zatim i Fondacije Hemofarm. Dobitnik je Oktobarske nagrade grada Vršca 1999. godine za najboljeg studenta.

Stručni ispit za diplomirane farmaceute u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije položila je 2002. godine. Akademske specijalističke studije iz Farmakoeconomije i farmaceutske legislative na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/05. godine, a specijalistički rad sa temom „Patenti – put ka razvoju novog leka“ odbranila je 2006. godine. Od juna 2014. godine poseduje sertifikat za „Six Sigma Green Belt“ izdat od strane Američke asocijacije za kvalitet (ASQ CSSGB).

Doktorske studije iz Farmaceutske hemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2006/07. godine.

Od jula 2001. godine je zaposlena u Hemofarmu AD, farmaceutskoj kompaniji iz Vršca, koja je od 2006. godine članica nemačke STADA grupacije. U periodu od 2001. do 2002. godine radila je kao stručni saradnik u Hemofarm proizvodnji, a od 2002. do 2007. godine kao viši i samostalni stručni saradnik u Istraživanju i razvoju. Od septembra 2007. godine obavlja poslove šefa Odeljenja stabilnosti u Istraživanju i razvoju. U okviru tima koji se bavi razvojem farmaceutskih proizvoda učestvuje u planiranju, osmišljavanju i izvođenju ispitivanja kompatibilnosti i stabilnosti u svim fazama razvoja, kao i definisanju specifikacija. Bavi se problematikom ispitivanja nečistoća i degradacionih proizvoda u sirovinama i farmaceutskim preparatima i koristi savremene principe dizajna eksperimenata i hemometrije u procesu razvoja novih farmaceutskih oblika.

Do sada je objavila 3 naučna rada u časopisima međunarodnog značaja i učestvovala na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja sa saopštenih 6 radova štampanih u izvodu. Održala je 5 usmenih izlaganja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Tečno govori engleski jezik i služi se nemačkim i francuskim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Наташа Ђорђевић Филијовић

број уписа 85/06

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација и процена критичних параметара стабилности таблета оланзапина и арипипразола применом експерименталног дизајна

- 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/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01. 10. 2015.

Наташа Ђорђевић Филијовић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Наташа Ђорђевић Филијовић

Број уписа 85/06

Студијски програм докторске академске студије из фармацеутске хемије

Наслов рада Карактеризација и процена критичних параметара стабилности таблета оланзапина и арипипразола применом експерименталног дизајна

Ментор др сц. Катарина Николић, доцент и др сц. Даница Агбаба, редовни професор

Потписани/а Наташа Ђорђевић Филијовић

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, 01.10.2015.

Н. Ђорђевић Филијовић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Карактеризација и процена критичних параметара стабилности таблета оланзапина и арипипразола применом експерименталног дизајна

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

Потпис докторанда

У Београду, 01. 10. 2015.

А. Ђорђевић