

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Anja R. Tumpa

**TEORIJSKI I EMPIRIJSKI MODELI U MODELOVANJU  
RETENCIONOG PONAŠANJA OLANZAPINA U TEČNOJ  
HROMATOGRAFIJI HIDROFILNIH INTERAKCIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Anja R. Tumpa

**MODELING OF RETENTION BEHAVIOR OF  
OLANZAPINE IN HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID  
CHROMATOGRAPHY USING THEORETICAL AND  
EMPIRICAL MODELS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

**Komisija**

---

**Dr Mirjana Medenica, *redovni profesor u penziji, predsednik komisije***

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

**Dr Biljana Stojanović, *vanredni profesor, mentor***

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

**Dr Zorica Stanimirović, *vanredni profesor, član komisije***

Univerzitet u Beogradu – Matematički fakultet

Datum odbrane

Beograd, \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

Doktorska disertacija urađena je na Katedri za analitiku lekova i delom na Katedri za fizičku hemiju i instrumentalne metode Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Prof. dr Biljani Stojanović, mom mentoru prvo na diplomskom radu a zatim i na doktorskim studijama, iskazujem neizmernu zahvalnost za stručno vođenje i prijateljsku podršku od poslednje godine fakulteta do danas: od ideje, preko realizacije do samog pisanja doktorske disertacije.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Zorici Stanimirović na neposrednom angažovanju i korisnim sugestijama prilikom sprovođenja matematičkog dela doktorske disertacije na Katedri za numeričku matematiku i optimizaciju Matematičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Prof. dr Mirjani Medenici želim da se iskreno zahvalim na zalaganju i dragocenim savetima koji su omogućili uspešno usmeravanje izrade i oblikovanja disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj sestri, roditeljima i Vojinu na pruženoj nesebičnoj ljubavi, motivaciji, razumevanju i brižnosti.

Doktorsku disertaciju posvećujem baki i deki, prosvetnim radnicima u penziji, koji su u najvećoj meri doprineli razvijanju moje ljubavi prema knjizi i učenju.

## **Teorijski i empirijski modeli u modelovanju retencionog ponašanja olanzapina u tečnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija**

### **Rezime**

Poslednju deceniju susrećemo se sa brojnim izazovima kada je u pitanju analitika različitih analita primenom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC*). Uprkos stalnom porastu broja publikovanih radova i dalje se sa sigurnošću ne može predvideti ponašanje različitih analita u ovom sistemu hromatografije. Odgovor leži u složenosti retencionih mehanizama, te su i dalje neophodna naučna istraživanja koja omogućavaju da se ovaj hromatografski sistem detaljno prouči. Shodno tome, cilj ove doktorske disertacije bio je da se primene teorijski i empirijski modeli u cilju definisanja retencionog ponašanja strukturno sličnih analita (olanzapina i njegovih srodnih supstanci) u HILIC sistemu, kao i da se stečena znanja primene kroz odgovarajuću primenu nove metode. Ispitivana smeša analita olanzapina i njegovih osam srodnih supstanci po prvi put je ispitivana u HILIC sistemu u ovoj doktorskoj disertaciji. Pored toga, dve srodne supstance (2 i 8) predstavljaju supstance koje se po prvi put hromatografski opisuju i za koje ne postoje literaturni podaci.

U okviru preliminarnih ispitivanja ispitane su četiri HILIC stacionarne faze (silika, diolna, cijano i cviterjonska) pod istim hromatografskim uslovima, čime je omogućeno donošenje preliminarnih zaključaka o uticaju fizičko-hemijskih karakteristika stacionarne faze, kao i analita na retenciono ponašanje u HILIC sistemu.

U sledećoj fazi istraživanja, pristupilo se ispitivanju uticaja polarnije komponente mobilne faze (vodeni rastvor pufera), kako bi se dobile informacije o mehanizmima koji su uključeni u celokupan proces retencionog ponašanja. Izvršeno je fitovanje dobijenih rezultata retencionih vremena u teorijske (adsorpcioni, particioni, mešoviti i kvadratni model) i eksperimentalne (Neue model) matematičke modele. Za ocenu podobnosti matematičkih modela koristili su se koeficijent determinacije ( $R^2$ ) i unakrsno validirani

koeficijent determinacije ( $Q^2$ ) kao statistički parametri koji opisuju kvalitet matematičkog modela.

Kako postojeći matematički modeli nisu dali zadovoljavajuću pogodnost, u sledećem delu doktorske disertacije pristupilo se kreiranju splajn interpolacionog modela čija je primena za modelovanje hromatografskog ponašanja analita prvi put opisana u ovoj doktorskoj disertaciji. Izračunate vrednosti za  $R^2$  i  $Q^2$  koeficijente pokazali su da splajn dobro opisuje ispitivani hromatografski sistem, kao i da se može koristiti za predviđanje retencionog ponašanja ispitivanih analita u HILIC sistemu.

Nakon teorijskih ispitivanja retencionih mehanizama, u sledećem delu doktorske disertacije, za smešu olanzapina i sedam srodnih supstanci, razvijena je HILIC metoda sa UV detekcijom uz gradijentno eluiranje u skladu sa AQbD (eng. *Analytical Quality by Design*) konceptom. Ovo je prvi put da je u naučnoj literaturi opisana primena AQbD principa za razvoj gradijentne HILIC metode. Prolazeći kroz dobro definisane faze ovog naučnog koncepta uz korišćenje pogodnog eksperimentalnog dizajna, kreiran je jasno definisan *Design Space*. Konačno, odabrani su optimalni hromatografski uslovi za analizu olanzapina i njegovih srodnih supstanci primenom gradijentne HILIC metode. Na ovaj način razvijena metoda je validirana i primenjena za analizu odgovarajućeg farmaceutskog oblika olanzapina.

Jedna od značajnih prednosti HILIC metode jeste korišćenje rastvarača kompatibilnih sa masenim detektorom. Ova prednost je iskorišćena te je u završnoj fazi ove doktorske disertacije urađen prenos metode na sistem sa masenim detektorom. Transfer je urađen uz pomoć kalkulatora koji je preračunao protok mobilne faze, dužinu trajanja analize i uslove gradijenta u sistemu pod visokim pritiskom (UPLC, eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*). Cilj ovog transfera je bio da se dobije visokoosetljiva metoda kojom je moguće tačno i precizno pratiti promene u stabilnosti olanzapina pod uticajem različitih agenasa. Konačno, kroz postupak validacije metode potvrđena je njena primenljivost za praćenje stabilnosti olanzapina.

**Ključne reči:** olanzapin, tečna hromatografija hidrofilnih interakcija, retencioni mehanizmi, matematički modeli, splajn interpolacija, AQbD, razvoj metode, tandem masena detekcija

**Naučna oblast:** Farmaceutska hemija

**Uža naučna oblast:** Analitika lekova

**UDK broj:** 615.21.2:543.544.122(043.3)

## **Modeling of retention behavior of olanzapine in hydrophilic interaction liquid chromatography using theoretical and empirical models**

### **Abstract**

Over the last decade, we have been facing numerous challenges regarding the analysis of different substances in HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) mode. Despite constant increase in the number of published scientific papers, retention mechanisms still cannot be predicted with great certainty. The answer can be found in the complexity of retention mechanisms, which creates the need for further scientific investigations in order to better understand the system. The goal of this doctoral thesis was to apply theoretical and empirical mathematical models in order to define retention behavior of the structurally similar substances (olanzapine and its related substances), which would help us use gained knowledge for the newly created model. This specific mixture of substances was investigated for the first time in HILIC in this doctoral thesis. Furthermore, two of the related substances (2 and 8) have never been investigated in any chromatography system before.

Through preliminary investigations, four HILIC columns have been tested (silica, diol, cyano-propyl and zwitterionic) under the same chromatographic conditions, which allowed us to make conclusions about the influence of physicochemical characteristics of the columns and substances on the retention behavior in HILIC.

In the next phase, for the purpose of investigating retention mechanisms, the influence of the more polar component of the mobile phase (aqueous buffer solution) on the retention was investigated. Fitting of the obtained results was conducted in the theoretical (adsorption, partition, mixed and quadratic) models and experimental (Neue) models. For the statistical evaluation of the models, coefficient of determination ( $R^2$ ) and coefficient of prediction ( $Q^2$ ) were used.

Since the existing mathematical models did not have sufficient level of fit, in the next phase of the study, spline interpolation model was created. Spline model has never



been used for the modeling of chromatographic behavior, prior to this study. Calculated  $R^2$  and  $Q^2$  values showed a good fit between spline model and complex HILIC system, consequently allowing it to predict retention behavior of the investigated substances in HILIC.

After the theoretical part of the study, in the next phase, a HILIC method with UV detection and gradient elution was developed in line with AQbD (Analytical Quality by Design) concept, for olanzapine and its seven related substances. This is the first time that the use of AQbD concept has been published in the scientific paper for the development of the HILIC method. Going through the well-established steps of this scientific concept and by using the adequate experimental design, Design Space was defined. At the end, optimal chromatographic conditions for the analysis of olanzapine and its related substances were chosen. This HILIC method with gradient elution was furthermore validated and applied for the analysis of the pharmaceutical dosage form of olanzapine.

One of the greatest advantages of HILIC methods is the compatibility of the polar solvents with the mass detector. This advantage was used in the last part of this study, when previously developed HILIC method was transferred to the system coupled with mass detector. Transfer was performed using the calculator which calculated the new mobile phase rate, the duration of the analysis and the gradient conditions for the UPLC system (Ultra Performance Liquid Chromatography). The goal of this transfer was to develop highly sensitive method which could accurately follow stability of olanzapine under different conditions. Finally, after validating the new method, its applicability as the stability indicating method was confirmed.

**Keywords:** Olanzapine, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, retention mechanisms, mathematical models, spline interpolation, AQbD, tandem mass detection

**Research area:** Pharmaceutical chemistry

**Specific research area:** Pharmaceutical analysis

# SADRŽAJ

<b>1. HILIC</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI MODELI</b> .....	<b>2</b>
2.1. Particioni model .....	2
2.2. Adsorpcioni model .....	4
2.3. Mešoviti adsorpciono-particioni model .....	5
2.4. Kvadratni model .....	6
<b>3. EKSPERIMENTALNI MODELI</b> .....	<b>7</b>
<b>4. SPLAJN INTERPOLACIONI MODELI</b> .....	<b>9</b>
<b>5. QUALITY BY DESIGN</b> .....	<b>14</b>
5.1. Definisanje željenih osobina hromatografske metode i kritičnih odgovora hromatografskog sistema .....	17
5.2. Definisanje kritičnih parametara hromatografskog procesa i procena rizika kvaliteta .....	18
5.3. Definisanje prostora znanja i eksperimentalni dizajn .....	18
5.4. Definisanje prostora dizajna .....	19
5.5. Definisanje radnih uslova i procena robusnosti metode .....	20
5.6. Kontrola metode .....	20
5.7. Primena AQbD metodologije .....	20
<b>6. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>22</b>
6.1. Analitika olanzapina .....	22
<b>7. CILJ RADA</b> .....	<b>27</b>
<b>8. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	<b>29</b>
8.1. Aparati i reagensi .....	29
8.2. Standardne supstance .....	32
8.2.1. Hemijska struktura analiziranih supstanci .....	33
8.3. Kompjuterski programi .....	37
8.4. Modelovanje retencionog ponašanja olanzapina i njegovih srodnih supstanci .....	38
8.5. Razvoj hromatografske metode .....	40
8.6. Transfer metode na maseni spektrometar i validacija metode .....	46
8.7. Ispitivanje stabilnosti olanzapina pod uslovima forsirane degradacije.....	50

<b>9. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>51</b>
9.1. Modelovanje retencionog ponašanja teorijskim modelima i nova tehnika splajn interpolacije .....	51
9.1.1. Odabir eksperimentalnih uslova .....	52
9.1.2. Ispitivanje uticaja stacionarne faze na retenciono ponašanje analita .....	54
9.1.3. Modelovanje retencionog ponašanja .....	57
9.1.4. Kreiranje novog empirijskog modela splajn interpolacijom .....	72
9.2. Razvoj HILIC metode za analizu olanzapina i njegovih nečistoća .....	86
9.2.1. Optimizacija metode .....	86
9.2.2. Validacija metode.....	96
9.3. Transfer HILIC metode na LC/MS/MS sistem i validacija metode .....	100
9.3.1. Transfer HILIC metode na LC/MS/MS sistem .....	100
9.3.2. Validacija metode.....	107
9.4. Ispitivanje olanzapina pod <i>stres</i> uslovima primenom LC/MS/MS metode .....	110
<b>10. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>111</b>
<b>11. LITERATURA.....</b>	<b>113</b>
<b>12. PRILOG .....</b>	<b>122</b>
<b>12. BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>126</b>

## 1. HILIC

Tečna hromatografija hidrofilnih interakcija (eng. HILIC, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) je relativno nova metoda u poređenju sa ostalim hromatografskim tehnikama, a njena primena u laboratorijama sve više raste. Pravi dokaz ove tvrdnje jeste broj objavljenih radova koji iz godine u godinu sve više raste [1]. Najveći broj pronađenih radova bavi se primenom HILIC metode u biomedicinskim analizama, zbog njene izvanredne kompatibilnosti sa masenim detektorom [2,3]. Ipak, postoji veliki broj radova i iz oblasti teorije, jer je detaljno razumevanje osnova HILIC metode od ključne važnosti za njenu uspešnu primenu.

Jedan od glavnih fokusa teorijskih istraživanja u oblasti HILIC metoda su mehanizmi razdvajanja, koji su veoma kompleksni, ali još uvek nedovoljno razjašnjeni i, kao takvi, predmet su različitih tumačenja [1]. HILIC se može posmatrati kao vrsta tečne hromatografije normalnih faza (NPLC, *Normal Phase Liquid Chromatography*), gde se zadržavanje, a time i separacija, bazira na površinskoj adsorpciji [4]. Zbog toga je prvo i pretpostavljeno da će dominantan mehanizam retencije u HILIC metodama biti adsorpcija. Ipak, Alpert je izneo zapažanje da se retencioni mehanizam u HPLC i NPLC metodama značajno razlikuje. Particija je retencioni mehanizam koji se javlja u HILIC metodama a ne i u NPLC metodama [5]. Osim ova dva mehanizma razdvajanja (adsorpcija i particija), još dva retencionna mehanizma se mogu ubrojati u osnovne mehanizme koji doprinose ukupnom retencionom zadržavanju u HILIC metodi: jonska izmena (elektrostatičke interakcije) i vodonične veze. Pored toga, još neki dodatni mehanizmi mogu biti uključeni u proces, kao što su dipol-dipol ili čak i hidrofobne interakcije [2–4,6].

## 2. TEORIJSKI MODELI

Teorijski modeli u hromatografiji zasnovani su na termodinamičkim konceptima. Njihova uloga je da razjasne proces razdvajanja analita u mehaničkom smislu, opisujući različite hromatografske retencione mehanizme. Ipak, zbog nedostatka teorijskog znanja o molekulskim parametrima inkorporiranim u modele nisu se pokazali korisnim u praktičnom smislu, odnosno prilikom razvoja hromatografskih metoda [7]. Takođe, kao što je već istaknuto, HILIC retencioni mehanizmi su veoma složeni i nedovoljno rasvetljeni, što dodatno otežava primenu teorijskih modela u predviđanju retencionog mehanizma, kao i razvoj metode. Iz tog razloga se za potrebe razvoja metode kreiraju složeni empirijski modeli dok se teorijski modeli mogu koristiti za sledeće svrhe: produbljivanje teorijskog znanja o retencionim mehanizmima, predviđanje retencionog ponašanja (samo u pojedinim slučajevima) i kvantifikaciju uticaja pojedinačnih faktora mobilne faze na retenciono ponašanje, kao i za praćenje stepena separacije analita.

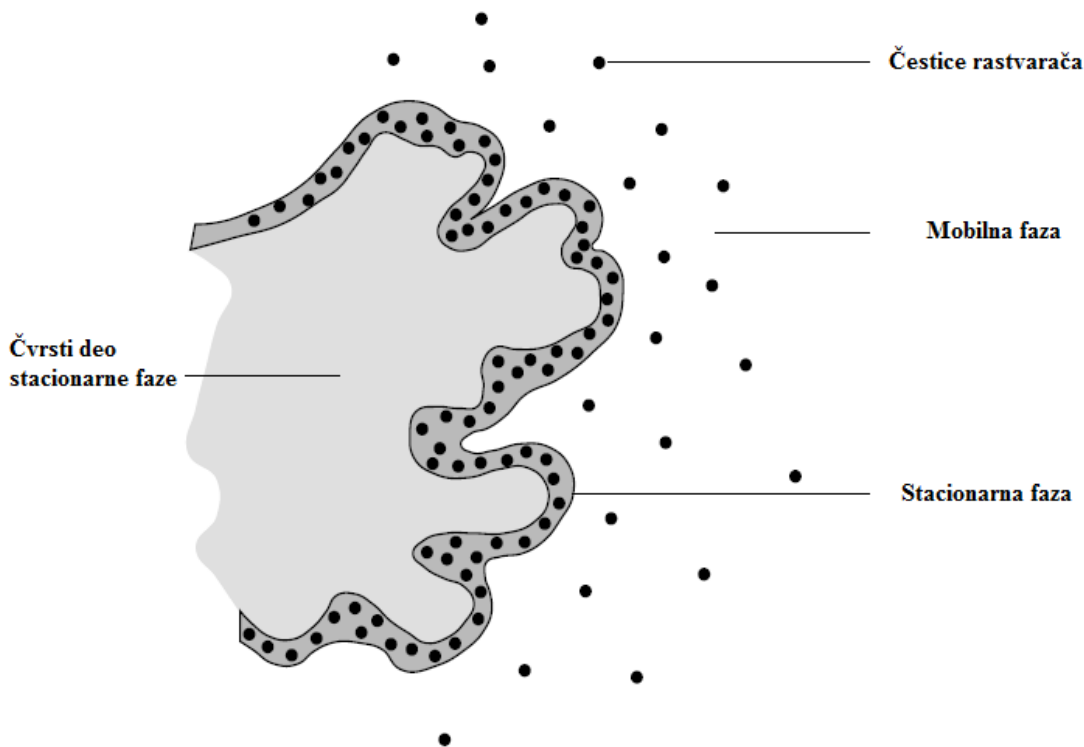
U nastavku ove doktorske disertacije biće opisani i primenjeni sledeći teorijski retencioni modeli: particioni model, adsorpcioni model, mešoviti adsorpciono-particioni model i kvadratni model.

### 2.1. Particioni model

Ovaj model podrazumeva raspodelu molekula analita između mobilne i stacionarne faze, usled različitih tipova molekulskih interakcija koje nastaju između ove dve faze. Proces raspodele je karakterističan za RP-HPLC sistem i prikazan je na slici 1. Odvija se u sledeće tri faze:

- formiranje „šupljina“ u stacionarnoj fazi
- transfer molekula analita iz mobilne faze u „šupljine“

- zatvaranje „šupljina“ koje su nastale usled transfera molekula analita unutar mobilne faze



**Slika 1.** Prikaz procesa raspodele u RP-HPLC sistemima

Glavni mehanizam razdvajanja u reverzno-faznim sistemima je nelokalizovana raspodela sa binarnom, vodeno-organskom mobilnom fazom. U ovom slučaju, zadržavanje analita se smanjuje s povećanjem udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi. Ovaj proces je matematički opisan sledećom jednačinom:

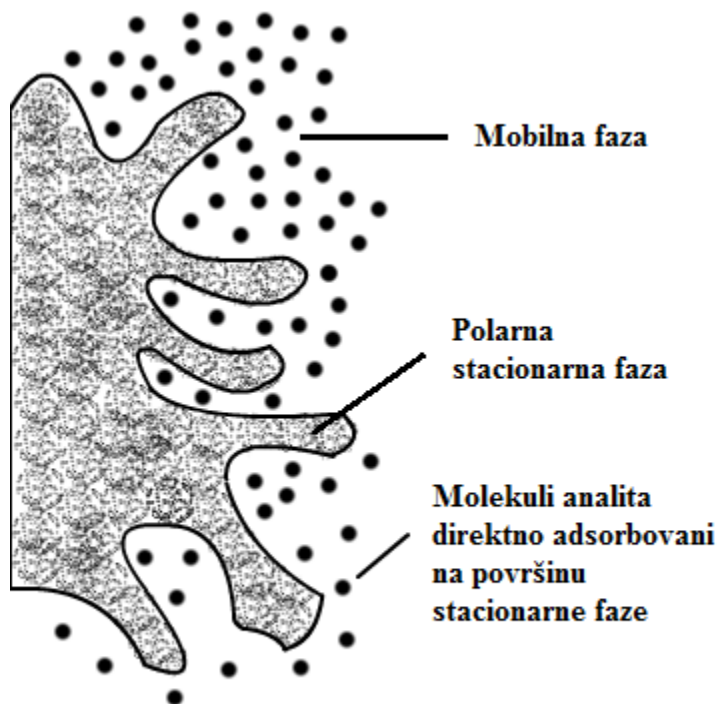
$$\ln k = \ln k_w - S\varphi \quad (1)$$

gde je  $\varphi$  zapreminski udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi,  $k$  retencioni faktor analita,  $k_w$  hipotetički retencioni faktor analita u uslovima kada vodeni deo predstavlja 100% mobilne faze, dok  $S$  opisuje uticaj koncentracije organskog rastvarača u mobilnoj fazi na stepen smanjenja vrednosti retencionog faktora. Ova jednačina dobija drugo značenje kada se primeni na HILIC sistem:  $\varphi$  postaje zapreminski udeo vode (ili vodenog rastvora pufera),

$k_w$  postaje hipotetički retencioni faktor analita u 100% organskom rastvaraču, a  $S$  opisuje uticaj koncentracije vode (ili vodenog rastvora pufera) u mobilnoj fazi na stepen smanjenja retencionog faktora [2].

## 2.2. Adsorpcioni model

Adsorpcioni model se zasniva na pretpostavci da je celokupna površina stacionarne faze prekrivena monoslojem kojeg sačinjavaju molekuli analita i mobilne faze. Da bi se određena zapremina analita zadržala na površini stacionarne faze, mora se sa nje ukloniti ista zapremina mobilne faze [7]. Proces adsorpcije prikazan je na slici 2.



**Slika 2.** Prikaz procesa adsorpcije u NP-HPLC sistemima

U normalno-faznoj tečnoj hromatografiji sa binarnom organskom mobilnom fazom (polarni i nepolarni organski rastvarač), pretpostavlja se da je lokalizovana adsorpcija osnovni mehanizam zadržavanja na stacionarnoj fazi. U tom slučaju, zadržavanje se

smanjuje s povećanjem koncentracije polarnijeg rastvarača. Sa određenim pojednostavljivanjem, lokalizovana adsorpcija se matematički može prikazati sledećim modelom (Snyder-Soczewinski jednačina) [8,9]:

$$\ln k = \ln k_w - S \ln \varphi \quad (2)$$

gde je  $k$  retencioni faktor analita,  $\varphi$  volumenski udeo polarnog organskog rastvarača u mobilnoj fazi,  $k_w$  hipotetički retencioni faktor analita u 100% polarnom organskom rastvaraču i  $S$  opisuje uticaj koncentracije organskog rastvarača u mobilnoj fazi na stepen smanjenja retencionog faktora.

Jedina razlika između NPLC i HILIC sistema je što je polarni organski rastvarač u mobilnoj fazi zamenjen vodom. Samim tim, kao i u prethodnom slučaju, ukoliko se ova jednačina primeni na HILIC,  $\varphi$  postaje volumenski udeo vode (ili vodenog pufera),  $k_w$  postaje retencioni faktor analita u čistom acetonitrilu a  $S$  opisuje uticaj koncentracije vode (ili vodenog pufera) u mobilnoj fazi na stepen smanjenja retencionog faktora.

Proces adsorpcije analita u HILIC sistemima može biti posledica [10]:

- elektrostatičkih interakcija
- hemijskih i fizičkih interakcija (vodonične i dipol-dipol veze, kao i jon-dipol interakcije)

### 2.3. Mešoviti adsorpciono-particioni model

Za HILIC se pretpostavlja da nijedan od ova dva opisana mehanizma (adsorpcija i particija) nije u potpunosti prisutan, odnosno da je za retenciono zadržavanje zadužena kombinacija ova dva mehanizma. Zbog toga nije moguće kreirati savršenu linearnu jednačinu koja bi mogla opisati zavisnost retencije od polarnog rastvarača, kao što bi to bilo moguće u slučaju 100% adsorpcije ili particije [11,12]. Imajući to na umu, Liang i njegovi saradnici su predložili mešoviti model koji opisuje ponašanje polarnih analita u HILIC metodi [11]:



$$\ln k = \ln k_w + S_1 \varphi + S_2 \ln \varphi \quad (3)$$

gde je  $k$  retencioni faktor analita ( $k > 0$ ),  $\varphi$  volumenski udeo vodene komponente u mobilnoj fazi,  $k_w$  hipotetički retencioni faktor analita u 100% nepolarnom organskom rastvaraču ( $k_w > 0$ ), dok su  $S_1$  i  $S_2$  regresioni koeficijenti. Ideja o korišćenju mešovitog modela potekla je od pretpostavke da se debljina vodenog sloja na površini stacionarne faze stalno menja u zavisnosti od odnosa između vodenog i organskog dela mobilne faze, što dovodi do promena u uticaju adsorpcionih i particionih mehanizama u celokupnom HILIC retencionom mehanizmu.

#### 2.4. Kvadratni model

Sve teorije koje se odnose na retenciono ponašanje analita u hromatografskom sistemu predlažu kompleksnije modele za tačnu procenu retencionog ponašanja od prethodno opisanih jednostavnih linearnih modela [13]. Na primer, Bosch-Rosés tim je koristio indeks polarnosti kao meru jačine eluiranja s mobilnom fazom. Ovaj indeks polarnosti pokazuje nelinearnu vezu sa volumenskim udelima rastvarača [14]. Dakle, osim linearnih modela, moguće je koristiti i polinome za bolje opisivanje retencionog ponašanja u HILIC metodi. Schoenmakers i saradnici predložili su sledeći kvadratni model [15]:

$$\ln k = \ln k_w + S_1 \varphi + S_2 \varphi^2 \quad (4)$$

gde je  $k$  retencioni faktor analita ( $k > 0$ ),  $\varphi$  volumenski udeo manje polarnog organskog rastvarača u mobilnoj fazi,  $k_w$  hipotetički retencioni faktor analita u čistom nepolarnom organskom rastvaraču ( $k_w > 0$ ), dok su  $S_1$  i  $S_2$  regresioni koeficijenti. Problem koji se javlja prilikom korišćenja kvadratnih modela jeste da, i u slučaju kada postoji analitičko rešenje za gradijentno eluiranje, ono predstavlja kompleksnu kombinaciju eksponencijalnih funkcija i funkcija greške, što znači da se ne može koristiti u rutinskom predviđanju vremena eluiranja analita kod gradijentnog eluiranja [12].

### 3. EKSPERIMENTALNI MODELI

Klasični model gradijentnog eluiranja pretpostavlja da postoji linearna veza između logaritma retencionog faktora analita i sastava mobilne faze. Ipak, mnoga eksperimentalna istraživanja, kao i teorijske studije, pokazala su da gotovo sve zavisnosti pokazuju zakrivljenost u delu slabijeg retencionog zadržavanja, sa višim vrednostima od onih predviđenih linearnim zavisnostima. Upravo zbog ovog fenomena, postoje pokušaji da se teorijski modeli zamene eksperimentalnim, koji će bolje opisati hromatografski sistem i omogućiti preciznije predviđanje retencionog ponašanja, naročito prilikom gradijentnog eluiranja [16].

Ovu vrstu zakrivljenosti prvi su istraživali Schoenmaker i saradnici (jednačina 4) [15]. Zatim je uveden pojam indeksa polarnosti kao mera eluirajuće sposobnosti reverzno-fazne mobilne faze, s tim da indeks polarnosti nije u linearnoj zavisnosti od zapreminskog sastava mobilne faze [14,17]. Indeks polarnosti za acetonitril–voda mobilne faze može se izračunati primenom sledeće jednačine:

$$P_M^N = 1,00 - 2,068 \varphi / (1 + 1,341 \varphi) \quad (5)$$

gde je  $\varphi$  udeo acetonitrila u mobilnoj fazi, a  $P_M^N$  indeks polarnosti mobilne faze.

Uvođenjem indeksa polarnosti, moguće je opisati retenciju linearnom jednačinom, iako zavisnost nije linearna:

$$\log k = \log k_0 + p_s (P_M^N - P_S^N) \quad (6)$$

gde  $p_s$  i  $P_M^N$  predstavljaju deskriptore polarnosti za analit i mobilnu fazu, a  $\log k_0$  i  $P_S^N$  predstavljaju polarnost stacionarne faze.  $\log k_0$  predstavlja hipotetički retencioni faktor kada su iste polarnosti mobilna i stacionarna faza ( $P_M^N = P_S^N$ ).

Studija Vivo-Truyolsa i saradnika [18] potvrdila je da prethodno predložena zakrivljena zavisnost [14] bolje predviđa retenciono ponašanje širokog spektra analita od klasičnih linearnih jednačina.

Dalje, Neue i Kuss su predložili još jedan empirijski model, koji ima za cilj uspostavljanje precizne zavisnosti logaritma retencionog faktora od sastava mobilne faze, kroz model koji će služiti i za predviđanje retencionog ponašanja prilikom gradijentnog eluiranja, a samo na osnovu izokratskih preliminarnih eksperimentalnih istraživanja [13].

$$k = k_0(1 + S_2 \varphi)^2 \exp(-S_1 \varphi / (1 + S_2 \varphi)) \quad (7)$$

$$\ln k = \ln k_0 + 2 \ln(1 + S_2 \varphi) - (S_1 \varphi / (1 + S_2 \varphi)) \quad (8)$$

gde je  $k_0$  dužina odsečka na y osi,  $S_1$  nagib jednačine a  $S_2$  koeficijent zakrivljenosti. Da bi jednačine 7 i 8 bile korektno definisane, moraju biti zadovoljeni sledeći uslovi:  $k > 0$ ,  $k_0 > 0$  i  $(1 + S_2 \varphi) > 0$ .

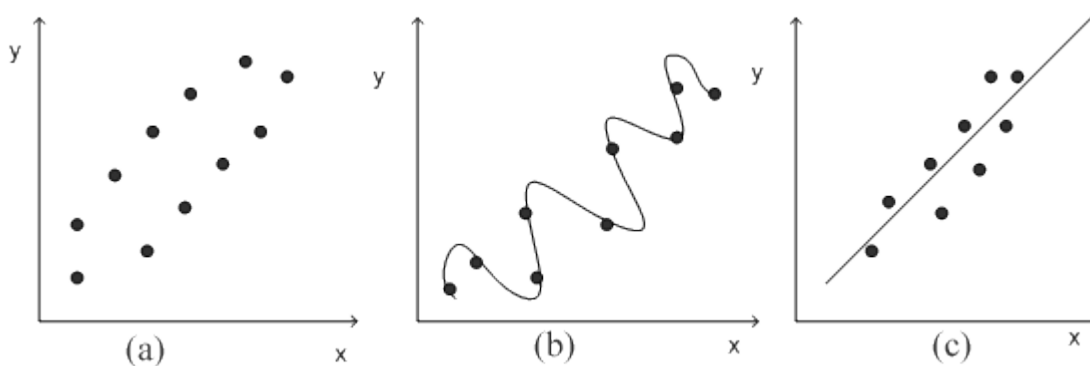
U ovoj disertaciji, osim fitovanja dobijenih rezultata za olanzapin i srodne supstance u različite teorijske modele, biće ispitana i mogućnost primene Neue empirijskog modela za opis kompleksnog HILIC sistema.

#### 4. SPLAJN INTERPOLACIONI MODELI

Svi modeli koji su opisani u dosadašnjem delu disertacije predstavljaju aproksimacione matematičke modele. Metoda interpolacije je takođe jedna od aproksimativnih matematičkih metoda, ali ređe korišćeni pristup za modelovanje hromatografskih odgovora. Ipak, ona je veoma pogodan način za uspostavljanje veze između zavisne promenljive i nezavisnih promenljivih na ograničenom setu podataka, pa će i u ovoj disertaciji biti primenjena za kreiranje modela hromatografskog odgovora.

Interpolacija je jedan vid aproksimacije u kojoj se dve funkcije smatraju bliskim ako se poklapaju u konačno mnogo različitih tačaka, koje se nazivaju čvorovima interpolacije. Ona predstavlja postupak pronalaženja vrednosti neke funkcije  $g(x)$  koja aproksimira funkciju  $f(x)$ ,  $f(x) \approx g(x)$  [19,20].

Do sada smo se uverili da je u HILIC kompleksnim sistemima gotovo nemoguće dobiti rezultate koji će se lako uklopiti u linearne regresione modele (adsorpcioni, particioni, mešoviti modeli). Uglavnom se dobiju „rastureniji“ rezultati koji bi se mogli prikazati dijagramom (a) na slici 3. Ukoliko bi se nad tim podacima vršilo modelovanje linearnom regresijom (metoda linearne regresije ili najmanjih kvadrata), dobila bi se prava linija prikazana na dijagramu (c). Kako je osnovna karakteristika interpolacionih funkcija da prolaze kroz sve eksperimentalne tačke, kriva funkcije će u tom slučaju izgledati kao na dijagramu (b). U analitici lekova i razvoju metode od presudnog je značaja da kreirani modeli što bolje opisuju sistem kako bi se dobili što precizniji rezultati. Zato bi model kreiran kao na dijagramu (b) bio puno kvalitetniji od modela kreiranog kao na dijagramu (c).



**Slika 3.** (a) polazni skup od 9 podataka (tačkaka) (b) interpolacioni polinom stepena 8 (c) aproksimacija pravom (polinomom stepena 1) u smislu metode najmanjih kvadrata (linearnom regresijom)

Interpolacija kao aproksimaciona tehnika uključuje nekoliko osnovnih tipova polinoma [19,21]:

- a) Lagranžov interpolacioni polinom
- b) Njutnov interpolacioni polinom s podjeljenim razlikama
- c) Njutnov interpolacioni polinom s konačnim razlikama (ravnomerno raspoređenim čvorovima) – kada su čvorovi  $x_i$  ravnomerno raspoređeni, umesto podjeljenih koriste se konačne razlike.
- d) Hermitov interpolacioni polinom – ako su u nekim od čvorova interpolacije i izvodi interpolacionog polinoma jednaki odgovarajućim izvodima funkcije koja se interpolira, onda se takav interpolacioni polinom naziva Hermitov interpolacioni polinom.

Sa povećanjem broja čvorova očekuje se da će interpolacija biti preciznija, jer se koristi veći broj informacija o funkciji. Međutim, u praksi se ne postiže očekivano povećanje preciznosti, zbog povećanja stepena polinoma koje dovodi do porasta broja neophodnih računskih operacija, kao i posledičnog kumulovanja grešaka računa koje prate te operacije, jer su ulazni podaci najčešće dati sa izvesnom greškom.

Jedan od načina da se ovaj problem prevaziđe je podela intervala interpolacije  $[a, b]$  na segmente koji su određeni interpolacionim čvorovima  $x_0, x_1, \dots, x_n$ , tako da je  $a \leq x_0 < x_1 < \dots < x_n \leq b$  i izvrši aproksimacija funkcije na svakom od segmenata  $[x_{i-1}, x_i]$ ,  $i = 1, 2, \dots, n$  polinomom relativno malog stepena.

Neka je funkcija  $f(x)$  zadata svojim vrednostima u  $n+1$  tački  $x_0, \dots, x_n$  koje pripadaju segmentu  $[a, b]$ , odnosno, pretpostavimo da su vrednosti  $f(x_i)$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  poznate. Tačke  $x_i$ ,  $i=0, \dots, n$  definišu podelu  $\Delta$  segmenta  $[a, b]$  na podsegmente:

$$S_{\Delta}^m(f, x) = \begin{cases} P_{1m}(x), & x \in [x_0, x_1] \\ \dots & \\ P_{nm}(x), & x \in [x_{n-1}, x_n] \end{cases} \quad (9)$$

U ovom izrazu,  $P_{im}(x) = a_{i0} + a_{i1}x + \dots + a_{im}x^m$  predstavlja polinom stepena  $m$  koji aproksimira funkciju na segmentu  $[x_{i-1}, x_i]$ . Splajn  $S_{\Delta}^m(f, x)$  reda  $m$  mora da zadovolji sledeće uslove:

$$f(x_i) = P_{im}(x_i), \quad i = 0, 1, \dots, n \quad (10)$$

i

$$P_{im}^{(k)}(x_i) = P_{i+1, m}^{(k)}(x_i) \quad k = 0, 1, \dots, m-1, \quad i = 1, 2, \dots, n-1 \quad (11)$$

Drugim rečima, na svakom od segmenata  $[x_{i-1}, x_i]$ ,  $i=1, \dots, n$ , funkcija  $f(x)$  je aproksimirana polinomom reda  $m$ , tako da se vrednost polinoma poklapa sa vrednosti funkcije u svim tačkama  $x_0, \dots, x_n$ , a u unutrašnjim tačkama  $x_1, \dots, x_{n-1}$  se zahteva neprekidnost polinoma, kao i neprekidnost svih izvoda zaključno sa redom  $m-1$ . To znači da je  $S_{\Delta}^m(f, x)$   $m-1$  puta neprekidno diferencijabilna funkcija. Iz ovih razloga, splajn interpolacija je takođe poznata kao glatka izdeljena polinomijalna interpolacija [22].

U zavisnosti od reda korišćenog polinoma, postoje: linearni splajn ( $m = 1$ ), kvadratni splajn ( $m = 2$ ), kubni splajn ( $m = 3$ ) itd. [22]. U praksi se polinomi viših redova od kubnog retko koriste, pošto su efekti splajna uočljiviji kada su konstruktivni polinomi relativno niskog stepena.

Kubna splajn interpolacija je najčešće korišćena u naučnoj literaturi. Ona podrazumeva kreiranje polinoma trećeg reda, što je najčešće dovoljno visok stepen polinoma za dobru splajn aproksimaciju funkcije na svakom od segmenata eksperimentalnog prostora. Sa druge strane, konstruisanje kubnog splajna nije kompleksno i ne zhteva značajne računarske resurse.

Iz navedenih razloga, odlučeno je da će se kubna splajn interpolacija koristiti i u ovoj disertaciji. U skladu sa izrazom 9, kubni splajn se traži u sledećem obliku:

$$S_{\Delta}^3(f, x) = \begin{cases} P_{13}(x) = a_{10} + a_{11}x + a_{12}x^2 + a_{13}x^3, x \in [x_0, x_1] \\ \dots \\ P_{n3}(x) = a_{n0} + a_{n1}x + a_{n2}x^2 + a_{n3}x^3, x \in [x_{n-1}, x_n] \end{cases}, \quad (12)$$

Broj nepoznatih koeficijenata  $a_{ij}$ ,  $i = 1, 2, \dots, n$ ,  $j = 0, 1, 2, 3$  u izrazu (12) je  $4n$ , što znači da nam je potrebno isto toliko jednačina koje definišu veze između  $a_{ij}$ . Imajući u vidu uslove (10), sledeći uslovi moraju biti ispunjeni u interpolacionim čvorovima:

$$P_{i3}(x_i) = f(x_i), \quad i = 0, 1, \dots, n, \quad (13)$$

što obezbeđuje  $n+1$  linearnih jednačina. Zbog zahteva neprekidnosti splajna (11), neophodno je da polinomi, definisani na dva susedna segmenta, imaju istu vrednost u čvorovima koji ih spajaju. Odnosno, neophodno je da u unutrašnjim tačkama podele  $x_1, \dots, x_{n-1}$ :

$$P_{i3}(x_i) = P_{i+1,3}(x_i), \quad i = 1, 2, \dots, n-1, \quad (14)$$

što obezbeđuje dodatnih  $n-1$  linearnih jednačina. Zahtevi neprekidnosti prvih i drugih izvoda (13) vode ka sledećim uslovima u unutrašnjim tačkama:

$$P'_{i3}(x_i) = P'_{i+1,3}(x_i), \quad i = 1, 2, \dots, n-1, \quad (15)$$

i

$$P''_{i3}(x_i) = P''_{i+1,3}(x_i), \quad i = 1, 2, \dots, n-1 \quad (16)$$

što obezbeđuje još  $2n$  linearnih jednačina. Stoga, uslovi od (13) do (16) obezbeđuju  $4n-2$  od potrebnih  $4n$  linearnih jednačina koje su neophodne u cilju obezbeđivanja jedinstvenih rešenja za koeficijente  $a_{ij}$ .

Nedostajuće dve jednačine se najčešće dobijaju iz uslova koje splajn treba da zadovoljava na granici, tj. u krajnjim tačkama:

$$P''_{13}(x_0) = 0, P''_{n3}(x_n) = 0; \quad (17)$$

Ukoliko je pored uslova (13)-(16) zadovoljen i uslov da drugi izvodi splajna u njegovim krajnjim tačkama budu jednaki nuli (uslov (17)), dobijaju se nedostajuće dve jednačine i tako određeni kubni splajn se naziva prirodni splajn.

Periodični kubni splajn se dobija ukoliko je pored uslova (13)-(16) zadovoljen i sledeći uslov:

$$P(x) \text{ i } S_{\Delta}^3(f, x) \text{ su periodične funkcije na } [a;b], \quad (18)$$

odakle se dobijaju sve jednačine koje nedostaju za nalaženje kubnog splajna.

Kubni splajn je takođe u potpunosti određen ako je pored uslova (13)-(16) zadovoljen i uslov:

$$P'(x) = S'_{\Delta}(f, x), P'(a) = S'_{\Delta}(f, a). \quad (19)$$

U svakom od tri gore navedena slučaja, dobija se sistem od  $4n$  jednačina sa  $4n$  nepoznatih  $a_{ij}$ . Kubni splajn generiše trodijagonalni sistem linearnih jednačina. Ovakav sistem se efikasno rešava upravo Gausovom metodom eliminacije, jer je broj računskih operacija koje treba izvršiti asimptotski jednak  $8n$ . Mala računaska složenost rešavanja trodijagonalnog sistema linearnih jednačina je još jedna od prednosti korišćenja kubnog splajna.



## 5. QUALITY BY DESIGN

Početak XXI veka u farmaceutskoj industriji obeležen je ICH Q8 smernicom [23] koja ima za cilj da usmeri razvoj proizvoda u pravcu dobijanja proizvoda visokog kvaliteta kroz dobro definisanje i razumevanje svih faza procesa proizvodnje. Ovaj koncept je nazvan *Quality by Design* – QbD i kao konačan rezultat treba da se dobije *Design Space* koji se definiše kao multidimenziona kombinacija i interakcija ulaznih promenljivih i procesnih parametara za koje je dokazano da obezbeđuju očekivan kvalitet proizvoda.

Da bi kvalitet proizvoda bio praćen sa metodom odgovarajućeg kvaliteta QbD koncept je dalje proširen na metode koje se koriste u kontroli kvaliteta. To podrazumeva da se u razvoju metode koristi sistematičan naučno zasnovan pristup sa ciljem dobijanja metode odgovarajućeg kvaliteta. Ovaj pristup dobio je naziv *Analytical Quality by Design* (AQbD). Savremene metode treba da budu razvijene u skladu sa ovim konceptom. Revijalni rad Dispa i saradnika [24] prikazuje koliko do sada ima publikovanih radova u kojima je opisana uspešna primena ovog koncepta u razvoju metoda.

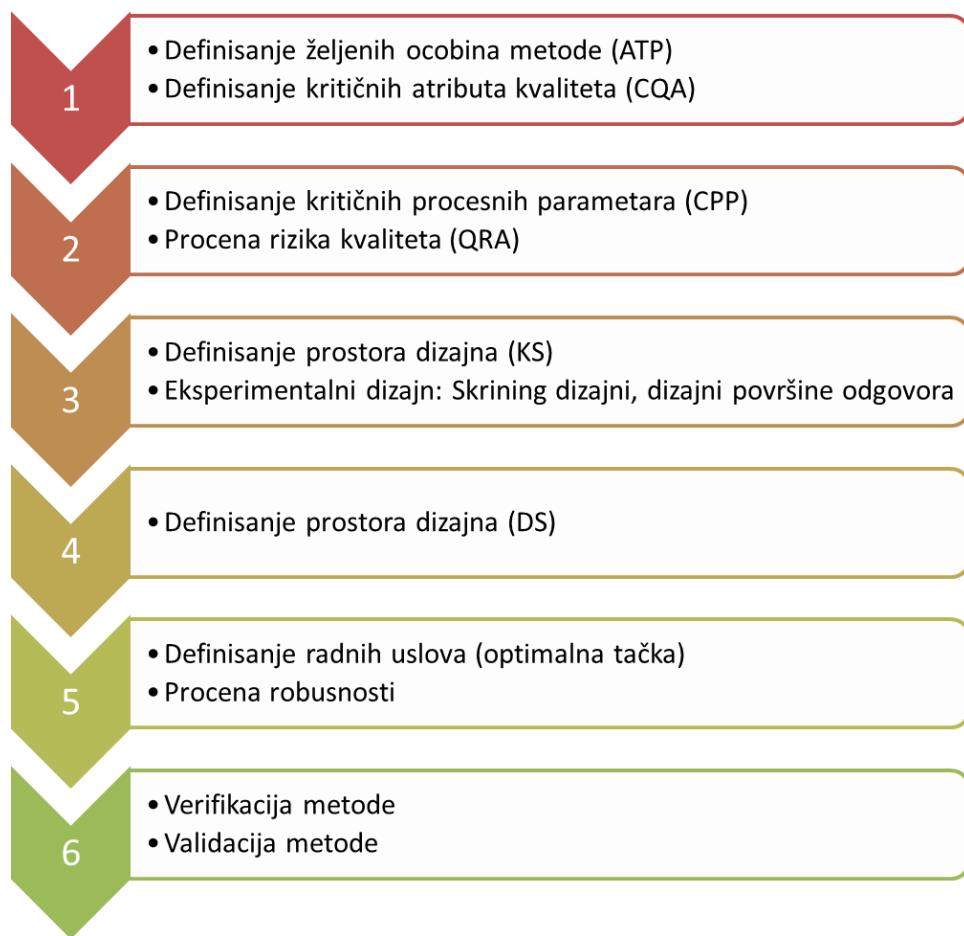
Ranije se razvoj metoda zasnivao na principima *one factor at a time* (variranje jednog po jednog faktora) ili *trial and error* (princip pokušaj – pogreška). Ovakvi principi se jednim imenom nazivaju *Quality by Testing* (QbT) [24]. Ovaj pristup daje dobra rešenja kod jednostavnijih problema ali kod složenih problema često ne mogu dati željene rezultate. U slučaju hromatografskih metoda, dokazano je da QbT ne obezbeđuje nikakvo dublje razumevanje hromatografskih sistema, odnosno saznanje o uticajima faktora na hromatografsko ponašanje analita.

Stoga, danas se analitičari sve češće opredeljuju za upotrebu AQbD principa za razvoj metode, jer obezbeđuje razumevanje metode u ranim fazama njenog razvoja.

Savremeni AQbD pristup u razvoju metode tečne hromatografije ima nekoliko koraka koji obuhvataju [23,25-27]:

- 1) Definisane željenih osobina hromatografske metode (eng. *Analytical Target Profile* – ATP) i definisanje kritičnih atributa kvaliteta (eng. *Critical Quality Attributes* – CQA);
- 2) Definisane kritičnih parametara hromatografskog procesa (eng. *Critical Process Parameters* – CPP) i procena rizika kvaliteta (eng. *Quality Risk Assessment* – QRA);
- 3) Definisane prostora znanja (eng. *Knowledge Space* – KS) i primena eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments* – DoE) kao efikasnog pristupa za ispitivanje uticaja definisanih CPP na kritične odgovore sistema;
- 4) Definisane prostora dizajna (eng. *Design Space* – DS);
- 5) Definisane radnih uslova i procena robusnosti metode;
- 6) Kontrola metode.

Šema AQbD pristupa u razvoju metode tečne hromatografije prikazana je na slici 4.



**Slika 4.** Šema AQbD pristupa u razvoju metode tečne hromatografije

U nastavku teksta biće detaljnije objašnjeni svi prethodno navedeni koraci.

## 5.1. Definisanje željenih osobina hromatografske metode i kritičnih odgovora hromatografskog sistema

Željene osobine hromatografske metode (ATP) predstavljaju skup karakteristika koje je potrebno ostvariti da bi se obezbedio postizanje željenog cilja, tj. kvalitetnog rezultata. U slučaju metoda za kontrolu kvaliteta lekova, što se na prvom mestu odnosi na hromatografske metode, svaka metoda treba da omogući maksimalnu selektivnost u okviru minimalne dužine trajanja same analize u robusnom regionu eksperimentalnog prostora [28].

Kritični odgovor sistema se definiše kao fizička, hemijska, biološka ili mikrobiološka osobina koja treba da bude u okviru odgovarajućeg limita kako bi se obezbedio odgovarajući kvalitet proizvoda [23]. Kada se ova definicija primeni na hromatografske metode, CQA mogu biti, na primer, optimalno razdvajanje ispitivanih analita, optimalno vreme trajanja analize i prihvatljiva cena hromatografske analize.

Pod kritičnim odgovorima hromatografskog sistema koji procenjuju kvalitet razdvajanja analiziranih supstanci podrazumevaju se osnovni (elementarni) i opšti (globalni) kriterijumi razdvajanja. Elementarni kriterijumi razdvajanja procenjuju kvalitet razdvajanja za jedan par pikova i tu spadaju faktor selektivnosti, faktor rezolucije i različiti kriterijumi koji se zasnivaju na odnosu visine pika i doline koja spaja susedne pikove (eng. *peak to valley*) [29]. U novije vreme kao odgovor sistema često se primenjuje *s* kriterijum koji pokazuje razliku u retencionom vremenu početka drugog pika i kraja prvog pika u okviru kritičnog para pikova [30]. Sa druge strane globalni kriterijumi razdvajanja procenjuju ukupan kvalitet razdvajanja svih analiziranih supstanci i tu spadaju rezolucija kritičnog para i različite složene funkcije hromatografskog odgovora [31].

## **5.2. Definisanje kritičnih parametara hromatografskog procesa i procena rizika kvaliteta**

Kritični parametri procesa definišu se kao parametri čije variranje ima uticaj na CQA i stoga se moraju pratiti i kontrolisati kako bi se obezbedio odgovarajući kvalitet proizvoda.

U slučaju metoda tečne hromatografije, a na osnovu prethodno stečenih naučnih znanja, mogu se definisati faktori za koje se očekuje da će biti kritični i to su najčešće: tip stacionarne faze, tip i udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze, temperatura kolone, kao i vreme trajanja gradijenta u slučaju metoda sa gradijentnim eluiranjem.

## **5.3. Definisanje prostora znanja i eksperimentalni dizajn**

Cilj razvoja metode za analitiku nekog leka jeste pronalaženje odgovarajuće kombinacije faktora, odnosno CPP koja će omogućiti dobijanje željenih CQA. Takav interval CPP čini jedan deo ukupnog mogućeg eksperimentalnog prostora koji se naziva prostor znanja (eng. *Knowledge Space* – KS). Pravilan odabir intervala faktora ima veliki uticaj na dalje rezultate istraživanja, usled čega je neophodno posvetiti posebnu pažnju ovoj fazi istraživanja.

Za razliku od OFAT strategije (eng. *One Factor at the Time*), DoE strategija podrazumeva izvođenje malog broja dobro isplaniranih eksperimenata u okviru prostora znanja nakon čega se, primenom statističkih i matematičkih tehnika, detaljno objašnjava zavisnost CQA od CPP [24].

U fazi optimizacije metode koriste se dizajni površine odgovora ili RSM dizajni (eng. *Response Surface Methodology* – RSM). U ovoj fazi uspostavlja se teorijska (matematička) zavisnost CQA od CPP, odnosno, dobija se jednačina koja omogućava teorijsko izračunavanje CQA za svaku moguću kombinaciju CPP. Tako se KS može detaljno pretražiti samo kompjuterskim izračunavanjem bez potrebe za izvođenjem novih

eksperimenata. Jednačina koja opisuje ponašanje CQA najčešće je polinom drugog stepena (kvadratna jednačina). RSM dizajni podrazumevaju izvođenje eksperimenata na minimum 3 nivoa CPP (obično su to granični gornji, granični donji nivo i centralni nivo koji se nalazi na sredini intervala) kako bi se omogućilo uspostavljanje kvadratne zavisnosti. Osim kvadratne jednačine, modelovanje sistema može se vršiti i nekim drugim empirijskim i teorijskim jednačinama.

#### **5.4. Definisane prostora dizajna**

Prostor dizajna (eng. *Design Space*) se definiše kao multidimenziona kombinacija i interakcija faktora i procesnih parametara za koju je pokazano da omogućava osiguranje kvaliteta [23]. Suštinski, DS za metode predstavlja region teorijske robusnosti, tj. deo eksperimentalnog prostora u kome će definisani CQA ostati na željenom nivou kvaliteta bez obzira na promenu faktora. Stoga se uslovi metode više ne definišu kao tačno određene tačke već kao oblast u okviru DS. Kreiranjem DS postiže se velika fleksibilnost u rutinskoj primeni metode jer se pomeranje u okviru granica DS ne smatraju promenom koja zaheva dodatne potvrde adekvatnosti metode.

*Design space* za mobilnu fazu i ostale parametre procesa definiše se na osnovu uspostavljene matematičke veze između ispitivanih CPP i CQA. Naime, jednačine omogućavaju da se tačno izdvoje regioni eksperimentalnog prostora u kojima će kombinacija CPP dati zadovoljavajuću vrednost jednog CQA, a zatim se takvi regioni preklapaju kako bi se pronašao deo eksperimentalnog prostora u kome će kombinacija CPP dati zadovoljavajuće odgovore za sve posmatrane CQA. Ukoliko je broj ispitivanih CPP relativno mali, grafički prikaz DS dobija se preklapanjem površina odgovora za ispitivane CQA.

Međutim, rezultati koji se dobijaju ovako jednostavnom analizom ne uzimaju u obzir nesigurnost koja može poticati od nesigurnosti u izračunavanju koeficijenata matematičkog modela, pa se ovakav DS naziva još i pseudo-DS. Kada bi se definisao DS

maksimalne pouzdanosti potrebno je nesigurnosti u podešavanju CPP dodati nesigurnost u izračunavanju koeficijenta matematičkog modela. Postoje različiti statistički pristupi kojim se ovo može postići, a jedan od najčešće primenljivanih je Monte – Karlo simulacija.

### **5.5. Definisanje radnih uslova i procena robusnosti metode**

Kao radna tačka može se odabrati bilo koja tačka u okviru prostora dizajna. To može biti tačka sa najboljom vrednošću CQA ili neka tačka koja je odgovarajuća sa praktične tačke gledišta. Međutim, veoma je pogodno odabrati one tačke koje će biti najrobusnije. Stoga, nije preporučljivo birati tačke koje se nalaze na samim ivicama prostora dizajna.

### **5.6. Kontrola metode**

Nakon razvoja metode, potrebno je izvršiti kompletnu validaciju na isti način, kao i nakon razvoja metode na tradicionalni način.

### **5.7. Primena AQbD metodologije**

Postoje brojni radovi o različitim primenama AQbD metodologije, od kojih samo nekoliko opisuje primenu AQbD metodologije u razvoju HILIC metoda. Taraji i saradnici su u svom revijalnom radu [32] prikazali najznačajnije radove u kojima se opisuju različiti načini razvoja HILIC metoda uz primenu hemometrijskih alata, kao što su optimizacija uz pomoć metodologije eksperimentalnog dizajna i optimizacija na osnovu QSRR (eng. *Quantitative Structure Retention Relationships*) modela. Ipak, u literaturi ne postoje radovi koji opisuju primenu QbD principa na gradijentne HILIC metode kao što je u ovoj doktorskoj disertaciji urađeno.

Objavljena su dva rada u kojima je AQbD primenjen za razvoj HILIC metoda sa linearnim eluiranjem: u prvom radu opisan je razvoj HILIC metode za određivanje ioheksola, njegovog *endo*-izomera i tri nečistoće, [33], dok drugi opisuje razvoj HILIC metode za određivanje bilastina i njegovog degradacionog proizvoda [34].

Takođe su objavljena dva rada koja opisuju razvoj brzih i robusnih reverzno-faznih metoda primenom sistemskog QbD pristupa: jedan za analizu ukupnog benzalkonijum-hlorida u farmaceutskom obliku [35], a drugi za analizu 15 često propisivanih antipsihotika koji se često propisuju [36]. Ovako razvijene metode su zatim validirane, a rezultati validacije su potvrdili da su metode precizne, robusne, tačne i linearne u ispitivanom opsegu koncentracija.

Orlandini i saradnici su objavili nekoliko radova u kojima koriste QbD princip za razvoj hromatografskih metoda za određivanje amitriptilina i nečistoća [37], hidrohloriazida i nečistoća [38] i diklofenak i nečistoća [39]. U ovim radovima opisan je najčešći način kreiranja DS, kada se preklope grafici za svaki od CQA, nakon čega se vrše Monte Karlo simulacije koje rezultuju stvaranjem DS-a.

AQbD princip je korišćen za razvoj metoda za praćenje stabilnosti različitih analita: UHPLC/QTOF-MS/MS (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography / Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry*) metoda za praćenje stabilnosti leka dolutegravira [40], UHPLC metoda za praćenje stabilnosti ebastina u njegovim farmaceutskim oblicima [41] i UPLC/QTOF-MS/MS metoda za istovremeno određivanje imatinib-mesilata i njegovih srodnih supstanci u aktivnoj supstanci i gotovim proizvodima [42].

Dakle, u literaturi se može naći veliki broj publikovanih naučnih radova u kojima se primenjuje AQbD koncept što takođe predstavlja potvrdu da je ovaj pristup sve više u upotrebi.



## 6. PREGLED LITERATURE

### 6.1. Analitika olanzapina

Pretragom literature utvrđeno je da ne postoji nijedan rad koji opisuje analizu ili određivanje olanzapina HILIC metodom. Ipak, postoji veliki broj radova koji predlažu različite metode za analizu olanzapina i njegovih srodnih supstanci.

Brza HPLC metoda za određivanje olanzapina u plazmi sa UV detekcijom opisana je u radu Leona i saradnika [43]. Olanzapin je ekstrahovan iz plazme smešom heksana i dihlorometana u odnosu 85:15 V/V. Razdvajanje je vršeno u reverzno-faznoj *Select B C18* koloni, a lekovi koji se uobičajeno koriste u kombinaciji sa olanzapinom nisu ometali analizu. Prilikom ispitivanja preciznosti vrednosti za relativnu standardnu devijaciju (eng. *Relative Standard Deviation –RSD*) bile su manje od 10%. Ispitivanje stabilnosti pokazalo je da je olanzapin stabilan na temperaturi od 4°C u periodu od 7 dana. Metoda je korišćena za merenje koncentracija olanzapina kod pacijenata koji su primali od 5 mg do 40 mg olanzapina dnevno.

Za određivanje olanzapina u humanoj plazmi razvijena je i validirana HPLC – MS metoda uz venlafaksin kao interni standard [44]. Tečno-tečna ekstrakcija *terc*-butil etrom korišćena je za izolovanje olanzapina. Hromatografsko razdvajanje je vršeno u ACE C18 koloni (125×4,6 mm, 5 µm veličine čestica) sa izokratskim eluiranjem uz protok mobilne faze od 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Mobilna faza sastojala se iz sledećih komponenata: (A) voda sa 0,1% mravljom kiselinom i (B) acetonitril sa 0,1% mravljom kiselinom u odnosu 50:50 V/V. Analiza je trajala manje od 2 minuta. Za kvantitativnu analizu analita korišćena je spregnuta masena spektrometrija sa pozitivnom elektrosprej jonizacijom (eng. *Electrospray Ionisation – ESI (+)*). Metoda je korišćena u farmakokinetičkoj studiji u kojoj su zdravi volonteri uzimali tablete olanzapina od 10 mg.

Osim radova u kojima je opisano određivanje samo olanzapina pronađeni su radovi koji opisuju razdvajanje nekoliko analita iz smeše od kojih je jedan olanzapin. U radu Bondea i saradnika [45] razvijena je i validirana LC-MS-MS (eng. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Mass Spectrometry*) metoda za istovremeno određivanje olanzapina i fluoksetina u humanoj plazmi uz korišćenje olanzapin-d3 i fluoksetin-d5 kao internih standarda. Nakon čvrsto tečne ekstrakcije (eng. *Solid Phase Extraction*, SPE) olanzapin i fluoksetin su analizirani korišćenjem *Hypersil Gold C18* kolone (50×4,6 mm, 5 µm veličine čestica). Primenjeno je izokratsko eluiranje, a smeša metanola i 2 mmol L<sup>-1</sup> amonijum-acetatnog pufera u odnosu 90:10 V/V je korišćena kao mobilna faza. Masena detekcija je izvođena u ESI (+) modu. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 2 minuta. Metoda je uspešno validirana i primenjena u farmakokinetičkoj studiji za farmaceutski oblik olanzapina i fluoksetina.

Lou i saradnici su razvili metodu za istovremeno određivanje koncentracije olanzapina i *N*-demetilolanzapina u plazmi za praćenje koncentracija leka i njegovog metabolita tokom farmakokinetičke studije [46]. Analiti su razdvajani u reverzno faznoj *YMC-ODS-AQ C18* koloni (100×2,0 mm, 3 µm veličine čestica), uz gradijentno eluiranje pri protoku mobilne faze 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Mobilna faza se sastojala od sledećih komponenata: (A) 10 mmol L<sup>-1</sup> amonijum-acetat i voda sa dodatkom 0,05% mravlje kiseline pH 3,5 i (B) metanol sa dodatkom 0,05% mravlje kiseline. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 5 minuta. Metoda je validirana, tj. ispitani su sledeći parametri validacije: selektivnost, *carry-over*, linearnost, LOQ (eng. *Limit of Quantification*); tačnost, preciznost, uticaj matriksa, prinos ekstrakcije i stabilnost.

U radu Jossefssona i saradnika prikazan je razvoj i validacija LC-MS-MS metode za određivanje olanzapina i njegovog metabolita *N*-demetilolanzapina koji dominantno nastaje nakon oralne primene olanzapina, u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti [47]. Analiti su kvantifikovani u ESI (+) modu, MRM (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) metodom. Olanzapin i demetilanzapin su ekstrahovani iz seruma ili cerebralne tečnosti uz pomoć tetra-butil-metil-etra, a kao interni standard korišćen je olanzapin-d3. Ispitani su sledeći parametri validacije: linearnost, osetljivost, tačnost, preciznost, prinos ekstrakcije, efekat

matriksa i stabilnost. Predložena metoda je uspešno korišćena za analizu olanzapina i njegovog metabolita u uzorcima pacijenata koji su uzimali olanzapin u dozi 2,5 mg do 25 mg dnevno.

Berna i saradnici su razvili i validirali metodu za određivanje olanzapina u krvi primenom LC-MS-MS metode [48]. Za ekstrahovanje olanzapina iz matriksa korišćena je tečno-tečna ekstrakcija, sa *n*-butanol:cikloheksan smešom u odnosu 3:47 V/V, a kao interni standard korišćen je LY170158. Hromatografsko razdvajanje vršeno je na *MetaChem Monochrom* HPLC kolini (150 × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica), dok je detekcija vršena u ESI (+) modu MRM metodom. Mobilna faza se sastojala od sledećih komponenata: (A) 100 mM amonijum-acetat i (B) metanol:izopropanol:voda (15:4:1 V/V/V). Ispitivani su sledeći parametri validacije: linearnost, tačnost, preciznost, stabilnost, specifičnost i efikasnost ekstrakcije.

Razvijena je još jedna LC-MS-MS metoda za određivanje olanzapina u krvi korišćenjem dibenzepina kao internog standarda [49]. Uzorci su pripremani primenom metode precipitacije proteina. Olanzapin i interni standard razdvojeni su u *Zorbax Extend* C18 koloni na pH 9,0. Mobilna faza se sastojala iz sledećih komponenata: (A) 5 mmol L<sup>-1</sup> amonijum-hidroksid i acetonitril u zapreminskom odnosu 95:5 V/V i (B) acetonitril. Kvantitativna analiza je sprovedena u ESI (+) modu MRM metodom. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 15 minuta. Ispitivani su sledeći parametri validacije: selektivnost, uticaj matriksa, prinos ekstrakcije, linearnost, LOD (eng. *Limit of Detection*), LOQ i stabilnost. Metoda je zatim uspešno primenjena na 27 forenzičkih uzoraka.

Takođe, razvijena je LC-MS-MS metoda za određivanje olanzapina u urinu [50]. Olanzapin je iz humanog urina ekstrahovan SPE, nakon čega je uzorak urina analiziran u RP C18 koloni (50×4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica). Kvantitativna analiza je sprovedena u ESI (+) modu MRM metodom. Mobilna faza se sastojala iz sledećih komponenata: vodeni rastvor amonijum-acetata pH 7,8 podešen sa amonijum-hidroksidom i acetonitril u zapreminskom odnosu 10:90 V/V. Ispitivani su sledeći parametri validacije: selektivnost, linearnost, LOQ, tačnost, preciznost i *Recovery*.

U literaturi takođe postoje metode koje se koriste za određivanje olanzapina u farmaceutskim oblicima. Cui i saradnici su razvili metodu za praćenje olanzapina i nečistoća iz procesa sinteze [51]. Osim razvoja metode predložili su i puteve nastanka svih osam opisanih nečistoća iz procesa sinteze. Razvijena je RP-HPLC metoda i predviđena je za ispitivanje olanzapina i njegovih srodnih supstanci u *bulk*-u. Optimalno hromatografsko razdvajanje je postignuto u *Agilent Octyldecyl C18* silica koloni (250×4,6 mm, 5 µm veličine čestica), a uz primenu gradijentnog eluiranja. Mobilna faza se sastojala iz sledećih komponenata: (A) 0,3% trietilamin u vodi, sa pH podešenim na 3,73 dodatkom sirćetne kiseline i (B) metanol. Ispitivani su sledeći parametri validacije: pogodnost sistema, preciznost, linearnost, LOD i LOQ i tačnost.

Još jedna metoda za razdvajanje nečistoća iz procesa sinteze iz *bulk*-a ili gotovih tableta, ali ovog puta primenom HPLC-MS/MS metode je razvijena u radu Rao i saradnika [52]. Hromatografsko razdvajanje je vršeno u *Intersil ODS 3V* koloni (250×4,6 mm, 5 µm veličine čestica). Mobilna faza se sastojala iz sledećih komponenata: 0,2 mmol L<sup>-1</sup> amonijum-acetat (pH 4,5) i acetonitrila, sa gradijentnim eluiranjem. Protok je držan konstantnim na 1 mL min<sup>-1</sup> dok je detekcija vršena fotodiodnim detektorom na 254 nm. Metoda je validirana, odnosno ispitani su linearnost, preciznost i tačnost.

Krishnaiah i saradnici su razvili UPLC (eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) metodu za određivanje olanzapina i njegovih srodnih supstanci u aktivnoj supstanci i farmaceutskim oblicima [53]. Hromatografska analiza je izvršena u *Aquity UPLC BEH C18* koloni (100×2,1 mm, 1,7 µm veličine čestica), dok je ukupno vreme trajanja gradijenta bilo 10 minuta. Supstance su detektovane na 250 nm, pri protoku mobilne faze 0,3 mL min<sup>-1</sup> i temperaturi kolone od 27°C. Vrednost faktora rezolucije za olanzapin i osam srodnih supstanci je bila veća od 2,0 za sve ispitivane parove hromatografskih pikova. Nakon razvoja metode, eksperimentalno je ispitana njena robusnost, dok je na kraju metoda kompletno validirana. Ispitani su sledeći parametri validacije: preciznost, tačnost, linearnost, LOD i LOQ, robusnost, stabilnost rastvora analita i mobilne faze.

Dalje, razvijena je metoda za praćenje stabilnosti olanzapina u tabletama, ovog puta u kombinaciji sa fluoksetinom [54]. Pathak i Rajpur su razvili i validirali metodu za istovremeno određivanje olanzapina, fluoksetina i njihovih degradacionih proizvoda iz tableta, a po zahtevima ICH smernica (eng. *International Conference on Harmonization*). Sprovedene su *stres* studije za ispitivanje stabilnosti ovih supstanci: hidroliza, oksidacije, fotoliza i termalna degradacija. Uspešno razdvajanje aktivnih supstanci od njihovih degradacionih proizvoda postignuto je u reverzno faznoj C18 koloni. Mobilna faza se sastojala iz sledećih komponenata: 75 mmol L<sup>-1</sup> kalijum-dihidrogen fosfatnog pufera (pH 4,0), acetonitrila i metanola u odnosu 55:40:5, V/V/V. Protok mobilne faze je bio 0,8 mL min<sup>-1</sup> a talasna dužina detekcije 227 nm. Metoda je zatim validirana i ispitane su njena linearnost, preciznost, tačnost i robusnost. Pogodnost ove metode potvrđena je primenom na tabletama dostupnim na tržištu i njihovom podvrgavanju *stres* uslovima.

## 7. CILJ RADA

Cilj ove doktorske disertacije bio je:

1. Unaprađenje teorijskih znanja o tečnoj hromatografiji hidrofilnih interkcija kroz analizu smeše olanzapina i njegovih osam srodnih supstanci na različitim tipovima silika kolona i njihovim polarnim modifikacijama (cijano, diolna i ZIC HILIC), kako bi se na strukturno sličnim analitima ispitaio uticaj fizičko-hemijskih osobina analita i stacionarne faze na retenciono ponašanje u HILIC sistemu.
2. Modelovanje retencionog ponašanja analizirane smeše uz pomoć već postojećih teorijskih (particioni, apsorpcioni, mešoviti i kvadratni) i empirijskih (Neue) matematičkih modela, kao i evaluacija dobijenih rezultata izracunavanjem koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), prilagođenog koeficijenta determinacije ( $Adj R^2$ ) i koeficijent predviđnja ( $Q^2$ ), kao najpreciznijih i najsveobuhvatnijih statističkih parametara.
3. Kreiranje novog matematičkog modela primenom splajn interpolacije u cilju boljeg opisivanja kompleksnog HILIC sistema od postojećih modela predloženih u literaturi. U cilju potvrde kvaliteta splajn interpolacije za HILIC sistem vrši se poređenje sa već opisanim teorijskim i eksperimentalnim modelima. Da bi se potvrdila sposobnost predviđanja retencionog ponašanja u HILIC sistemu splajn model je primenjen i na dodatnoj test smeši.

4. Razvoj metode tečne hromatografije hidrofilnih interakcija sa gradijentnim eluiranjem za praćenje olanzapina i njegovih srodnih supstanci u čvrstim farmaceutskim oblicima u skladu sa QbD konceptom. Postupak obuhvata niz dobro definisanih koraka koji uključuju primenu različitih hemometrijskih alata a koji za konačan rezultat imaju dobro definisan *design space*. Kroz ovaj cilj po prvi put je u naučnoj literaturi predložen QbD koncept u razvoju gradijentne HILIC metode. Primenljivost metode potvrđena je kroz postupak validacije.
5. Prenos predložene HILIC metode na UPLC/MS/MS sistem u cilju dobijanja brze i osetljivije metode za analizu ispitivanih analita pod uticajem različitih *stres* agenasa što se povrdjuje testiranjem potrebnih parametara validacije.

## 8. EKSPERIMENTALNI DEO

### 8.1. Aparati i reagensi

Tečni hromatograf 1: *Waters Breeze System, Waters, Milford, MA, USA*

Pumpa:	<i>Waters 1525 Binar HPLC Pump</i>
Detektor:	<i>Waters 2487 UV/VIS detektor</i>
Grafička obrada:	<i>Breeze Software, Windows XP</i>
Mikrolitički špic:	100 µL, SG Australija
Volumen injektovanja:	20 µL

Tečni hromatograf 2: *Finnigan Surveyor, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA*

Pumpa:	HPLC pumpa
Detektor:	<i>UV/VIS Plus detektor</i>
Grafička obrada:	<i>ChromQuest, Windows XP</i>
Mikrolitički špic:	<i>Autosampler Plus</i>
Volumen injektovanja:	5 µL/10 µL



Maseni spektrometar: *Triple quadrupole system TQD, Waters, USA*

Izvor: Elektrosprej jonizacija

Napon kapilare: 3 kV

Napon kona i koliziona energija: dobijeni pomoću *IntelliStart*-a za svaku tranziciju

Desolvaciona temperatura: 500°C

Protok desolvacionog gasa: 1000 L h<sup>-1</sup>

Protok gasa u konu: 10 L h<sup>-1</sup>

Temperatura izvora: 150°C

Filtri: *Nylon membrane filters, 0,45 µm Whatman, Engleska*

Elektronska analitička vaga: *121 Sartorius, Nemačka*

Ultrazvučno kuptilo: *Fungilab, Španija*

Sistem za dobijanje vode HPLC čistoće: *Simplicity 185, Milipore, Nemačka*

pH metar: *PHM 210, METERLAB, Radiometer Analytical, Villeurbane Cedex, Francuska*

Acetonitril, HPLC čistoće, *J.T.Baker, Holandija*

Metanol, HPLC čistoće, *J.T.Baker, Holandija*

Voda, HPLC čistoće, *Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA*

Amonijum-formijat, *Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA*

Mravlja kiselina 99% čistoće, *Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD*

Voda, LC-MS čistoće, *Fisher Scientific International Inc, Hampton, New Hampshire, USA*

Metanol, LC-MS čistoće, *Fisher Scientific International Inc, Hampton, New Hampshire, USA*

Acetonitril, LC-MS čistoće, *Fisher Scientific International Inc, Hampton, New Hampshire, USA*

Olanzapin<sup>®</sup> 10 mg tablete, *Replek Pharm*, Makedonija

Onzapin<sup>®</sup> 5 mg tablete, *Zdravlje AD*, Leskovac

### **Hromatografske kolone**

*Betasil Silica*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Thermo Fisher Scientific*, San Jose, CA, USA

*Betasil Diol*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Thermo Fisher Scientific*, San Jose, CA, USA

*Betasil CN*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Thermo Fisher Scientific*, San Jose, CA, USA

*SeQuant<sup>®</sup> ZIC<sup>®</sup>-HILIC*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica, *Merck*, Darmstadt, Nemačka

*Acquity UPLC BEH HILIC*, 100×2,1 mm, 1,7 µm veličine čestica, *Waters*, Milford, USA

## 8.2. Standardne supstance

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je detaljna hromatografska analiza sledeće smeše:

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

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

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

**Srodna supstanca 3:** 2-metil-4-(4-metil-4-oksid-1-piperazinil)-10H-tieno-[2,3,6][1,5]benzodiazepin (N-oksid)

**Srodna supstanca 4:** Piperazin 1,4 bis-4-il-(2-metil)-10H-tieno-[2,3-b][1,5]benzodiazepin

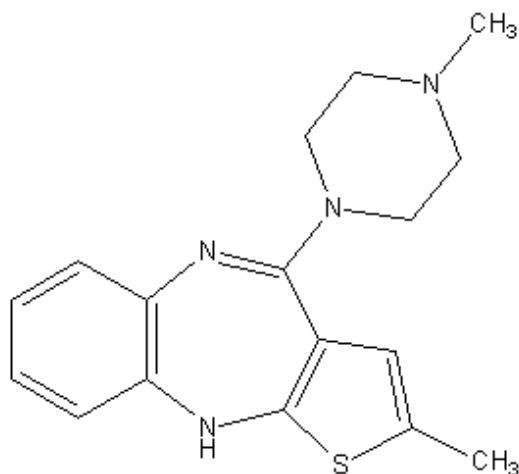
**Srodna supstanca 5:** 2-metil-4-okso-10H-tieno-[2,3-b][1,5]benzodiazepin

**Srodna supstanca 6:** 2-metil-4-(1-piperazinil)-10H-tieno-[2,3-b][1,5]benzodiazepin

**Srodna supstanca 7:** 4-amino-2-metil-10H-tieno-[2,3-b][1,5]benzodiazepin hidrohlorid

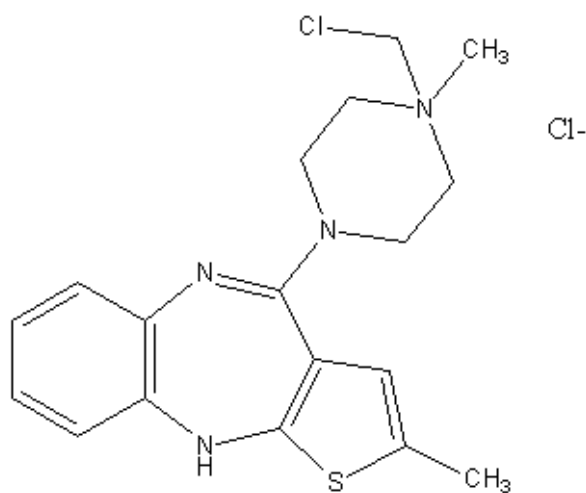
**Srodna supstanca 8:** 2-metil-4-(4-formil-1-piperazinil)-10H-tieno-[2,3-b][1,5]benzodiazepin

### 8.2.1. Hemijske strukture analiziranih supstanci



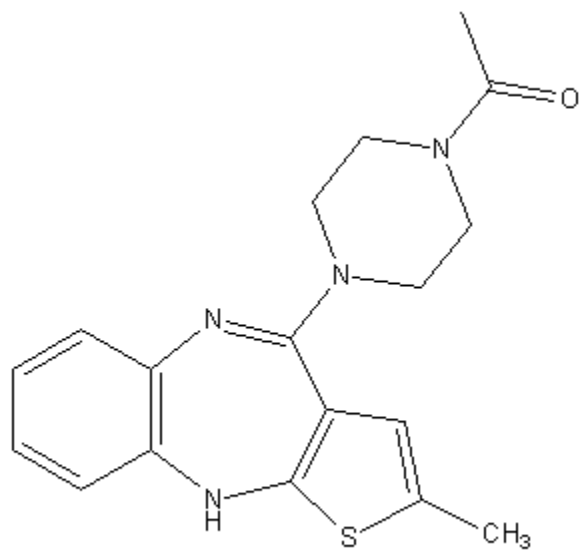
#### **Olanzapin**

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



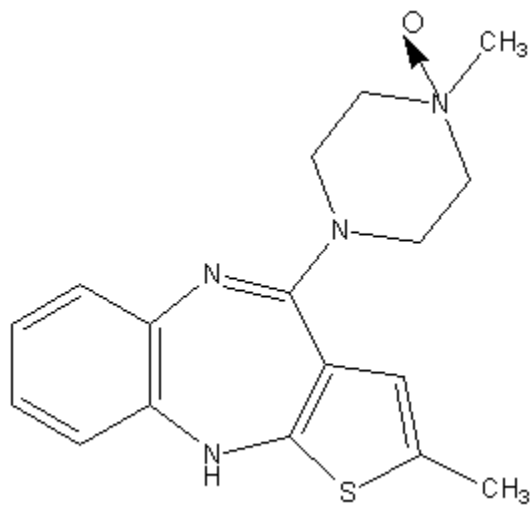
#### **Srodna supstanca 1**

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



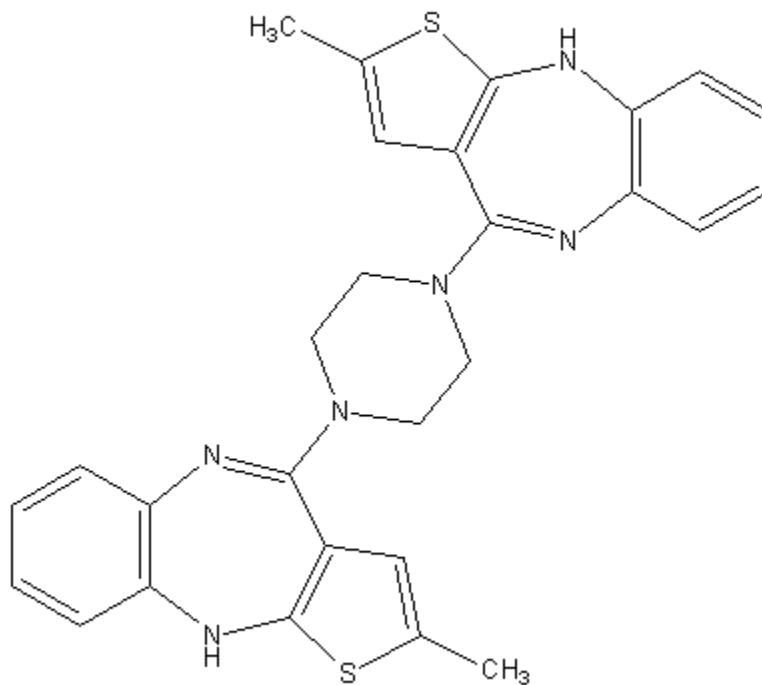
**Srodna supstanca 2**

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



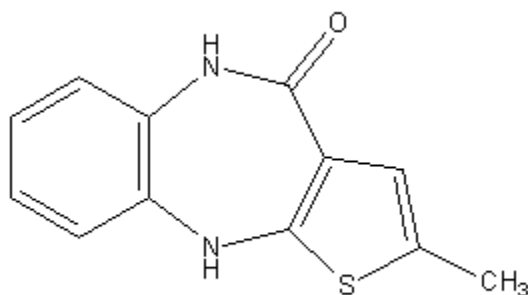
**Srodna supstanca 3**

2-metil-4-(4-metil-4-oksid-1-piperazinil)- 10H-tieno-[2,3,6][1,5]benzodiazepin (N-oksid)



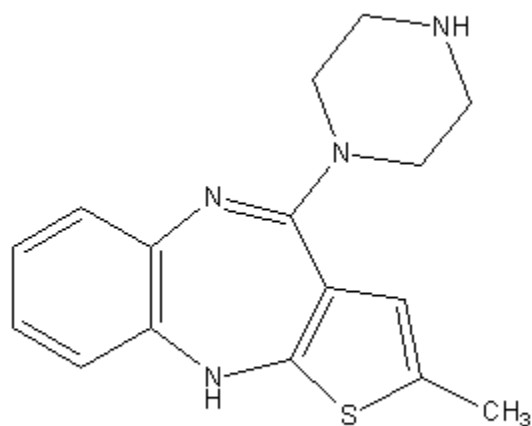
**Srodna supstanca 4**

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



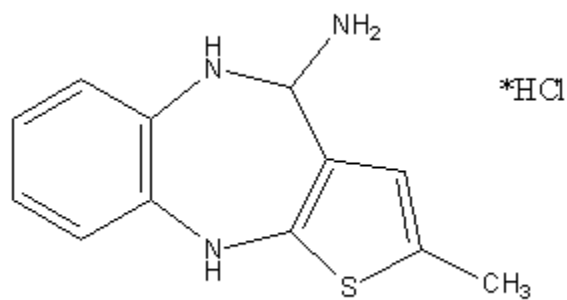
**Srodna supstanca 5**

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



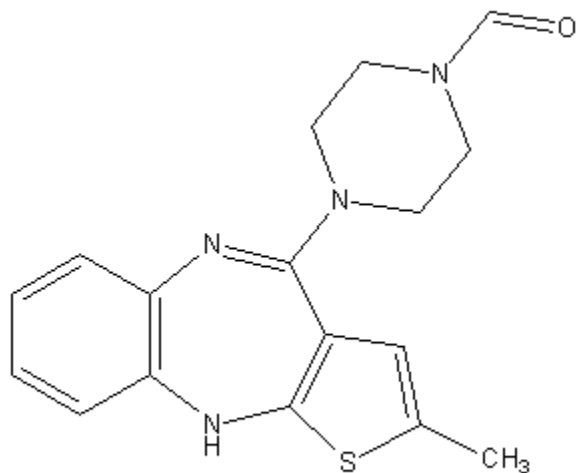
**Srodna supstanca 6**

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



**Srodna supstanca 7**

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



### Srodna supstanca 8

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

### 8.3. Kompjuterski programi

*Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Natick, MA, USA)*

*MATLAB 7.10.0. (The MathWorks, Natick, MA, USA)*

*MarvinSketch 6.1.0. (ChemAxon Kft., Budapest, Hungary)*

*Modde 11 (Umetrics, Umea, Sweden)*



#### 8.4. Modelovanje retencionog ponašanja olanzapina i srodnih supstanci

##### Hromatografski uslovi

Tečni hromatograf: *Waters Breeze system*

Kolone: *Betasil Silica*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica

*Betasil Diol*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica

*Betasil CN*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica

*SeQuant® ZIC®-HILIC*, 100×4,6 mm, 5 µm veličine čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min<sup>-1</sup>

Temperatura kolone: 30°C

Talasna dužina detekcije: 235 nm

##### Priprema rastvora standarda

Osnovni rastvori standarda olanzapina i srodnih supstanci pripremljeni su u metanolu u koncentraciji od 1 mg mL<sup>-1</sup>. Osnovni rastvori standarda su odgovarajućim mobilnim fazama razblaživani do koncentracije od 100 µg mL<sup>-1</sup>. Svi rastvori su čuvani na temperaturi od 4°C kako bi se sprečila njihova degradacija.

##### Mobilna faza

Mobilne faze su pripremljene mešanjem acetonitrila i vodene faze (20 mM amonijum-acetatni puffer, pH 3,0). Udeo vodene faze je varirao od 5% do 20% (8% do 23% za olanzapin na silika koloni i za srodnu supstancu 3 na diolnoj koloni, i od 11% do 26% za srodnu supstancu 3 na silika koloni). Za svaku od četiri kolone pripremljeno je po šest mobilnih faza.

### Hromatografski postupak

HPLC sistem je prvobitno podešen prema prethodno određenim hromatografskim uslovima. Pod tim uslovima je ispiran mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga injektovana je smeša olanzapina i svih srodnih supstanci u četiri kolone pod istim hromatografskim uslovima kako bi se procenio uticaj stacionarne faze na retenciono ponašanje. Zatim su pojedinačno puštani radni standardi svih analita na različitim stacionarnim fazama i pod različitim hromatografskim uslovima (po šest mobilnih faza). Kao odgovor praćena su retenciona vremena, kako bi se ispitao uticaj udela acetonitrila u mobilnoj fazi na retenciono ponašanje analita ali i kreirali različiti teorijski i empirijski matematički modeli, kao i novi splajn model.

### Kompjuterski programi

Modelovanje retencionog ponašanja i kreiranje splajna je izvođeno u *MATLAB* 7.10.0 programu. Vrednosti  $\log D$  parametara analiziranih supstanci su procenjivane u *MarvinSketch* 6.1.0 programu.

## 8.5. Razvoj hromatografske metode

### Hromatografski uslovi

Tečni hromatoraf: *Finnigan Surveyor Thermo Scientific*

Kolona: *Betasil Diol*, 100×4,6 mm, 5 µm veličina čestica

Protok mobilne faze: 1 mL min<sup>-1</sup>

Talasna dužina detekcije: 235 nm

### Priprema rastvora standarda

Za optimizaciju su korišćeni rastvori koncentracija 200 µg mL<sup>-1</sup> olanzapina i 10 µg mL<sup>-1</sup> srodnih supstanci pripremljeni u mobilnoj fazi.

### Mobilna faza

Mobilna faza A se sastojala od amonijum-formijata u koncentraciji 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH podešenog mravljom kiselinom na 3,0 i 10% acetonitrila. Mobilna faza B je bila čist acetonitril. Smeša mobilne faze A i mobilne faze B se koristila za pripremu rastvora za validaciju metode. Početni udeo vodene faze, trajanje linearnog dela gradijenta i temperatura kolone su bile menjane u skladu sa planom eksperimenata prikazanim u tabeli 1.

**Tabela 1.** Plan eksperimenata prema matrici *Rechtschaffen* optimizacionog dizajna

<b>Eksp.</b>	<b>Aq</b>	<b>T</b>	<b>t</b>
<b>1</b>	5	40	12
<b>2</b>	5	50	16
<b>3</b>	9	40	16
<b>4</b>	9	50	12
<b>5</b>	5	40	16
<b>6</b>	5	50	12
<b>7</b>	9	40	12
<b>8</b>	9	45	14
<b>9</b>	7	50	14
<b>10</b>	7	45	16
<b>11</b>	7	45	14
<b>12</b>	7	45	14
<b>13</b>	7	45	14

Aq – početni udeo vodene faze u ukupnoj mobilnoj fazi (%), T – temperatura kolone (°C),  
t – trajanje linearnog dela gradijenta (min)

## Hromatografski postupak

HPLC sistem je prvobitno podešen prema prethodno određenim hromatografskim uslovima. Pod tim uslovima je ispiran mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovane su pojedinačne supstance, kao i smeša olanzapina i svih srodnih supstanci. Kao odgovor praćen je faktor razdvajanja ( $s$  vrednost) između kritičnih parova (S<sub>23</sub> i S<sub>78</sub>).

## Kompjuterski programi

Plan eksperimenata za optimizaciju metode, kao i *design space*-a su kreirani u Modde 11 programu.

## **Validacija metode**

### Hromatografski uslovi

HPLC sistem je prvobitno podešen prema prethodno određenim optimalnim hromatografskim uslovima. Pod tim uslovima je ispiran mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga, injektovani su odgovarajući rastvori ispitivanih supstanci. Kao odgovor sistema praćene su površine pikova.

### Priprema rastvora

#### *Procena selektivnosti*

Za procenu selektivnosti metode korišćen je rastvor standarda koji sadrži 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olanzapina i 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  srodnih supstanci, kao i odgovarajuća *placebo* smeša. *Placebo* smeša je pripremljena od pomoćnih supstanci koje se nalaze u tableti: laktoza-

monohidrat, mikrokristalna celuloza, hipromeloza, krosповidon, koloidni anhidrovani silicijum-dioksid, talk, magnezijum stearat i *Opadry II* belo, u istom odnosu koncentracija u kom su prisutne u farmaceutskom obliku.

#### *Procena linearnosti*

Osnovni rastvor standarda olanzapina koncentracije  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljen je u metanolu. Od osnovnog rastvora pripremljeni su rastvori koncentracija  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Rastvori su pripremljeni u smeši mobilne faze A i B.

Osnovni rastvori standarda srodnih supstanci 1, 2, 3, 4, 6, 7 i 8 koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljeni su u metanolu. Od osnovnih rastvora pripremljeni su rastvori sledećih koncentracija:  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  za srodne supstance 1, 3, 6 i 8 i  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  za srodne supstance 2, 4 i 7. Rastvori su takođe pripremljeni u smeši mobilne faze A i B.

#### *Procena tačnosti*

Laboratorijska smeša koja sadrži *placebo* i olanzapin u koncentraciji  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljena je u metanolu. Za procenu tačnosti metode pripremljena su po 3 rastvora sledećih koncentracija:  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  (80%),  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (100%) i  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  (120%).

Laboratorijska smeša koja sadrži *placebo* i srodne supstance 1, 2, 3, 4, 6, 7 i 8 u koncentraciji  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljena je u metanolu. Za procenu tačnosti metode pripremljena su po tri rastvora koncentracija:  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$  za sve ispitivane srodne supstance.

### *Procena preciznosti*

Procena preciznosti izvedena je na komercijalno dostupnim Olanzapine<sup>®</sup> tabletama. Rastvori za određivanje sadržaja olanzapina i srodnih supstanci pripremani su odvojeno.

#### *Priprema rastvora za procenu preciznosti olanzapina*

Odmerena je tabletna masa koja sadrži 50 mg olanzapina, prenetu u odmerni sud od 50 mL, zatim je dodato 20 mL metanola i sadržaj je tretiran u ultrazvučnom kupatilu 30 minuta. Odmerni sud je dopunjen do oznake metanolom, a zatim filtriran. Koncentracija olanzapina bila je 1 mg mL<sup>-1</sup>. Od dobijenog rastvora pripremljeno je 6 rastvora olanzapina koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup>.

#### *Priprema rastvora za procenu preciznosti srodnih supstanci olanzapina*

Kako se procena preciznosti vrši na farmaceutskom obliku, a kada su u pitanju srodne supstance neke od njih mogu biti prisutne u koncentracijama koje su niže od limita kvantifikacije, bilo je potrebno najpre odrediti u kojoj koncentraciji se nalaze srodne supstance. Ispitivanje je urađeno injektovanjem rastvora Olanzapine<sup>®</sup> tableta u kojem je koncentracija olanzapina 1 mg mL<sup>-1</sup>. U ispitivanom uzorku detektovane su srodne supstance 1 i 3 a njihova koncentracija određena je iz odgovarajuće kalibracione krive. Dalje, kako bi se izvršilo ispitivanje preciznosti za sve srodne supstance, uzorak tableta je opterećen rastvorima standarda srodnih supstanci 2, 4, 6, 7 i 8 koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup>. Pripremljeno je 6 ovakvih rastvora. Konačne koncentracije srodnih supstanci u rastvoru za ispitivanje preciznosti bile su 2 µg mL<sup>-1</sup> za srodne supstance 2, 4, 6, 7 i 8, 0,58 µg mL<sup>-1</sup> za srodnu supstancu 1 i 1,20 µg mL<sup>-1</sup> za srodnu supstancu 3.

### *Analiza tableta*

Sprašeno je 10 Olanzapine<sup>®</sup> tableta, odmerena je količina tabletna mase koja sadrži 50 mg olanzapina, prenetu u odmerni sud od 50 mL i dodato 20 mL metanola. Smeša je tretirana u ultrazvučnom kupatilu 30 minuta a zatim dopunjena metanolom do oznake i filtrirana. Koncentracija olanzapina u dobijenom rastvoru je 1 mg mL<sup>-1</sup>. Od dobijenog

rastvora pripremljeno je 6 rastvora olanzapina koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Postupak je ponovljen šest puta.

### Mobilna faza

Mobilna faza A sastojala se od  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  rastvora amonijum-formijata, pH podešenog mravljom kiselinom na 3,0 i acetonitrila u odnosu 90:10 V/V. Mobilna faza B je bila čist acetonitril. Udeo vodene faze na početku linearnog gradijenta bio je 5,3%, a gradijent je trajao ukupno 31 minut (13 minuta linearni gradijent, zatim 3 minuta plato za čime je sledilo rekondicioniranje u trajanju od 15 minuta). Uslovi gradijenta prikazani su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Uslovi gradijenta

Vreme (minuti)	Protok ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Udeo acetonitrila (%)	Udeo vodene faze (%)
početak	1,0	94,7	5,3
13,0	1,0	86,4	13,6
13,1	1,0	86,4	13,6
16,0	1,0	94,7	5,3
31,0	1,0	94,7	5,3

### Hromatografski postupak

HPLC sistem koji je podešen prema optimalnim hromatografskim uslovima ispiran je mobilnom fazom do postizanja stabilne bazne linije. Nakon toga injektovani su odgovarajući rastvori analiziranih supstanci, a kao odgovori sistema praćeni su retenciono vreme svih analita i  $s$  faktor za kritične parove analita: srodne supstance 2 i 4; olanzapin i srodna supstanca 6.



## Kompjuterski programi

Rezultati validacije su obrađeni u *Microsoft Office Excel* programu.

## **8.6. Transfer metode na maseni spektrometar i validacija metode**

### Hromatografski uslovi:

Tečni hromatoraf: *Acquity UHPLC System*, Waters, Milford, USA

Kolona: *Acquity UPLC BEH HILIC*, 100×2,1 mm, 1,7 µm veličine  
čestica

Protok mobilne faze: 0,210 mL min<sup>-1</sup>

### Priprema rastvora standarda:

Osnovni rastvori standarda olanzapina i njegovih srdonih supstanci koncentracije 1000 µg mL<sup>-1</sup> pripremljeni su u metanolu. Za proveru pogodnosti sistema pripremljen je rastvor u kome su koncentracije svih analita bile 1 µg mL<sup>-1</sup>.

### Mobilna faza

Sastav mobilne faze je naveden u poglavlju 8.5. Početni udeo vodene faze, trajanje linearnog dela gradijenta i temperatura kolone su bile podešene u skladu sa dobijenom UHPLC metodom uz pomoć *ACQUITY Columns* kalkulatora.

### Priprema rastvora za validaciju metode

#### *Procena linearnosti*

Priprema rastvora internog standarda

Pripremljen je rastvor mianserina u metanolu koncentracije 1 µg mL<sup>-1</sup>.

### Priprema rastvora standarda olanzapina

Osnovni rastvor standarda olanzapina pripremljen je u metanolu, u koncentraciji  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Iz tog rastvora, otpipetirano je  $50 \mu\text{L}$ ,  $100 \mu\text{L}$ ,  $200 \mu\text{L}$ ,  $300 \mu\text{L}$ ,  $400 \mu\text{L}$  i  $500 \mu\text{L}$  u odmerne sudove od  $10 \text{ mL}$ , dodato  $1 \text{ mL}$  rastvora mianserina i dopunjeno optimalnom mobilnom fazom do oznake. Koncentracije dobijenih rastvora bile su  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  a koncentracija internog standarda mianserina  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ .

### Priprema rastvora standarda srodnih supstanci

Osnovni rastvori standarda srodnih supstanci 1, 2, 3, 4, 6, 7 i 8 pripremljeni su u metanolu, u koncentraciji  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Rastvori su dalje razblaženi do dobijanja rastvora koncentracije  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodne supstance 1, 2, 4, 7 i 8,  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 3 i  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 6. U cilju ispitivanja linearnosti metode pripremljeni su rastvori sledećih koncentracija:

- ☐  $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $3,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodne supstance 2 i 8,
- ☐  $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $7,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $15,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 1,
- ☐  $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $100,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $150,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $200,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $300,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $500,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 3,
- ☐  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $6,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $8,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 7,
- ☐  $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $15,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $25,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $50,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $75,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $100,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 6 i
- ☐  $0,8 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $6,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $8,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 4.

Svi rastvori su sadržali interni standard u koncentraciji  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ .

### *Procena tačnosti*

Laboratorijska smeša koja sadrži *placebo* i olanzapin u koncentraciji  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljena je u metanolu. Za procenu tačnosti metode pripremljena su po 3 rastvora sledećih koncentracija:  $0,8 \text{ ng mL}^{-1}$  (80%),  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  (100%) i  $1,2 \text{ ng mL}^{-1}$  (120%), dok je interni standard mianserin bio prisutan u koncentraciji  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Laboratorijska smeša koja sadrži *placebo* i srodne supstance u koncentraciji  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  je pripremljena u metanolu. Koncentracije konačnih rastvora srodnih supstanci za ispitivanje tačnosti su bile:

- $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $7,5 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $9,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 1,
- $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $3,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 2,
- $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $300 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 3,
- $0,8 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $4,8 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 4,
- $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $60 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 6,
- $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$  i  $6,0 \text{ ng mL}^{-1}$  za srodnu supstancu 7.

Svi rastvori su sadržali interni standard u koncentraciji  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ .

### *Procena preciznosti*

Procena preciznosti je sprovedena na komercijalno dostupnim Onzapin<sup>®</sup> tabletama. Zbog praktičnosti, rastvori za određivanje olanzapina i srodnih supstanci pripremani su odvojeno.

#### Priprema rastvora za procenu preciznosti olanzapina

Odmerena je tabletna masa koja sadrži  $2,5 \text{ mg}$  olanzapina, prenetu u odmerni sud od  $25 \text{ mL}$  sa dodatkom  $10 \text{ mL}$  metanola. Sadržaj je tretiran u ultrazvučnom kupatilu  $30$  minuta, dodato je  $250 \mu\text{L}$  osnovnog rastvora mianserina, nakon čega je odmerni sud dopunjen do oznake metanolom i filtriran. Dobijen je osnovni rastvor olanzapina koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Od dobijenog rastvora pripremljeno je  $6$  rastvora olanzapina koncentracije  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Svi rastvori sadržali su  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  internog standarda.

### Priprema rastvora za procenu preciznosti srodnih supstanci olanzapina

Osnovni rastvori srodnih supstanci koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljeni su u metanolu. Daljim razblaživanjem u metanolu pripremljeni su rastvori koncentracije  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ . Tabletna masa koja sadrži  $1 \text{ mg}$  olanzapina preneti je u odmerni sud od  $10 \text{ mL}$  i opterećena rastvorima srodnih supstanci i mianserina, kako bi se dobile sledeće koncentracije: srodna supstanca 1  $7,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ; srodna supstanca 2  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ; srodna supstanca 3  $250 \text{ ng mL}^{-1}$ ; srodna supstanca 4  $4,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ; srodna supstanca 6  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ; srodna supstanca 7  $5,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ; srodna supstanca 8  $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ , a mianserin u koncentraciji  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ .

## 8.7. Ispitivanje stabilnosti olanzapina pod uslovima forsirane degradacije

### Hromatografski uslovi:

Tečni hromatoraf: *Aquity UHPLC System*, Waters, Milford, USA

Kolona: *Acquity UPLC BEH HILIC*, 100×2,1 mm, 1,7 µm veličine  
čestica

Protok mobilne faze: 0,210 mL min<sup>-1</sup>

### Priprema rastvora standarda za izvođenje studija forsirane degradacije:

Osnovni rastvor standarda olanzapina koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup> pripremljen je u metanolu. Osnovni rastvor je razblažen mobilnom fazom do koncentracije 10 µg mL<sup>-1</sup>. Od ovog rastvora otpipetirano je 1 mL i dopunjeno odgovarajućim *stres* agensom do 10 mL. Kao *stres* agensi korišćeni su 0,1 M hlorovodonična kiselina, 0,1 M natrijum-hidroksid, kao i rastvor vodonik-peroksida koncentracije 30%. Koncentracija olanzapina u ovim rastvorima bila je 1 µg mL<sup>-1</sup>.

## **9. REZULTATI I DISKUSIJA**

### **9.1. Modelovanje retencionog ponašanja teorijskim modelima i nova tehnika splajn interpolacije**

Iako već postoji značajan broj publikovanih radova koji se bave HILIC tehnikom, njihov broj i dalje konstantno raste. Kompleksan sistem i nedovoljno razjašnjeni retencioni mehanizmi doveli su do toga da je ova tema još uvek aktuelna. Kako bi se u potpunosti razumeo HILIC sistem potrebno je sprovesti još mnogo istraživanja sa različitim analitima na različitim polarnim stacionarnim fazama.

Pretragom literature uočeno je da glavni fokus, u većini istraživanja koja se bave teorijskim modelima, predstavljaju mehanizmi razdvajanja, koji su veoma kompleksni u tačnoj hromatografiji hidrofilnih interakcija. U skladu sa najnovijim istraživanjima, i naša grupa istraživača je objavila nekoliko radova na tu temu [55–59].

U ovoj disertaciji, urađena je detaljna analiza smeše olanzapina i njegovih osam srodnih supstanci. Strukture svih analita su prikazane u eksperimentalnom delu doktorske disertacije. Srodne supstance oficinalne u osmoj evropskoj farmakopeji [29] i u američkoj farmakopeji [60] su srodna supstanca C (1), srodna supstanca D (3) i srodna supstanca B (5). Ostale srodne supstance nisu oficinalne ni u jednoj farmakopeji. Srodna supstanca 4 predstavlja oksidacioni proizvod olanzapina [61], dok su srodne supstance 6 i 7 nečistoće iz procesa sinteze [51,52]. Ostale dve srodne supstance koje su ispitivane u ovoj disertaciji, 2 i 8, nisu farmakopejske niti su opisane u drugim publikovanim radovima.

Detaljna analiza hromatografskog ponašanja ispitivane smeše obuhvatila je ispitivanje uticaja stacionarne i mobilne faze, kao i strukturnih karakteristika analita na retenciono ponašanje u HILIC sistemu.

### 9.1.1. Odabir eksperimentalnih uslova

S obzirom da je ispitivana smeša analita po prvi put predmet naučnog istraživanja bio je potreban pažljiv pristup u izboru hromatografskih uslova.

Na početku istraživanja odlučeno je da se ispita nekoliko polarnih stacionarnih faza različitih karakteristika kako bi se dobile detaljnije informacije o retencionom ponašanju olanzapina i njegovih srodnih supstanci. Na osnovu pretrage literature odabrane su četiri stacionarne faze, čije su karakteristike opisane u eksperimentalnom delu: silika kolona, diolna, cijano i cviterjonska.

Nakon odabira stacionarnih faza, usledio je izbor sastava mobilne faze. Prethodna istraživanja naše istraživačke grupe [55–59] pokazala su da osobine mobilne faze (pH vrednost, udeo vodene faze, tip pufera i njegova koncentracija) u značajnoj meri utiču na zadržavanje analita u polarnoj koloni. Kako bi se odabrale što povoljnije karakteristike mobilne faze, prvo su u Marvin Sketch programu izračunate pKa, logP i logD vrednosti za sve ispitivane analite. Dobijene vrednosti za pKa, log P i log D prikazane su u tabeli 3:

**Tabela 3.** Vrednosti pKa, log P i log D ispitivanih analita, izračunate u Marvin Sketch programu

<b>Analit</b>	<b>pKa vrednost</b>	<b>LogP</b>	<b>LogD (na pH 3,0)</b>
Olanzapin	4,01	3,09	-1,59
Srodna supstanca 1	3,91	-0,82	-1,74
Srodna supstanca 2	4,04	2,39	1,37
Srodna supstanca 3	3,83	2,48	1,59
Srodna supstanca 4	4,34	6,21	4,18
Srodna supstanca 5	13,6	3,82	3,82
Srodna supstanca 6	4,02	2,72	-1,88
Srodna supstanca 7	19,71	2,36	-0,95
Srodna supstanca 8	4,04	2,29	1,27

Na osnovu analize prikazanih deskriptora, odabrana je kisela sredina za analizu analita kako bi svi bili u katjonskom obliku, tj. u jonizovanom obliku. Problem je predstavljala supstanca 5 koja se u opsegu pH vrednosti prihvatljivih za kolonu ponaša neretenciono. Iz tog razloga je isključena iz dalje studije. Za dalju hromatografsku analizu odabrana je pH 3,0 vrednost mobilne faze.

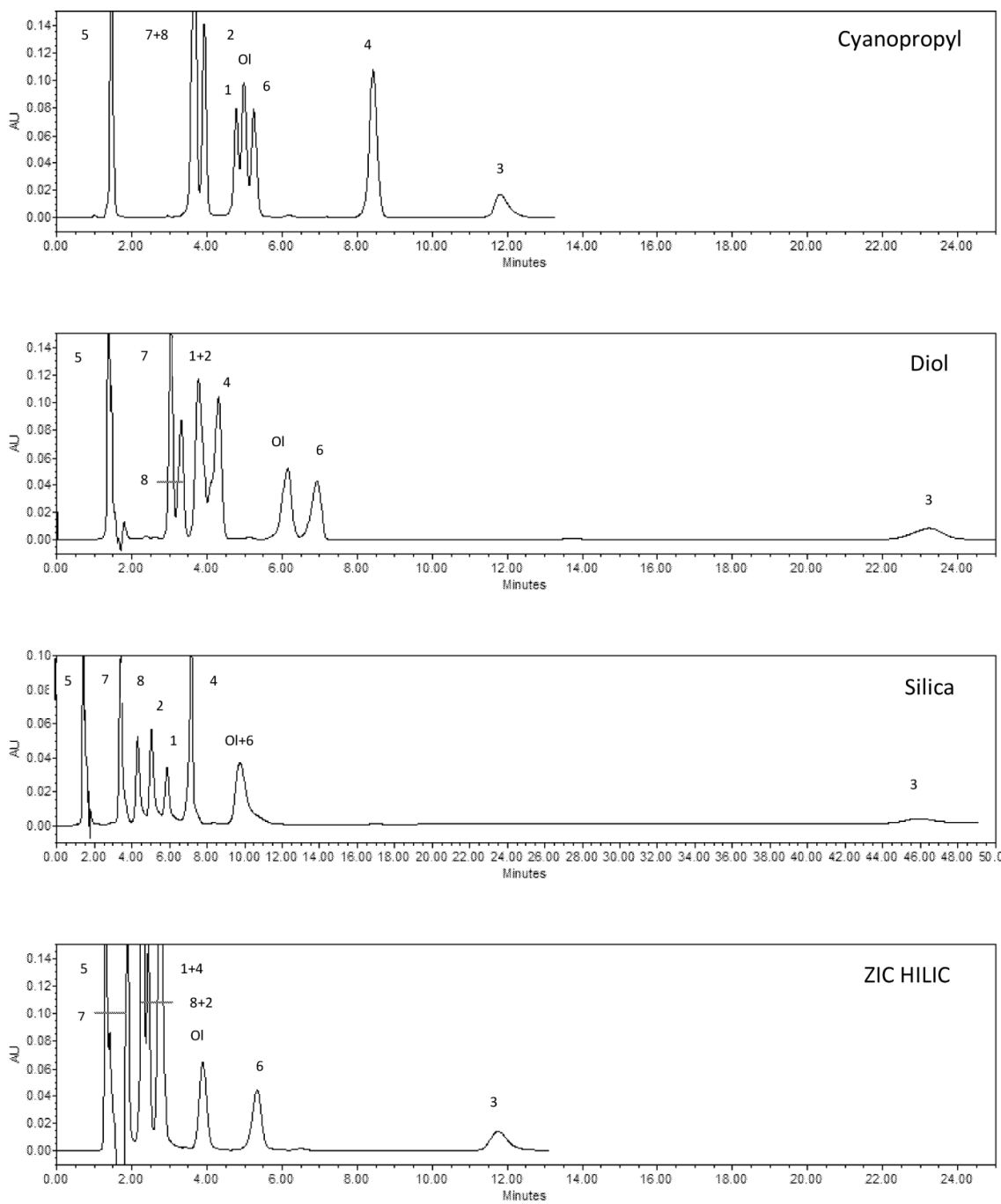
U sledećoj fazi vršen je izbor pufera. Zadovoljavajući izgled pikova dobijen je sa acetatnim puferom te je on izabran za dalju studiju. Prednost primene ovog pufera ogleda se i u njegovoj kompatibilnosti sa masenim detektorom. Koncentracija amonijum-formijata održavana je na konstantnom nivou od 20 mmol L<sup>-1</sup>, a pH vrednost 3,0 podešavana je mravljom kiselinom.



Dalje, tražen je pogodan opseg za ispitivanje uticaja udela vodene faze. Nakon preliminarnih ispitivanja, izabran opseg za kreiranje matematičkih modela bio je od 5% do 20%. Ipak, ti uslovi nisu odgovarali svim analitima. Zbog toga je opseg prilagođen za olanzapin i srodnu supstancu 3 na silika koloni: od 8% do 23%, kao i za srodnu supstancu 3 na diolnoj koloni: od 11% do 26%.

### **9.1.2. Ispitivanje uticaja stacionarne faze na retenciono ponašanje analita**

Prvenstveno, u cilju poređenja selektivnosti između četiri različite stacionarne faze, smeša devet ispitivanih analita je injektovana na svakoj od njih, pod istim hromatografskim uslovima. Udeo mobilne faze je odabran tako da supstance imaju zadovoljavajuće zadržavanje, tj. da se ne eluiraju prebrzo ali i da se ne zadržavaju dugo u koloni. Mobilna faza, koja je dala takve karakteristike hromatograma, sadržala je 14% vodene faze u mobilnoj fazi. Hromatogrami koji su tom prilikom dobijeni prikazani su slici 5.



**Slika 5.** Hromatogrami smeše olanzapina i njegovih osam srodnih supstanci u 4 kolone: cijano, diolnoj, silika i cviterjonskoj. Hromatografski uslovi: mobilna faza 86% acetonitrila i 14% vodenog rastvora amonijum-formijatnog pufera u koncentraciji 20 mmol L<sup>-1</sup>. Protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>, volumen injektovanja 20 µL, a temperatura kolone 25°C \*

Iz ovih hromatograma moguće je izvesti određene opšte zaključke. Analiti se najkraće zadržavaju u cijano koloni usled nepostojanja vodoničnih veza i jonskih interakcija. Zatim sledi diolna kolona, pa silika u kojoj se analiti najduže zadržavaju. U cviterjonskoj stacionarnoj fazi ukupno trajanje analize je slično kao u cijano koloni, međutim selektivnost je dosta lošija, a i pojedinačni analiti se slabije zadržavaju u njoj.

Dalje, jasno je da je srodna supstanca 5 neretenciona na svim kolonama, kao što je i pretpostavljeno tokom izračunavanja važnih strukturnih deskriptora. Redosled eluiranja je skoro u svim slučajevima isti, ali zbog razlika u selektivnosti, analiti nisu podjednako dobro razdvojeni u svim kolonama. Jedina supstanca koja menja mesto jeste srodna supstanca 4, koja se eluira pre olanzapina na diolnoj, silika i cviterjonskoj koloni, ali nakon olanzapina u cijano koloni. Moguće obrazloženje ovog fenomena jeste da je cijano kolona najmanje polarna od četiri ispitivane kolone i samim tim poseduje najmanju moć zadržavanja polarnih analita sa HILIC mobilnim fazama. Srodna supstanca 4 je najmanje polarna supstanca iz cele smeše (logD je 4,18 a logP 6,21) i zbog toga je njeno retenciono vreme pomerenom udesno, što je uzrokovalo zamenu mesta sa olanzapinom.

*\* Tumpa, A., Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. Journal of Chemometrics 2017 : 31*

### 9.1.3. Modelovanje retencionog ponašanja

U sledećoj fazi istraživanja, pristupilo se ispitivanju uticaja polarnijeg rastvarača u mobilnoj fazi (vodeni rastvor pufera), kako bi se dobile informacije o mehanizmima koji su uključeni u celokupan proces retencije. Takođe je izvršeno i fitovanje dobijenih rezultata u određene matematičke modele. Modeli imaju ulogu da otkriju retencione mehanizme koji se odvijaju između stacionarne i mobilne faze, kao i da omoguće predviđanje retencionog ponašanja ispitivanih analita. Što matematički model bolje karakteriše jedan sistem, to će on moći bolje da se iskoristi za predviđanje retencionog ponašanja.

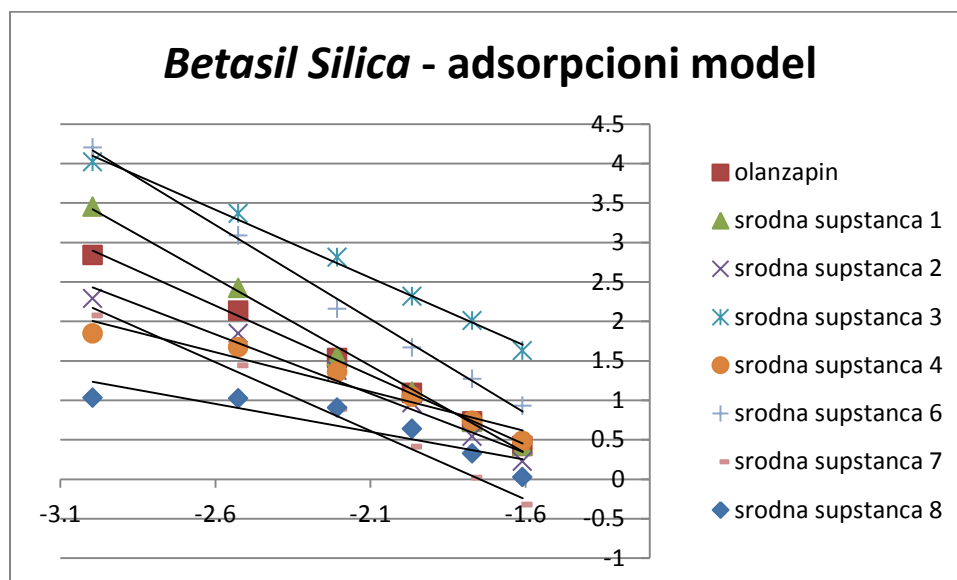
Nakon izvođenja eksperimenata pod uslovima navedenim u poglavlju 7.4, kao odgovori su zabeležena retencionna vremena svih analita pod različitim uslovima, koja su dalje korišćena za fitovanje u različite matematičke modele.

Kako je particija dominantan retencioni mehanizam u HILIC sistemima, pre ispitivanja matematičkih modela, pokušana je da se uspostavi linearna veza između retencionih vremena i logD vrednosti analita. LogD je oktanol / voda particioni koeficijent na određenoj pH vrednosti, koji uzima u obzir i jonizovan i nejonizovan oblik analita, a u slučajevima particije direktno je proporcionalan retencionim vremenima analita. LogD je izračunat za sve analite u Marvin Sketch programu (rezultati prikazani u tabeli 2) i ispitana je linearna zavisnost retencionog faktora od logD vrednosti. Kako ona nije postojala, zaključeno je da particija nije dominantan retencioni mehanizam u ovom HILIC sistemu.

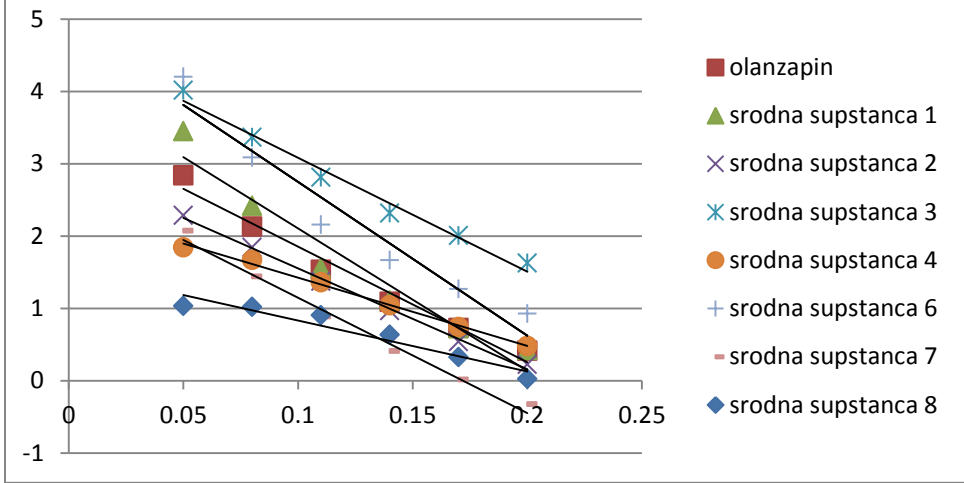
Uočena su još neka odstupanja koja su ukazivala na postojanje više različitih retencionih mehanizama. Na primer, za srodne supstance 4 i 5, logD vrednosti su 4,18 i 3,82. One su najlipofilniji analiti iz cele smeše. Zbog svoje lipofilnosti srodna supstanca 5 je neretencionna, ali se srodna supstanca 4 zadržava u polarnoj HILIC koloni. Jedno od objašnjenja ove pojave jeste da je srodna supstanca 5 takođe i nejonizovana na pH 3,0, dok srodna supstanca postoji kao katjon koji može da reaguje sa stacionarnim fazama. Drugo objašnjenje je broj akceptora vodoničnih veza u molekulima: srodna supstaca 5 ih ima dva, dok srodna supstanca 4 ima šest, što ukazuje na njeno još jače zadržavanje u kolonama

ostvarivanjem vodoničnih veza. Oba ova objašnjenja ukazuju na postojanje više retencionih mehanizama koji su uključeni u zadržavanje analita.

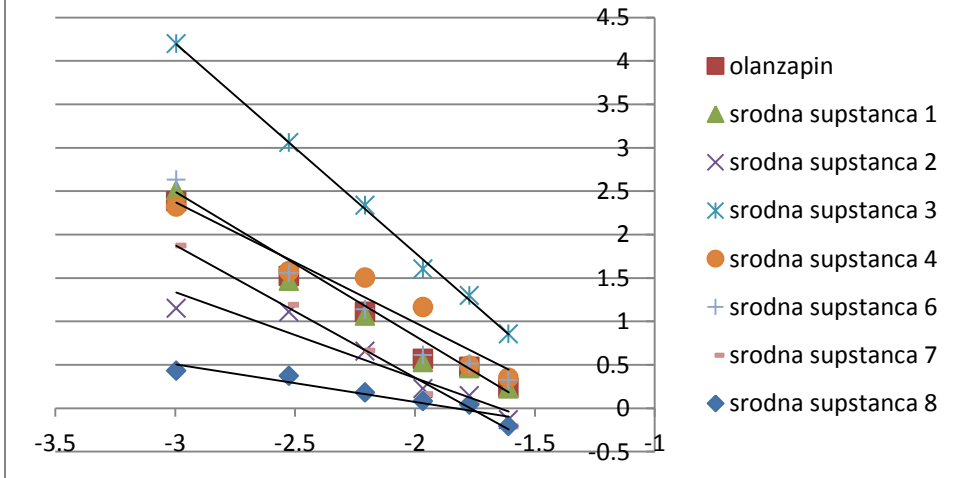
Kako bi se preciznije ispitali retencioni mehanizmi, rezultati su prvo fitovani u dva osnovna matematička modela: nelokalizovani (jednačina 1) i lokalizovani (jednačina 2), oba prethodno opisana u poglavljima 3.1 i 3.2. Modeli su obrađeni u programu Microsoft Excel, a rezultati su prikazani na slici 6. Slika 6 predstavlja zavisnost logaritmovanih vrednosti retencionih faktora analita od logaritmovanih (adsorpcioni model) i linearnih (particioni model) vrednosti udela vodene faze (srodna supstanca 5 je isključena iz dalje analize jer je pokazala neretenciono ponašanje).



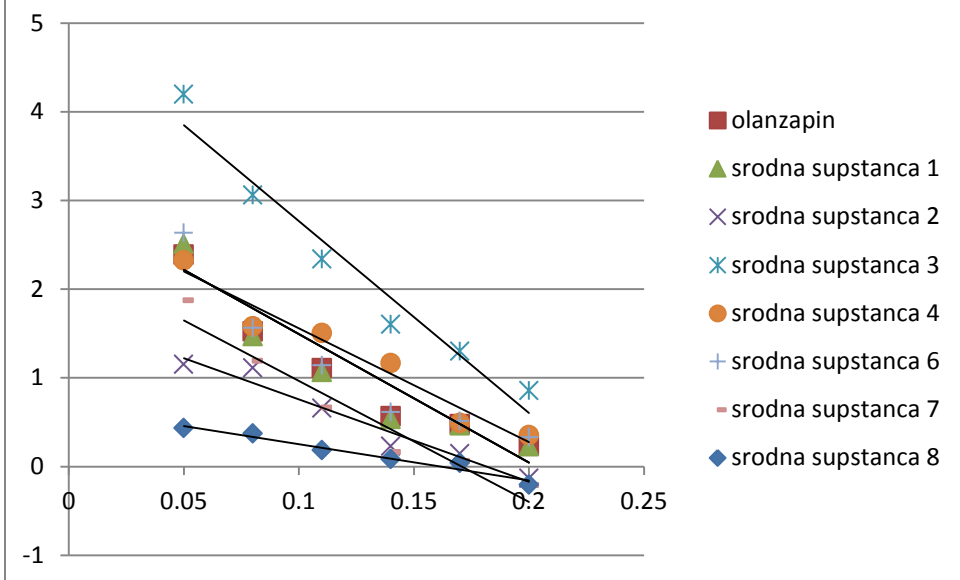
### Betasil Silica - particioni model



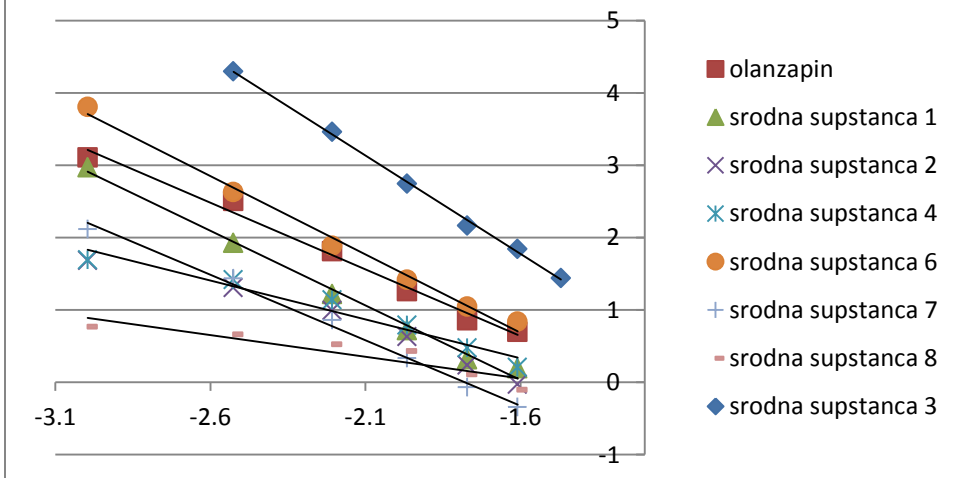
### Betasil CN - adsorpcioni model



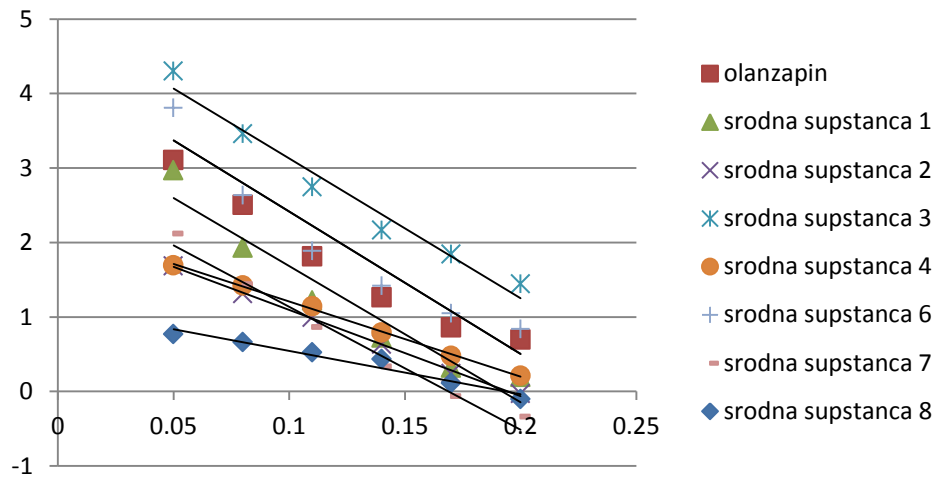
### Betasil CN - particioni model



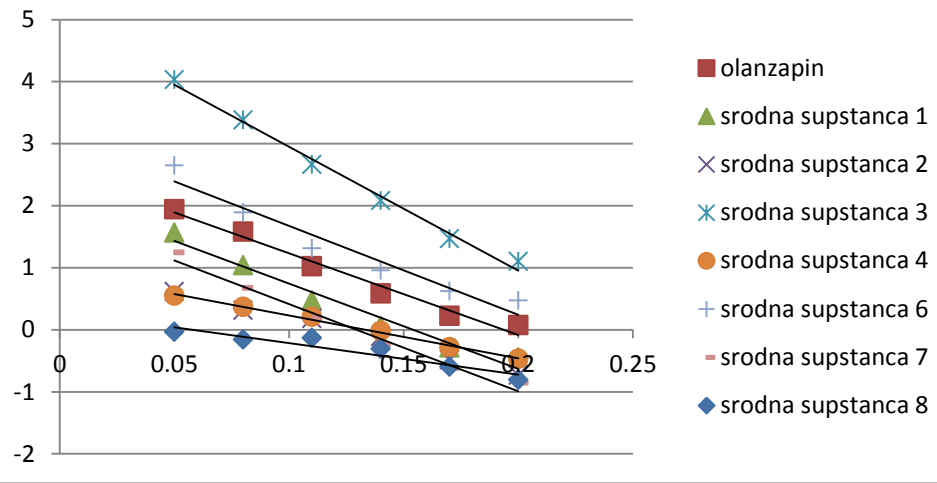
### Betasil Diol - adsorpcioni model



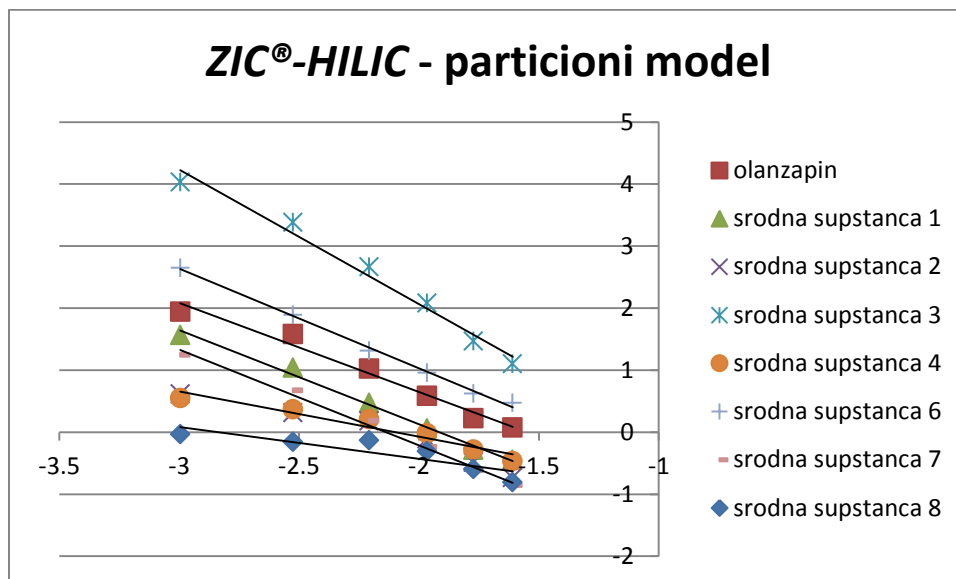
### Betasil Diol - partizioni model



### ZIC®-HILIC - adsorpcioni model







**Slika 6.** Grafici: zavisnost  $\ln k$  od  $\ln \phi$  (lokalizovani adsorpcioni model) i zavisnost  $\ln k$  od  $\phi$  (nelokalizovani particioni model) prikazane za olanzapin i sedam nečistoća na sve četiri kolone \*

Statistički parametri koji su se koristili za ocenu podobnosti matematičkih modela su koeficijent determinacije ( $R^2$ ) i unakrsno validirani koeficijent determinacije ( $Q^2$ ). Dobijene vrednosti nisu bile zadovoljavajuće ni za jednu od kolona. Vrednosti  $R^2$  su se kretale u sledećim opsezima za različite kolone: (silika: 0,7890–0,9977, cijano: 0,9003–0,9978, diolna: 0,8504–0,9982 i cviterjonska: 0,7700–0,9970), dok su dobijene  $Q^2$  vrednosti i očekivano niže od  $R^2$ , a u nekim slučajevima i neprihvatljivo male: (na primer, za srodnu supstancu 8 na silika koloni  $Q^2$  je bilo 0,2122). Vrednosti ovih statističkih parametara su prikazane u tabeli 4.

\* Tumpa, A., Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. *Journal of Chemometrics* 2017 : 31

**Tabela 4.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) i koeficijenti predikcije ( $Q^2$ ) za adsorpcione i particione modele

	<b>Adsorpcioni model</b>		<b>Particioni model</b>	
	$\ln k = \ln k_w - S \ln \varphi$		$\ln k = \ln k_w - S \varphi$	
<b><i>Betasil Silica</i></b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>Q^2</math></b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>Q^2</math></b>
olanzapin	0,9977	0,9900	0,9748	0,9204
srodna supstanca 1	0,9965	0,9926	0,9406	0,8162
srodna supstanca 2	0,9751	0,8998	0,9969	0,9900
srodna supstanca 3	0,9938	0,9984	0,9824	0,9477
srodna supstanca 4	0,9365	0,7392	0,9948	0,9848
srodna supstanca 6	0,9965	0,9926	0,9405	0,8165
srodna supstanca 7	0,9916	0,9652	0,9871	0,9587
srodna supstanca 8	0,7890	0,2122	0,9242	0,7669
<b><i>Betasil CN</i></b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>Q^2</math></b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>Q^2</math></b>
olanzapin	0,9875	0,9667	0,9196	0,7505
srodna supstanca 1	0,9765	0,9177	0,8897	0,6495
srodna supstanca 2	0,9156	0,6690	0,9565	0,9109
srodna supstanca 3	0,9978	0,9964	0,9557	0,8622
srodna supstanca 4	0,9394	0,8908	0,9540	0,8919
srodna supstanca 6	0,9746	0,9067	0,8829	0,6208
srodna supstanca 7	0,9920	0,9862	0,9407	0,8294

srodna supstanca 8	0,9003	0,6395	0,9609	0,8964
<b><i>Betasil Diol</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
olanzapin	0,9882	0,9606	0,9666	0,8966
srodna supstanca 1	0,9935	0,9798	0,9282	0,7599
srodna supstanca 2	0,9641	0,8697	0,9981	0,9949
srodna supstanca 3	0,9982	0,9969	0,9693	0,9082
srodna supstanca 4	0,9530	0,8191	0,9984	0,9965
srodna supstanca 6	0,9925	0,9722	0,9205	0,7390
srodna supstanca 7	0,9940	0,9764	0,9797	0,9336
srodna supstanca 8	0,8504	0,5071	0,9535	0,8833
<b><i>ZIC-HILIC</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
olanzapin	0,9765	0,9085	0,9775	0,9349
srodna supstanca 1	0,9919	0,9710	0,9704	0,9073
srodna supstanca 2	0,9248	0,7717	0,9869	0,9763
srodna supstanca 3	0,9805	0,9204	0,9922	0,9751
srodna supstanca 4	0,9316	0,7554	0,9939	0,9865
srodna supstanca 6	0,9970	0,9923	0,9427	0,8116
srodna supstanca 7	0,9931	0,9729	0,9828	0,9423
srodna supstanca 8	0,7700	0,5616	0,8985	0,8647

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da ni adsorpcioni ni particioni model ne opisuju u potpunosti retenciono ponašanje analiziranih supstanci, što ponovo ukazuje na to da su i drugi procesi uključeni u zadržavanje analita na kolonama. Takvi rezultati su i bili očekivani zbog kompleksnosti sistema. Zbog nemogućnosti adsorpcionog i particionog modela da opišu sistem, u nastavku istraživanja ispitani su i drugi, kompleksniji matematički modeli.

Podaci su dalje korišćeni za kreiranje mešovitog modela (jednačina 3), koji ima linearni i nelinearni deo jednačine i opisuje kombinaciju oba prethodno pomenuta procesa. Očekivalo se da će mešoviti model, iz tih razloga, bolje opisivati sistem, što je i dokazano dobijanjem značajno viših  $R^2$  vrednosti (silika: 0,9972–0,9999, cijano: 0,9576–0,9978, diolna: 0,9659–0,9998 i cviterjonska: 0,9661–0,9986). Koeficijenti determinacije  $R^2$  koji se koriste kao ocena sposobnosti modela da opiše sistem, kao i koeficijenti predviđanja za mešoviti model prikazani su u tabeli 5.

**Tabela 5.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) i koeficijenti predikcije ( $Q^2$ ) za mešoviti model

	<b>Mešoviti model</b>	
	$\ln k = \ln k_w + S_1\varphi + S_2\ln \varphi$	
<b><i>Betasil Silica</i></b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>Q^2</math></b>
olanzapin	0,9999	0,9922
srodna supstanca 1	0,9983	0,9853
srodna supstanca 2	0,9989	0,9866
srodna supstanca 3	0,9991	0,9970
srodna supstanca 4	0,9972	0,9596
srodna supstanca 6	0,9984	0,9863
srodna supstanca 7	0,9994	0,9919

srodna supstanca 8	0,9984	0,9935
<b><i>Betasil CN</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
olanzapin	0,9932	0,9844
srodna supstanca 1	0,9928	0,9718
srodna supstanca 2	0,9565	0,4961
srodna supstanca 3	0,9978	0,9943
srodna supstanca 4	0,9576	0,6956
srodna supstanca 6	0,9945	0,9802
srodna supstanca 7	0,9930	0,9586
srodna supstanca 8	0,9645	0,8598
<b><i>Betasil Diol</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
olanzapin	0,9902	0,8589
srodna supstanca 1	0,9981	0,9804
srodna supstanca 2	0,9983	0,9931
srodna supstanca 3	0,9986	0,9920
srodna supstanca 4	0,9987	0,9905
srodna supstanca 6	0,9998	0,9988
srodna supstanca 7	0,9980	0,9760
srodna supstanca 8	0,9659	0,9108
<b><i>ZIC HILIC</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
olanzapin	0,9868	0,8085

srodna supstanca 1	0,9939	0,9118
srodna supstanca 2	0,9906	0,9270
srodna supstanca 3	0,9970	0,9642
srodna supstanca 4	0,9975	0,9898
srodna supstanca 6	0,9986	0,9848
srodna supstanca 7	0,9981	0,9833
srodna supstanca 8	0,9661	0,7464

Iako značajno viši, ni statistički parametri mešovitog modela nisu dovoljno dobri za precizno karakterisanje sistema i predviđanje retencionog ponašanja. Zaključuje se da adsorpcija i particija imaju zajedno najviši uticaj na retenciono ponašanje analita u HILIC sistemu, ali je ipak za precizniju karakterizaciju potrebno dobiti modele koji imaju bolje statističke parametre.

U slučajevima kada linearni nisu adekvatni, kvadratni polinomi se najčešće koriste za opisivanje kompleksnih sistema, kao što je slučaj u ovom istraživanju. Imajući to u vidu, isti podaci su dalje iskorišćeni za kreiranje kvadratnog modela (jednačina 4). Koeficijenti determinacije su takođe bili merilo sposobnosti modela da opiše sistem i dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 6.

**Tabela 6.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) i koeficijenti predikcije ( $Q^2$ ) za kvadratni model

	<b>Kvadratni model</b>	
	$\ln k = \ln k_w + S_1 * \varphi + S_2 * \varphi^2$	
<i>Betasil Silica</i>	$R^2$	$Q^2$
olanzapin	0,9995	0,9960
srodna supstanca 1	0,9972	0,9804
srodna supstanca 2	0,9994	0,9948
srodna supstanca 3	0,9989	0,9932
srodna supstanca 4	0,9961	0,9604
srodna supstanca 6	0,9971	0,9780
srodna supstanca 7	1,0000	0,9999
srodna supstanca 8	0,9939	0,9428
<i>Betasil CN</i>	$R^2$	$Q^2$
olanzapin	0,9903	0,9411
srodna supstanca 1	0,9852	0,8820
srodna supstanca 2	0,9573	0,7299
srodna supstanca 3	0,9966	0,9756
srodna supstanca 4	0,9558	0,8009
srodna supstanca 6	0,9871	0,9002
srodna supstanca 7	0,9946	0,9757
srodna supstanca 8	0,9657	0,8251

<i>Betasil Diol</i>	$R^2$	$Q^2$
olanzapin	0,9963	0,9617
srodna supstanca 1	0,9990	0,9936
srodna supstanca 2	0,9984	0,9909
srodna supstanca 3	0,9986	0,9912
srodna supstanca 4	0,9985	0,9878
srodna supstanca 6	0,9966	0,9679
srodna supstanca 7	0,9998	0,9984
srodna supstanca 8	0,9706	0,9632
<i>ZIC Hilic</i>	$R^2$	$Q^2$
olanzapin	0,9919	0,9179
srodna supstanca 1	0,9980	0,9831
srodna supstanca 2	0,9914	0,9636
srodna supstanca 3	0,9985	0,9863
srodna supstanca 4	0,9972	0,9824
srodna supstanca 6	0,9988	0,9933
srodna supstanca 7	0,9998	0,9985
srodna supstanca 8	0,9753	0,8718

Rezultati pokazuju dobru moć opisivanja sistema pomoću kvadratnog modela, u skladu sa visokim vrednostima  $R^2$  and  $Q^2$ . Međutim, kao što je već naznačeno u poglavlju 3.3, kvadratni model ima određene nesavršenosti (naročito da vrši ekstrapolaciju vrednosti), zbog čega se uglavnom ne koristi za predviđanje retencionog ponašanja.



Postoji nekoliko dokumentovanih pokušaja različitih autora da opišu HILIC sistem različitim empirijskim modelima koje bi dobili iz rezultata eksperimentalnih analiza. Za ovu doktorsku disertaciju je odlučeno, pre nego što bi se kreirao još jedan novi model, da se rezultati fituju u jedan od već postojećih empirijskih modela: Neue model (jednačina 8). Rezultati su prikazani u tabeli 7:

**Tabela 7.** Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) i koeficijenti predikcije ( $Q^2$ ) za Neue empirijski model

	<b>Neue model</b>	
	$\ln(k) = \ln(k_w) + 2\ln(1 + S_2\phi) - S_1 \phi(1 + S_2\phi)$	
<i>Betasil Silica</i>	$R^2$	$Q^2$
olanzapin	0,9999	0,9992
srodna supstanca 1	0,9990	0,9894
srodna supstanca 2	0,9993	0,9843
srodna supstanca 3	0,9992	0,9975
srodna supstanca 4	0,9987	0,9836
srodna supstanca 6	0,9988	0,9881
srodna supstanca 7	0,9986	0,9851
srodna supstanca 8	0,9959	0,9626
<i>Betasil CN</i>	$R^2$	$Q^2$
olanzapin	0,9932	0,9818
srodna supstanca 1	0,9927	0,9626
srodna supstanca 2	0,9571	0,5814

srodna supstanca 3	0,9980	0,9948
srodna supstanca 4	0,9560	0,8204
srodna supstanca 6	0,9945	0,9734
srodna supstanca 7	0,9941	0,9687
srodna supstanca 8	0,9723	0,8208
<b><i>Betasil Diol</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
olanzapin	0,9932	0,8973
srodna supstanca 1	0,9986	0,9881
srodna supstanca 2	0,9984	0,9905
srodna supstanca 3	0,9989	0,9938
srodna supstanca 4	0,9985	0,9873
srodna supstanca 6	0,9999	0,9996
srodna supstanca 7	0,9992	0,9921
srodna supstanca 8	0,9192	0,7878
<b><i>ZIC HILIC</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
olanzapin	0,9900	0,8725
srodna supstanca 1	0,9963	0,9455
srodna supstanca 2	0,9870	0,9018
srodna supstanca 3	0,9981	0,9816
srodna supstanca 4	0,9965	0,9510
srodna supstanca 6	0,9992	0,9808

šrodna supstanca 7	0,9992	0,9813
šrodna supstanca 8	0,9278	0,3431

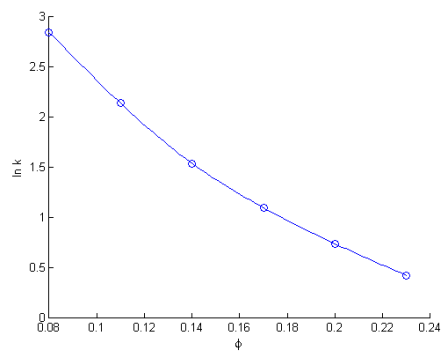
Rezultati ponovo pokazuju nedovoljno dobro opisivanje ovog kompleksnog sistema, zbog čega se u sledećem delu disertacije vršilo kreiranje novog, splajn interpolacionog modela, od kojeg je, na osnovu teorijskih predznanja očekivano da zbog njegovih specifičnosti posmatrani sistem bolje opiše.

#### **9.1.4. Kreiranje novog empirijskog modela splajn interpolacijom**

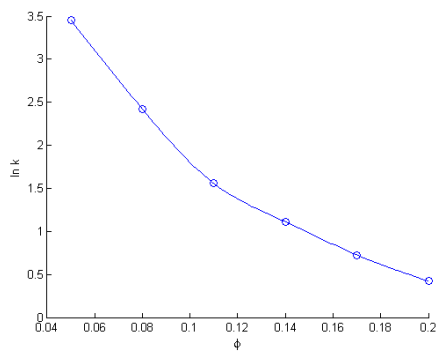
Nakon testiranja nekoliko teorijskih i jednog empirijskog modela, shvaćeno je da će se savršen model veoma teško naći. Uočeno je da se dobijeni eksperimentalni rezultati ne mogu dobro uklopiti u već postojeće teorijske i empirijske modele u određenim delovima eksperimentalnog prostora, dok se u drugima uklapaju dosta bolje. Ipak, ovaj fenomen je i bio očekivan, zbog različitih retencionih mehanizama koji su prisutni pri većim, odnosno manjim udelima acetonitrila u mobilnoj fazi.

Uzimajući sve navedeno u obzir, kreiran je novi, splajn interpolacioni model, uz pomoć već postojećih eksperimentalnih podataka. Samo kreiranje kubnog splajna je detaljno opisano u poglavlju 4. Budući da je za svaku od supstanci dostupno šest eksperimentalnih tačaka, kubni splajn je kreiran za pet intervala, a na svakom od tih intervala kreiran je polinom trećeg reda. Konstruisani su splajn modeli za analizirane supstance i na slici 7 prikazani splajn modeli dobijeni na silika.

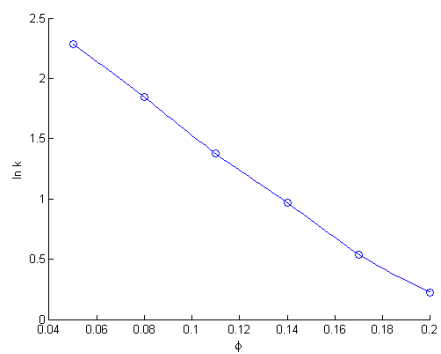
A) Olanzapin



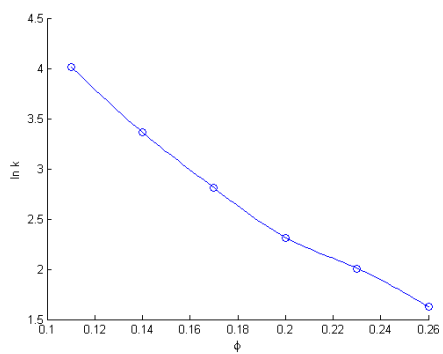
B) Srodna supstanca 1



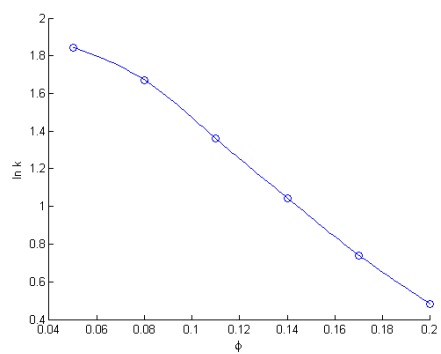
C) Srodna supstanca 2



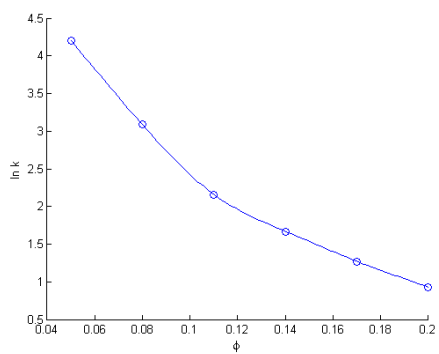
D) Srodna supstanca 3



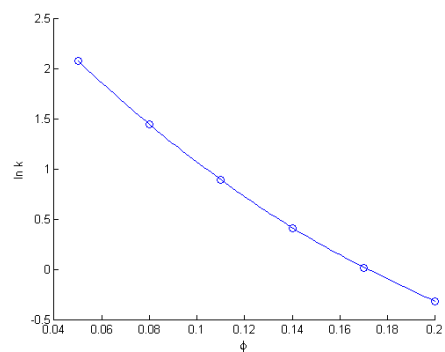
E) Srodna supstanca 4



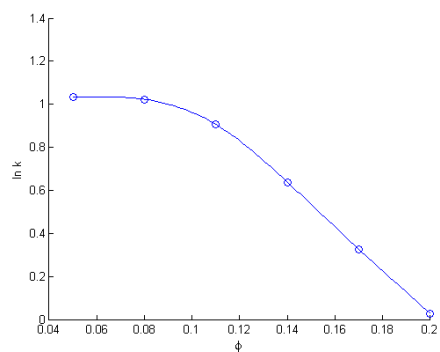
F) Srodna supstanca 6



G) Srodna supstanca 7



H) Srodna supstanca 8



Slika 7. Grafički prikaz splajna za sve ispitivane analite na *Betasil Silica* koloni \*

\* Tumpa, A., Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. *Journal of Chemometrics* 2017 : 31

Koeficijenti polinoma  $P_{i3}(x)$  koji aproksimiraju funkciju na intervalu  $[x_{i-1}, x_i]$  su  $a_{i0}, a_{i1}, a_{i2}$  i  $a_{i3}, i=1, 2, \dots, 5$ , a prikazani su u tabeli 8.

**Tabela 8.** Dobijeni koeficijenti ( $a_{10}$ - $a_{53}$ ) kao i koeficijent predviđanja  $Q^2$  za splajn na A) *Betasil Silica*, B) *Betasil CN*, C) *Betasil Diol* i D) *ZIC-HILIC* kolonama\*

A) *Betasil Silica*

	$a_{10}$	$a_{11}$	$a_{12}$	$a_{13}$	$a_{20}$	$a_{21}$	$a_{22}$	$a_{23}$
olanzapin	4,4	-10,2	-175,5	731,4	4,8	-22,2	-66,8	402,1
ss 1	5,1	-30,6	-84,8	565,1	3,7	22,4	-747,5	3326,5
ss 2	3,1	-17,8	68,8	-458,4	2,2	16,1	-254,0	1303,1
ss 3	5,2	12,6	-320,3	970,7	11,1	-114,0	584,3	-1183,2
ss 4	2,2	-14,6	200,2	-1334,5	0,7	42,5	-513,5	1639,3
ss 6	6,0	-32,2	-112,9	752,4	4,8	14,4	-695,2	3178,6
ss 7	3,1	-16,9	-90,9	606,7	3,5	-32,2	99,0	-185,2
ss 8	1,1	-5,1	106,4	-709,5	0,9	0,1	42,9	-444,8
	$a_{30}$	$a_{31}$	$a_{32}$	$a_{33}$	$a_{40}$	$a_{41}$	$a_{42}$	$a_{43}$
olanzapin	7,9	-87,1	397,1	-702,7	5,0	-37,0	102,3	-124,6
ss 1	14,2	-263,3	1850,1	-4545,1	-2,7	98,1	-731,7	1602,1
ss 2	5,9	-86,8	581,5	-1531,6	-3,5	115,2	-861,9	1905,0
ss 3	-6,0	187,5	-1189,7	2295,3	38,7	-482,3	2159,6	-3286,9
ss 4	3,4	-31,2	155,9	-389,2	0,9	23,3	-232,8	536,2
ss 6	14,4	-253,8	1742,4	-4207,7	0,6	45,3	-393,8	878,3
ss 7	3,1	-20,7	-5,1	130,3	3,9	-38,4	120,8	-169,4

ss 8	-0,9	51,6	-425,3	974,1	0,8	15,2	-165,7	355,9
	$a_{50}$	$a_{51}$	$a_{52}$	$a_{53}$	$Q^2$			
olanzapin	6,5	-58,8	211,3	-306,2	<b>0,9965</b>			
ss 1	9,8	-123,0	569,1	-948,6	<b>0,9920</b>			
ss 2	11,8	-155,5	73,1	-1218,0	<b>0,9936</b>			
ss 3	-15,9	230,4	-939,2	1204,0	<b>0,9930</b>			
ss 4	5,7	-62,4	271,0	-451,7	<b>0,9831</b>			
ss 6	7,9	-83,0	360,9	-601,6	<b>0,9932</b>			
ss 7	4,9	-56,8	229,4	-382,4	<b>0,9977</b>			
ss 8	3,4	-30,9	105,4	-175,6	<b>0,9855</b>			

B) Betasil CN

	$a_{10}$	$a_{11}$	$a_{12}$	$a_{13}$	$a_{20}$	$a_{21}$	$a_{22}$	$a_{23}$
olanzapin	3,4	5,4	-779,4	5196,3	10,8	-270,5	2670,3	-9177,7
ss 1	4,0	12,0	-1051,0	7009,0	13,0	-344,0	3394,0	-11514,0
ss 2	1,5	-27,1	585,2	-3901,1	-2,6	127,3	-1345,3	4142,4
ss 3	0	0	-0,1	0,4	0	0	0,3	-1,0
ss 4	3,0	21,0	-1051,0	7007,0	12,0	-310,0	3098,0	-10282,0
ss 6	4,0	11,0	-1058,0	7055,0	13,0	-339,0	3316,0	-11170,0
ss 7	2,9	-11,0	-265,4	1769,1	5,4	-105,8	920,0	-3170,0
ss 8	0,7	-11,4	213,1	-1420,6	-1,3	61,9	-703,7	2399,5
	$a_{30}$	$a_{31}$	$a_{32}$	$a_{33}$	$a_{40}$	$a_{41}$	$a_{42}$	$a_{43}$
olanzapin	-14,6	421,8	-3624,0	9896,0	36,8	-679,8	4244,9	-8839,5
ss 1	-16,0	462,0	-3936,0	10700,0	38,0	-713,0	4458,0	-9286,0
ss 2	-1,9	108,0	-1169,4	3609,4	26,1	-492,4	3119,5	-6602,3
ss 3	0	0,1	-0,4	1,0	0	0	0,2	-0,5
ss 4	-1,0	46,0	-140,0	-468,0	-29,0	644,0	-4417,0	9714,0
ss 6	-15,0	417,0	-3556,0	9653,0	33,0	-606,0	3746,0	-7734,0
ss 7	-1,0	233,2	-2162,1	6169,8	30,6	-574,0	3603,7	-7558,3
ss 8	2,1	-31,4	144,2	-170,0	9,6	-191,5	1288,0	-2893,5
	$a_{50}$	$a_{51}$	$a_{52}$	$a_{53}$	$Q^2$			
olanzapin	-21,0	340,2	-1755,0	2924,9	<b>0,8709</b>			
ss 1	-22,0	360,0	-1855,0	3091,0	<b>0,8090</b>			



ss 2	-19,8	318,5	-1650,9	2751,6	<b>0,8136</b>
ss 3	0	0	-0,1	0.0994*1 .0e+009	<b>0,9587</b>
ss 4	48,0	-715, 0	3583,0	-5971,0	<b>0,6672</b>
ss 6	-16,0	255,0	-1318,0	2196,0	<b>0,8274</b>
ss 7	-20,2	323,1	-1673,7	2789,4	<b>0,9596</b>
ss 8	-14,9	240,1	-1250,8	2084,6	<b>0,7444</b>

C) Betasil Diol

	$a_{10}$	$a_{11}$	$a_{12}$	$a_{13}$	$a_{20}$	$a_{21}$	$a_{22}$	$a_{23}$
olanzapin	4,2	-27,4	166,8	-1112,1	2,5	35,0	-613,3	2138,5
ss 1	4,5	-16,6	-412,7	2751,6	6,6	-96,9	591,3	-1432,1
ss 2	2,3	-8,1	-100,4	669,4	3,2	-42,7	331,9	-1132,0
ss 3	6,1	-10,4	-229,6	956,7	7,7	-52,6	154,0	-205,8
ss 4	2,1	-8,2	-21,8	145,5	2,7	-29,5	244,6	-964,7
ss 6	5,5	-15,6	-534,4	3562,5	8,3	-121,0	782,3	-1923,8
ss 7	3,2	-16,3	-143,6	957,2	4,2	-53,4	320,1	-974,7
ss 8	1,0	-7,9	98,4	-656,0	-0,4	43,7	-545,8	2028,1
	$a_{30}$	$a_{31}$	$a_{32}$	$a_{33}$	$a_{40}$	$a_{41}$	$a_{42}$	$a_{43}$
olanzapin	5,1	-35,4	26,7	199,0	4,4	-19,9	-83,7	461,9
ss 1	6,6	-97,4	595,8	-1445,5	-4,8	148,3	-1159,0	2732,4
ss 2	1,7	-3,7	-21,9	-59,9	-3,4	107,4	-816,0	1831,0
ss 3	6,3	-22,7	-59,9	303,7	8,7	-66,5	197,7	-201,6
ss 4	-0,3	52,8	-503,4	1302,0	3,8	-34,4	119,2	-180,5
ss 6	7,8	-106,8	653,7	-1534,0	-0,3	65,5	-577,3	1396,9
ss 7	1,6	16,4	-314,8	949,2	4,2	-39,1	82,1	4,0
ss 8	8,1	-187,1	1552,5	-4330,3	-16,7	344,8	-2246,7	4715,4
	$a_{50}$	$a_{51}$	$a_{52}$	$a_{53}$	$Q^2$			
olanzapin	15,0	-206,3	1012,3	-1687,2	<b>0,9824</b>			
ss 1	21,4	-314,6	1563,9	-2606,5	<b>0,9643</b>			

ss 2	12,0	-164,7	785,1	-1308,4	<b>0,9886</b>
ss 3	13,9	-144,7	588,6	-853,0	<b>0,9935</b>
ss 4	4,4	44,9	181,5	-302,4	<b>0,9979</b>
ss 6	14,0	-185,8	901,0	-1501,6	<b>0,9643</b>
ss 7	8,8	-120,6	561,4	-935,6	<b>0,9935</b>
ss 8	15,1	-216,4	1054,3	-1757,2	<b>0,9234</b>

D) ZIC-HILIC

	$a_{10}$	$a_{11}$	$a_{12}$	$a_{13}$	$a_{20}$	$a_{21}$	$a_{22}$	$a_{23}$
olanzapin	2,7	-26,8	334,1	-2227,1	-0,4	92,0	-1150,4	3958,0
ss 1	2,5	-23,1	128,3	-855,4	0,7	43,0	-697,2	2584,4
ss 2	1,0	3,6	-311,4	2076,2	4,0	-111,8	1130,8	-3932,9
ss 3	5,2	-293,0	179,6	-1197,4	3,0	53,7	-857,6	3124,3
ss 4	0,8	-3,6	-54,4	362,7	1,5	-29,7	271,5	-995,1
ss 6	3,8	-17,2	-185,9	1239,4	4,1	-27,6	-56,2	699,1
ss 7	2,1	-14,6	-104,0	693,2	2,6	-32,5	119,1	-236,3
ss 8	0	8,6	-286,8	1912,3	3,1	-106,3	1148,7	-4069,0
	$a_{30}$	$a_{31}$	$a_{32}$	$a_{33}$	$a_{40}$	$a_{41}$	$a_{42}$	$a_{43}$
olanzapin	7,5	-124,9	821,0	-2015,8	-4,5	133,1	-1021,9	2372,0
ss 1	6,8	-123,1	812,2	-1989,6	-4,1	112,0	-866,5	2007,2
ss 2	-2,8	74,8	-565,5	1207,4	-5,0	121,6	-899,8	2003,3
ss 3	11,6	-182,1	1285,5	-3370,0	-8,9	257,6	-1855,1	4107,7
ss 4	-0,2	16,2	-145,8	269,4	-2,5	67,2	-509,8	1136,1
ss 6	8,7	153,0	1083,5	-2754,5	-6,5	172,2	-1238,8	2774,6
ss 7	3,0	-42,0	206,0	-499,7	-2,1	67,8	-578,6	1368,3
ss 8	-4,2	91,7	-651,4	1385,9	-5,1	111,5	-792,6	1721,9
	$a_{50}$	$a_{51}$	$a_{52}$	$a_{53}$	$Q^2$			
olanzapin	17,4	-253,5	1252,2	-2087,0	<b>0,9614</b>			
ss 1	14,3	-213,5	1048,0	-1746,6	<b>0,9845</b>			

ss 2	11,5	-169,5	812,4	-1354,0	<b>0,9510</b>
ss 3	24,4	-329,5	1598,7	-2664,5	<b>0,9847</b>
ss 4	6,8	-98,4	463,9	-773,2	<b>0,9898</b>
ss 6	16,8	-238,2	1175,2	-1958,6	<b>0,9760</b>
ss 7	11,1	-165,7	795,3	-1325,5	<b>0,9906</b>
ss 8	8,0	-120,2	570,6	-951,0	<b>0,8472</b>

*\* Tumpa, A., Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. Journal of Chemometrics 2017 : 31*

Jedan od uslova za kreiranje splajna je da se njegove vrednosti podudaraju sa eksperimentalnim vrednostima u tačkama kroz koje prolazi. Iz tog razloga,  $R^2$  će za splajn modele uvek biti najviši mogući (jedan) i ta vrednost nije relevantna za poređenje sa prethodnim modelima. Za poređenje su korišćene  $Q^2$  vrednosti kao sposobnost modela da opiše sistem i predvidi retenciono ponašanje analiziranih supstanci. One su poslužile za poređenje rezultata za splajn modele i teorijske i eksperimentalne modele iz prethodnog dela disertacije.

U ovom slučaju, unakrsno validirani koeficijent predstavlja bolji parametar za ocenu modela, jer se on dobija unakrsnom validacijom i izbacivanjem po jednog člana iz skupa, time pokazujući sposobnost da se ovaj model koristi i za predviđanja retencionog ponašanja određenih anlita. Dobijene  $Q^2$  vrednosti su prikazane u poslednjoj koloni tabele 7. Može se primetiti da su sve  $Q^2$  vrednosti vrlo blizu jedinici, što ukazuje na kvalitet predloženog modela. Takođe, proverene su i sposobnosti ekstrapolacije splajna u regionima bliskim spoljašnjim ivicama eksperimentalnog skupa. I taj test je pokazao dobre sposobnosti predviđanja ovog modela, što predstavlja njegovu veliku prednost nad kvadratnim modelom.

Tehnika splajn interpolacije se može koristiti za različite smeše supstanci, kao i za različite hromatografske sisteme. Naročito može biti korisna u slučajevima kada postojeći modeli nisu zadovoljavajući za opis sistema. Iako kreirani splajn interpolacioni model ne daje uvid u retencione mehanizme koji su uključeni u celokupan proces, on predstavlja odličnu osnovu za precizno predviđanje retencionog ponašanja ispitivanih supstanci.

Kako bi ta tvrdnja bila potvrđena, izvršeno je eksperimentalno testiranje sposobnosti predviđanja splajn modela. Izabrana je nasumično jedna tačka iz ekpserimentalnog opsega,  $\varphi=16\%$  i izvedeni su eksperimenti. Eksperimentalno dobijene vrednosti su upoređene sa onima koje su izračunate uz pomoć splajn interpolacije i rezultati su prikazani u tabeli 9.

**Tabela 9.** Upoređivanje ekperimentalno dobijenih vrednosti i vrednosti predviđenih uz pomoć splajn modela, za eksperimentalnu tačku  $\varphi=16\%$

	<b>Predviđena <math>\ln k</math> vrednost</b>	<b>Eksperimentalno dobijena <math>\ln k</math> vrednost</b>	<b>Greška (%)</b>
olanzapin	1,2246	1,3437	8,9
srodna supstanca 1	0,8478	0,7736	9,6
srodna supstanca 2	0,6749	0,6373	5,9
srodna supstanca 3	2,9888	3,0028	0,5
srodna supstanca 4	0,8378	0,8319	0,7
srodna supstanca 6	1,3989	1,2209	9,6
srodna supstanca 7	0,1402	0,1330	5,4
srodna supstanca 8	0,4295	0,3965	8,3

U tabeli 9 mogu se videti rezultati koji potvrđuju dobre osobine predviđanja modela, sa greškama prilikom dobijanja retencionih faktora manjim od 10%.

Na kraju ovog dela disertacije, tehnika splajn interpolacije je isprobana na još jednoj test smeši supstanci, kako bi se ispitala njena primenljivost. Splajn model je kreiran uz pomoć već objavljenih rezultata [62]. U radu Maksić i saradnika, granisetron i njegove dve nečistoće su ispitivane u HILIC sistemu, kao i njihovi retencioni mehanizmi. Eksperimentalni uslovi pod kojima su eksperimenti izvođeni su detaljno opisani u radu, dobijeni rezultati su fitovani u adsorpcioni i particioni model, dok su sada iskorišćeni za pravljenje splajn modela. Dobijeni koeficijenti predviđanja su prikazani u tabeli 10.

**Tabela 10.** Koeficijenti predviđanja splajn interpolacionog modela na primeru granisetrona i njegove dve nečistoće \*

<b>pH = 3,0</b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
granisetron	0,8914
nečistoća A	0,8916
nečistoća B	0,8194
<b>pH = 6,0</b>	<b>Q<sup>2</sup></b>
granisetron	0,8858
nečistoća A	0,7608
nečistoća B	0,9109

Uzimajući u obzir prihvatljivo visoke Q<sup>2</sup> vrednosti, može se zaključiti splajn interpolacija može biti primenjena na smeše različitih supstanci.

\* Tumpa, A., Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. *Journal of Chemometrics* 2017 : 31



## 9.2. Razvoj HILIC metode za analizu olanzapina i njegovih nečistoća

### 9.2.1. Optimizacija metode

Prilikom razvoja HILIC metode analitičari se susreću sa brojnim teškoćama zbog kompleksnosti retencionih mehanizama, kao i broja faktora koji značajno utiču na retenciono ponašanje. Izokratske HILIC metode su vrlo kompleksne dok metode sa gradijentnim eluiranjem donose i dodatne teškoće, koji značajno komplikuju razvoj i postavljanje metode.

Iz ovih razloga, veoma je bitno da se prilikom razvoja HILIC gradijentnih metoda koristi princip zasnovan na naučnim činjenicama koji će omogućiti prevazilaženje svih tih problema i pomoći pri razvoju robusne i primenljive metode. U ovoj disertaciji primenjen je AQBd pristup za razvoj gradijentne HILIC metode, a njegov tok je prikazan kroz nekoliko faza: definisanje ciljanog analitičkog profila (ATP) i kritičnih procesnih parametara (CPP); ispitivanje eksperimentalnog prostora i modelovanje kritičnih atributa kvaliteta (CQA); optimizacija i *design space*, verifikacija optimalne tačke i validacija metode.

#### *Preliminarna istraživanja*

Kako bi se obezbedila osnova za razvoj metode kao i za odabir odgovarajućih CPP i CQA, bilo je neophodno sprovesti preliminarna istraživanja. Iz prethodnog dela istraživanja preuzete su informacije o ponašanju analita na različitim stacionarnim fazama (poglavlje 9.1.2). Nakon analize dobijenih rezultata odlučeno je da se razvoj metode radi na diolnoj modifikaciji silika kolone. U nedostatku pufera oblik pikova nije bio zadovoljavajuć. Iz tog razloga dodat je formijatni pufer, koji je izabran jer je kompatibilan sa masenim detektorom. Ipak, ispitivanje variranja koncentracije pufera od 10 mmol L<sup>-1</sup> do 40 mmol L<sup>-1</sup> nije dovelo do značajnih promena u retencionim vremenima analita zbog čega je njegova koncentracija držana konstantnom nivou 20 mmol L<sup>-1</sup>. pH vrednost vodene faze odabrana je na osnovu analize logP vrednosti analita (tabela 3), dok su protok mobilne faze i talasna

dužina detekcije držane na konstantnim vrednostima (protok mobilne faze  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , a talasna dužina detekcije 235 nm).

Nakon izvođenja više hromatografskih analiza pod izokratskim uslovima eluiranja mobilne faze, zaključeno je da neće biti moguće na taj način razdvojiti sve srodne supstance. Osim toga, srodna supstanca 3 se predugo zadržava u koloni i pod određenim uslovima se eluira i do 20 minuta nakon poslednje srodne supstance. Zbog ta dva razloga odabrano je gradijentno eluiranje za ovu analizu, i to linearni gradijent na početku koji bi razdvojio olanzapin i šest srodnih supstanci, nakon čega sledi plato čija je uloga da ubrza eluiranje srodne supstance 3.

#### *Definisanje ATP, CPP i CQA*

Kao što je već navedeno, prvi korak u AQbD razvoju metode je određivanje željenog profila analitičke metode (ATP). ATP je skup kriterijuma koji određuju koji će se odgovori pratiti i koji su željeni kriterijumi koje metoda treba da postigne (CQA) [8,10]. Ovaj korak je ključan prilikom razvoja metode jer postavlja smer za celokupnu dalju analizu. Kritični procesni parametri (CPP) su “faktori čije variranje direktno utiče na CQA i koje je stoga neophodno pratiti kako bi se obezbedilo da analiza ima odgovarajući kvalitet” [7]. Dobar izbor CPP i CQA je naročito važan u HILIC sistemima zbog njihove kompleksnosti i nedovoljnog poznavanja ovog tipa hromatografije.

Glavni cilj razvoja ove metode je bio kreiranje robusne metode sa što boljom selektivnošću (razdvojenost svih komponenata), a u najkraćem vremenskom periodu. Uzimajući u obzir te ciljeve, kao CQA su definisani kriterijumi separacije  $s$  između kritičnih parova analita ( $s_{23}$ : srodne supstance 2 i 4;  $s_{67}$ : olanzapin i srodna supstanca 6). Pokazatelj selektivnosti ( $s$  faktor) je računat kao razlika vremena početka drugog pika i vremena završetka prethodnog pika u kritičnom paru pikova. Ukupno trajanje analize nije prepoznato kao CQA jer nije značajno variralo pod ispitivanim uslovima.

Kao CPP prvo je definisana temperatura kolone zato što je pokazala veliki uticaj na selektivnost i oblik pikova. Sledeći je bio udeo vodene faze na početku linearnog dela

gradijenta, jer je takođe dosta uticao na selektivnost u linearnom delu gradijenta. Na kraju, dužina trajanja linearnog segmenta gradijenta bila je definisana kao treći kritični procesni parametar, kako bi se što više skratilo ukupno trajanje analize.

Analiziranjem rezultata preliminarnih ispitivanja, intervali definisanih faktora su suženi, i na kraju postavljeni opsezi za optimizaciju: temperatura kolone od 40°C do 50°C, udeo vodene faze u ukupnoj mobilnoj fazi od 5% do 9%, dužina trajanja linearnog dela gradijenta od 12 minuta do 16 minuta.

#### *Modelovanje kritičnih atributa kvaliteta*

Sledeći korak u procesu razvoja metode je uspostavljanje matematičke veze između faktora i odgovora. Ova faza omogućava simulaciju hromatografskog procesa u celom eksperimentalnom prostoru a bez sprovođenja brojnih eksperimenata. Granice eksperimentalnog prostora (eng. *knowledge space, KS*) su donje i gornje granice CPP. Eksperimenti koje je u ovoj fazi istraživanja trebalo sprovesti su odabrani uz pomoć metodologije eksperimentalnog dizajna (eng. *Design of Experiments, DoE*). Ova metodologija, osim samog odabira eksperimentalnih uslova, omogućava kreiranje matematičkih modela, opisivanje uticaja različitih faktora na odabrane odgovore i predviđanje odgovora u tačkama unutar eksperimentalnog prostora koje nisu eksperimentalno izvedene. U tu svrhu, odabran je *Rechtschaffen* optimizacioni dizajn. Za ispitivanje tri faktora, trebalo je izvesti samo deset eksperimenata, uz dodatne tri centralne tačke koje su neophodne za pravilno građenje matematičkih modela. Plan eksperimenata je dat u tabeli 1, u poglavlju 8.5, dok su dobijene vrednosti praćenih CQA prikazane u tabeli 11.

**Tabela 11.** Dobijene vrednosti za kritične atribute kvaliteta \*

<b>Redni broj</b>	<b><math>s_{23}</math></b>	<b><math>s_{67}</math></b>
<b>1</b>	0,10	0,24
<b>2</b>	0,84	1,44
<b>3</b>	0,00	0,03
<b>4</b>	0,00	0,15
<b>5</b>	0,57	0,87
<b>6</b>	0,66	0,97
<b>7</b>	0,00	0,00
<b>8</b>	0,00	0,00
<b>9</b>	0,09	0,96
<b>10</b>	0,00	0,82
<b>11</b>	0,05	0,68
<b>12</b>	0,14	0,63
<b>13</b>	0,09	0,75

Redni broj – broj eksperimenta;  $s_{23}$  – faktor selektivnosti kritičnog para pikova (srodne supstance 2 i 3);  $s_{67}$  – faktor selektivnosti kritičnog para pikova (olanzapin i srodna supstanca 6).

\* *Tumpa, A., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. J Pharm Biomed Anal 2017; 134: 18–26.*

Plan eksperimenata je kreiran u MODDE 11 programu koji predstavlja Windows program koji se uobičajeno koristi prilikom razvoja metode uz pomoć QbD metodologije. Nakon nasumičnog izvođenja svih predviđenih eksperimenata, odabrani odgovori su praćeni i rezultati uneti u program. Linearna regresija i metoda najmanjih kvadrata su korišćene za kreiranje matematičkih modela. Statistička validacija kreiranih modela je izvršena primenom ANOVA testa, čime su dobijene vrednosti sledećih statističkih parametara: koeficijent determinacije ( $R^2$ ), prilagođeni koeficijent determinacije ( $Adj R^2$ ) i koeficijent predikcije ( $Q^2$ ). Ove vrednosti su, zajedno sa značajnim koeficijentima modela, prikazane u tabeli 12.

**Tabela 12.** Koeficijenti matematičkih modela kreiranih za ispitivane odgovore sistema i njihova statistička značajnost

	<b>Koeficijenti</b>	<b>Standardna greška</b>	<b><i>p</i> - vrednost</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
<b>S<sub>23</sub></b>				
<b>konstanta</b>	0,0383	0,0537	0,0020	0,1270
<b>vodena faza</b>	-0,2142	0,0348	0,0005	0,0823
<b>temperature</b>	0,0873	0,0360	0,0456	0,0851
<b>vreme</b>	0,0625	0,0360	0,1260*	0,0851
<b>vod faza*vod faza</b>	0,1624	0,0471	0,0107	0,1113
<b>vod faza*temp</b>	-0,0615	0,0310	0,0872*	0,0732
	<b>Q<sup>2</sup> = 0,636; R<sup>2</sup> = 0,907; R<sup>2</sup> adj. = 0,841 Lack of fit = 0,079</b> Interval pouzdanosti = 0,95			
<b>S<sub>67</sub></b>				
<b>konstanta</b>	0,6871	0,0701	9,85E-06	0,1616
<b>vodena faza</b>	-0,3038	0,0447	0,0001	0,1031
<b>temperature</b>	0,1980	0,0460	0,0026	0,1060
<b>vreme</b>	0,1484	0,0460	0,0121	0,1060
<b>vod faza*vod faza</b>	-0,1160	0,0607	0,0924*	0,1400
	<b>Q<sup>2</sup> = 0,810; R<sup>2</sup> = 0,926; R<sup>2</sup> adj. = 0,889 Lack of fit = 0,114</b> Interval pouzdanosti = 0,95			

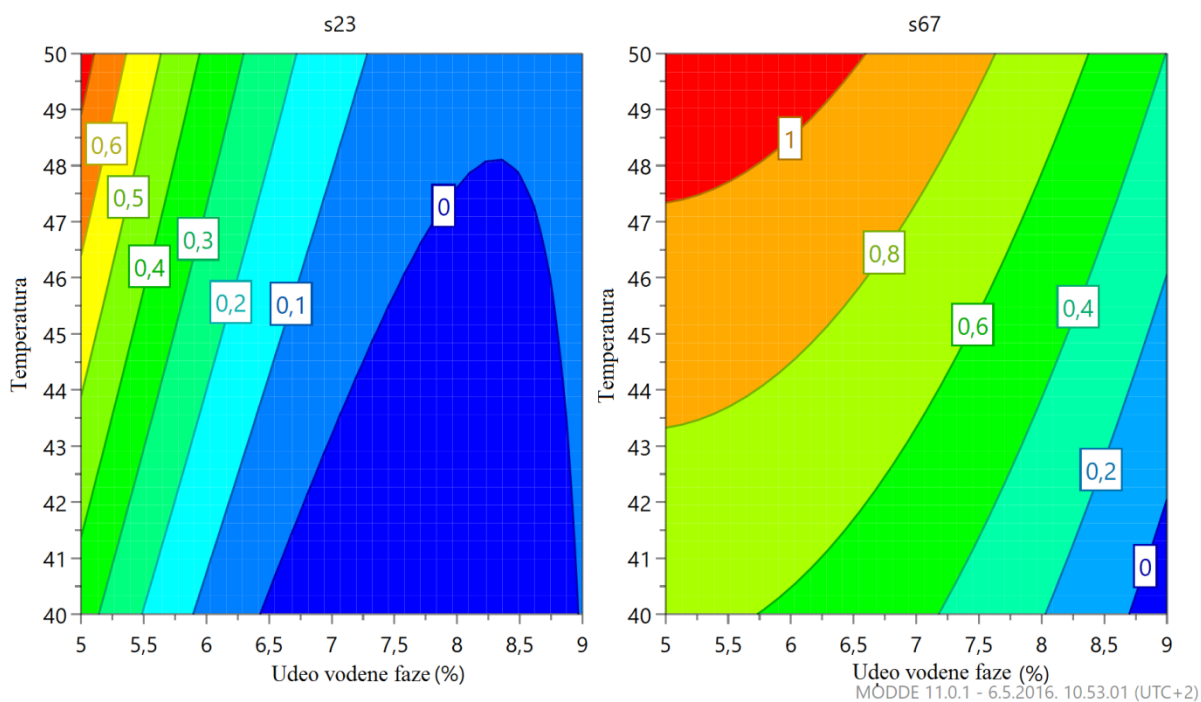
R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije, Adj R<sup>2</sup> – prilagođeni koeficijent determinacije i Q<sup>2</sup> – koeficijent predikcije; vodena faza – udeo vodene faze na početku linearnog gradijenta; temperatura – temperatura kolone; vreme – trajanje linearnog dela gradijenta

\* - faktori koji nisu imali značajan uticaj na odgovore ali su uključeni u svrhu unapređenja kvaliteta modela

Na osnovu visokih R<sup>2</sup> i Adj R<sup>2</sup> vrednosti, može se zaključiti da predloženi modeli veoma dobro opisuju dobijene eksperimentalne podatke, dok visoke Q<sup>2</sup> vrednosti ukazuju na dobre sposobnosti predviđanja, što je ispitano internom validacijom modela. Dalje, *lack of fit* vrednosti nisu značajne što je još jedna potvrda kvaliteta kreiranih modela.

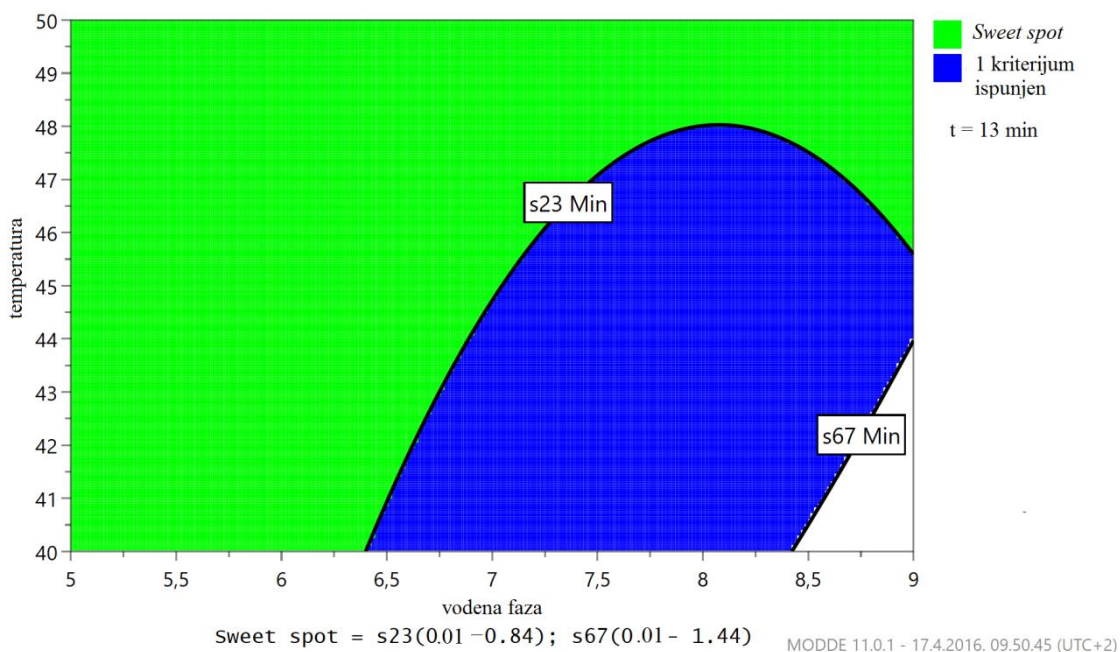
Uopšteni zaključci o uticajima CPP na različite CQA mogu se takođe izvući iz tabele 11. Prvo, kao što je i bilo očekivano, udeo vodene faze na početku linearnog gradijenta ima najveći uticaj na oba praćena odgovora, što je vrlo specifično za HILIC sistem. Takođe i vrednost kvadratnog koeficijenta za isti faktor je značajna za odovor  $s_{23}$  što ukazuje na još jači, odnosno eksponencijalni uticaj na praćeni odgovor. Negativne vrednosti koeficijenta upućuju na to da se sa porastom udela vodene faze smanjuje selektivnost metode. Na razdvojenost srodnih supstanci 2 i 3, osim udela vodene faze, uticaj ima još samo temperatura kolone, dok na razdvojenost olanzapina i srodne supstance 6 značajno utiču i temperatura i dužina trajanja linearnog gradijenta.

Nakon što je statistički potvrđen kvalitet dobijenih modela, oni se dalje mogu koristiti za kreiranje grafika kontura koji prikazuju zavisnost odabranih odgovora sistema od ispitivanih faktora. Dobijeni grafici su prikazani na slici 8.



**Slika 8.** Zavisnost praćenih odgovora od temperature i udela vodene faze pri konstantnoj dužini trajanja linearnog dela gradijenta od 13 minuta

S obzirom da optimizacija u ovom istraživanju ima dva osnovna cilja, ovi grafici se moraju preklopiti kako bi se pronašli uslovi pri kojima su oba uslova zadovoljena. Novokreirani grafik se zove *sweet spot* grafik i predstavlja grafički prikaz uslova pri kojima je samo jedan od uslova zadovoljen, kao i uslova pri kojima su oba uslova zadovoljena. Kako bi se to izvelo neophodno je postaviti granice prihvatljivosti za oba uslova. U ovom slučaju, oba faktora selektivnosti je trebalo da budu iznad 0,01 kako bi se smatralo da su pikovi razdvojeni. Preklapanjem grafika kontura za  $s_{23}$  i  $s_{67}$  dobijen je *sweet spot* grafik koji je prikazan na slici 9.

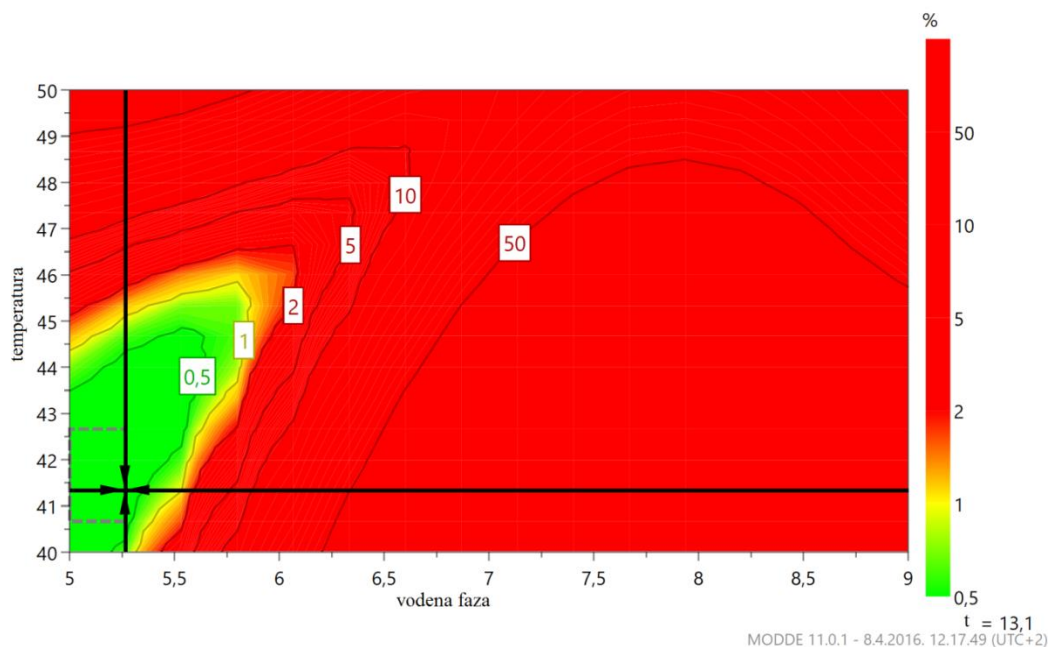


**Slika 9.** *Sweet spot* grafik dobijen preklapanjem dva grafika kontura zavisnosti odgovora od temperature i udela vodene faze pri konstantnoj dužini linearnog dela gradijenta od 13 minuta, a definisan sledećim zahtevima:  $s_{23}$  0–0,84 i  $s_{67}$  0–1,44

Zeleni region predstavlja skup uslova pri kojima su oba kriterijuma zadovoljena dok plavi region predstavlja skup uslova pri kojima je samo jedan od uslova zadovoljen. Sa slike se može zaključiti da je relativno veliki region u kome promene faktora ne dovode do promena odgovora sistema van zadatih granica. Međutim, ovaj zeleni region ne uzima u



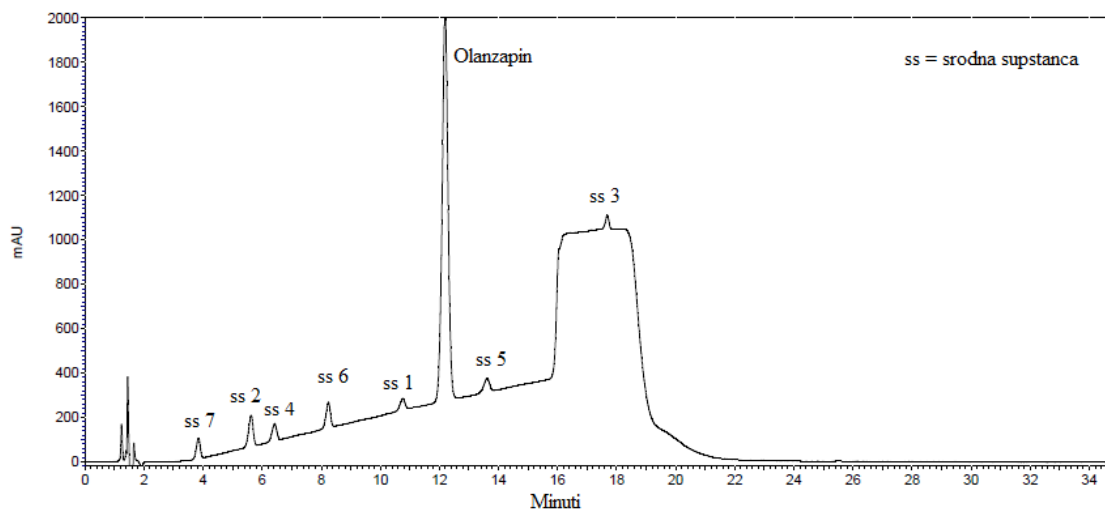
obzir moguće varijacije u preciznosti prilikom merenja faktora, kao ni u nesigurnosti modela koja je u određenoj meri neizbežna. Iz tih razloga, dalje se sprovode Monte Carlo simulacije (takođe u MODDE 11 programu) koristeći dobijene matematičke modele, a u cilju kreiranja *design space*-a. Na taj način, za svaku od tačaka u prethodnom *sweet spotu* se izračunava rizik za nepostizanje željenih kriterijuma. *Design space* je region u okviru *sweet spota* unutar koga je za sve tačke verovatnoća da će postići željene rezultate veća ili jednake 99%. Shodno tome, očekuje se da će *design space* biti značajno uži od *sweet spota*, ali on predstavlja robusni region unutar koga analitičari mogu odabrati uslove za sprovođenje analize i očekivati dobre odgovore sistema. Zbog toga, robusnost optimalne tačke ne mora dodatno eksperimentalno da se ispituje što je veoma značajno u cilju skraćivanja vremena potrebnog za razvoj metode. Dobijeni *design space* je prikazan na slici 10.



**Slika 10.** *Design space* kreiran za temperaturu i udeo vodene faze, dok se dužina linearnog dela gradijenta drži konstantnom tokom 13 minuta \*

\* Tumpa, A., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. *Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. J Pharm Biomed Anal* 2017; 134: 18–26.

Uzimajući u obzir dobijeni *design space* i praktična razmatranja, odabrana radna tačka je okarakterisana sledećim CPP: udeo vodene faze na početku gradijenta je 5,3%; dužina trajanja linernog dela gradijenta je 13 minuta, a temperatura kolone je 41°C. Ovi uslovi su još jednom eksperimentalno verifikovani, a dobijeni hromatogram je prikazan na slici 11.



**Slika 11.** Verifikacija optimalne tačke. Hromatografski uslovi: udeo vodene faze na početku gradijenta je 5,3%; dužina trajanja linernog dela gradijenta je 13 minuta; temperatura kolone je 41°C; protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>, a talasna dužina detekcije 235 nm \*

Nakon što je radna tačka odabrana i eksperimentalno verifikovana, sledeća faza je da se predložena HILIC metoda u potpunosti i validira.

\* Tumpa, A., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. *Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine.* *J Pharm Biomed Anal* 2017; 134: 18–26.

### 9.2.2. Validacija metode

U poslednjem delu ovih istraživanja, razvijena HILIC metoda je validirana. Validacija je sprovedena u skladu sa ICH Q3B (R2) smernicama – Nečistoće u novim farmaceutskim proizvodima [63]. Maksimalna dnevna doza olanzapina je 20 mg. U tom slučaju, u skladu sa ICH Q3B, limit detekcije 0,2% a limit kvantifikacije 0,5%.

Validirani opseg metode za srodne supstance je obuhvatio raspon od LOQ do deset puta veće koncentracije, u kome se nalaze sva tri ciljana limita (za srodne supstance 1, 3, 7 i 8 opseg je od  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a za srodne supstance 2, 4 i 8 od  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). LOQ vrednosti su određene eksperimentalnim putem razblaživanjem rastvora do najniže koncentracija koja je ponovljiva (iz tri injektovanja, relativna standardna devijacija mora biti manja od 10%).

U cilju potvrđivanja selektivnosti metode, injektovana je *placebo* smeša, a dobijeni hromatogram nije imao nijedan pik koji bi mogao da interferira sa analitima.

Dalje je urađeno ispitivanje linearnosti, tačnosti i preciznosti, kao i određivanje LOD i LOQ vrednosti za srodne supstance, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 13.

**Tabela 13.** Parametri validacije metode \*

	<i>Olanzapin</i>	<i>Srodna supstanca 1</i>	<i>Srodna supstanca 2</i>	<i>Srodna supstanca 3</i>	<i>Srodna supstanca 4</i>	<i>Srodna supstanca 6</i>	<i>Srodna supstanca 7</i>	<i>Srodna supstanca 8</i>
<b>LOD</b>								
$\mu\text{g mL}^{-1}$	–	0,16	0,08	0,16	0,08	0,16	0,08	0, 16
<b>LOQ</b>								
$\mu\text{g mL}^{-1}$	–	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5
<b>Linearnost</b>								
Opseg koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	40–200	0,5–5,0	0,25–2,5	0,5–5,0	0,25–2,5	0,5–5,0	0,25–2,5	0,5–5,0
<i>a</i>	84,41	133,59	175,77	129,74	146,33	117,60	259,84	183,89
<i>b</i>	-856,56	-22,04	-0,1	-23,87	-6,039	-29,48	-6,50	-44,29
<i>r</i>	0,9976	0,9916	0,9912	0,9984	0,9920	0,9928	0,9935	0,9965
<b>Tačnost</b>								
Koncentracija 1 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	80	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5
<i>Recovery</i> 1 (%) <sup>a</sup>	100,2	120,4	106,9	114,6	101,5	124,1	115,4	117,0
Koncentracija 2 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	100	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

<i>Recovery</i> 2 (%)	101,4	108,6	110,8	111,1	115,0	109,3	116,8	100,6
Koncentracija 3 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	120	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
<i>Recovery</i> 3 (%)	102,0	117,1	107,4	113,6	113,6	111,1	114,1	113,3
<b>Preciznost</b>								
Koncentracija ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	100	0,6	2,0	1,2	2,0	2,0	2,0	2,0
RSD (%) <sup>b</sup>	1,8	20,6	5,5	12,9	5,1	9,0	6,6	5,9

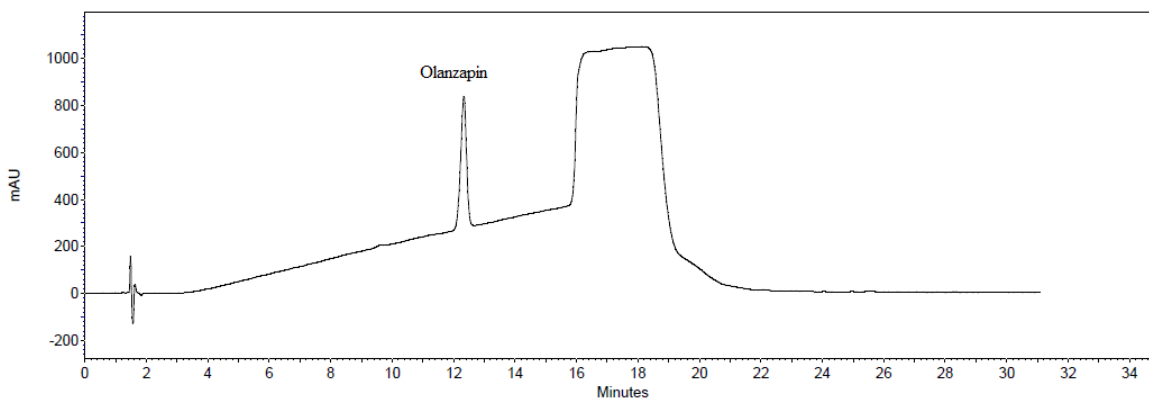
a – nagib, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacije (> 0,99 za aktivne supstance, > 0,98 za srodne supstance)

<sup>a</sup> *Recovery*: 98%–102% za aktivne supstance, 70%–130% za srodne supstance u LOQ koncentraciji, 80%–120% u ostalim koncentracijama

<sup>b</sup> Relativna standardna devijacija (RSD): 2% za aktivne supstance, 15%/20%/25% za srodne supstance

\* *Tumpa, A., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. J Pharm Biomed Anal 2017; 134: 18–26.*

Na kraju, razvijena HILIC gradijentna metoda je i primenjena za analizu Olanzapine<sup>®</sup> tableta od 10 mg. Dobijeni hromatogram je prikazan na slici 12. Koncentracije ispitivanih srodnih supstanci bile su ispod LOQ vrednosti, a izračunati sadržaj olanzapina je bio 98,6% (RSD=1,8%, interval sigurnosti 95%).



**Slika 12.** Hromatogram analize Olanzapine<sup>®</sup> tableta na *Betasil Diol* koloni pod optimalnim uslovima razdvajanja: udeo vodene faze na početku gradijenta 5,3%; dužina trajanja linernog dela gradijenta 13 minuta; temperatura kolone 41°C; protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>, a talasna dužina detekcije 235 nm \*

\* *Tumpa, A., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. J Pharm Biomed Anal 2017; 134: 18–26.*

### 9.3. Transfer HILIC metode na LC/MS/MS sistem i validacija metode

#### 9.3.1. Transfer HILIC metode na LC/MS/MS sistem

Nakon razvoja i validacije HILIC metode sa UV detekcijom kojom su uspešno razdvojeni olanzapin i njegovih sedam srodnih supstanci, pristupilo se transferu metode na LC/MS/MS sistem. Na taj način, iskorišćeni su rezultati dobijeni sistematičnim AQbD pristupom, a ideja je bila da se dobije osetljiva metoda koja će moći da detektuje veoma male koncentracije srodnih supstanci u uzorcima, što UV detekcijom nije moglo da se postigne. Osim veće osetljivosti, prenosom sa HPLC na UPLC metodu, dobiće se brža analiza koja će za kraće vreme razdvojiti sve ispitivane analite.

Optimalni uslovi dobijeni razvojem metode AQbD pristupom u prethodnom delu doktorske disertacije uneti su u *ACQUITY Columns* kalkulator. Ovaj kalkulator, na osnovu unetih parametara gradijenta i parametara kolone, kao i protoka mobilne faze izračunava uslove gradijenta i protok mobilne faze u UPLC uslovima. Dobijene vrednosti prenete na UPLC sistem bile su: protok mobilne faze 0,21 mL min<sup>-1</sup>, dužina trajanja analize 11 minuta, a uslovi gradijenta prikazani su u tabeli 14.

**Tabela 14.** Uslovi gradijenta

Vreme (minuti)	Protok (mL min <sup>-1</sup> )	Udeo acetonitrila (%)	Udeo vodene faze (%)
početak	0,21	94,1	5,9
6,50	0,21	86,2	13,8
6,51	0,21	66,7	33,3
8,00	0,21	66,7	33,3
11,00	0,21	94,1	5,9

Parametri masene spektrometrije su optimizovani *MS tuning* metodom, a dobijeni su sledeći uslovi: napon kapilare 3 kV, desolvaciona temperatura 500°C, protok desolvacionog gasa 1000 L h<sup>-1</sup>, protok gasa kona 10 L h<sup>-1</sup> temperatura izvora 150°C. Optimalni naponi kona i koliziona energija dobijeni su korišćenjem IntelliStart programa. Za olanzapin i srodne supstance definisani su parametri MS detektora i prikazani u tabeli 15.

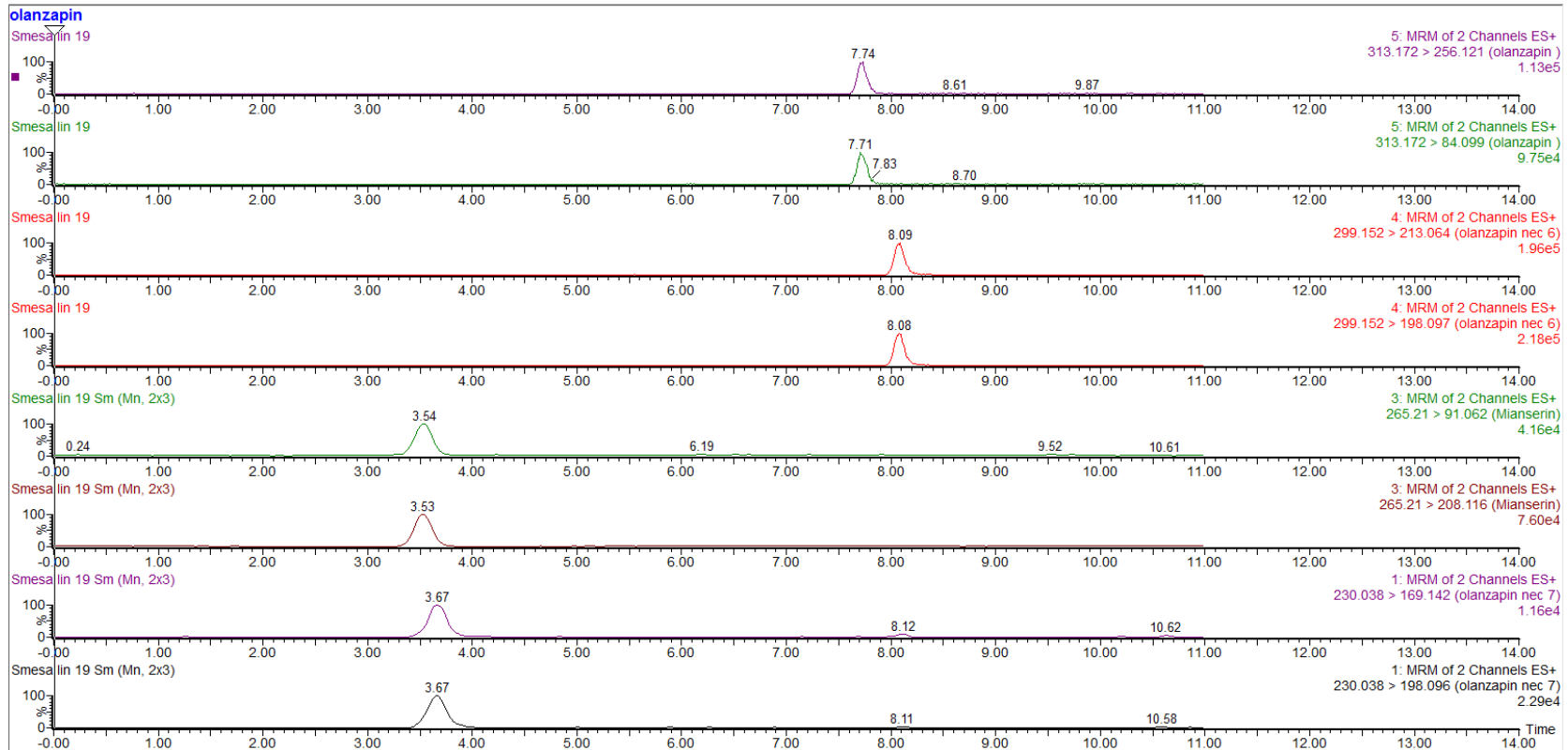


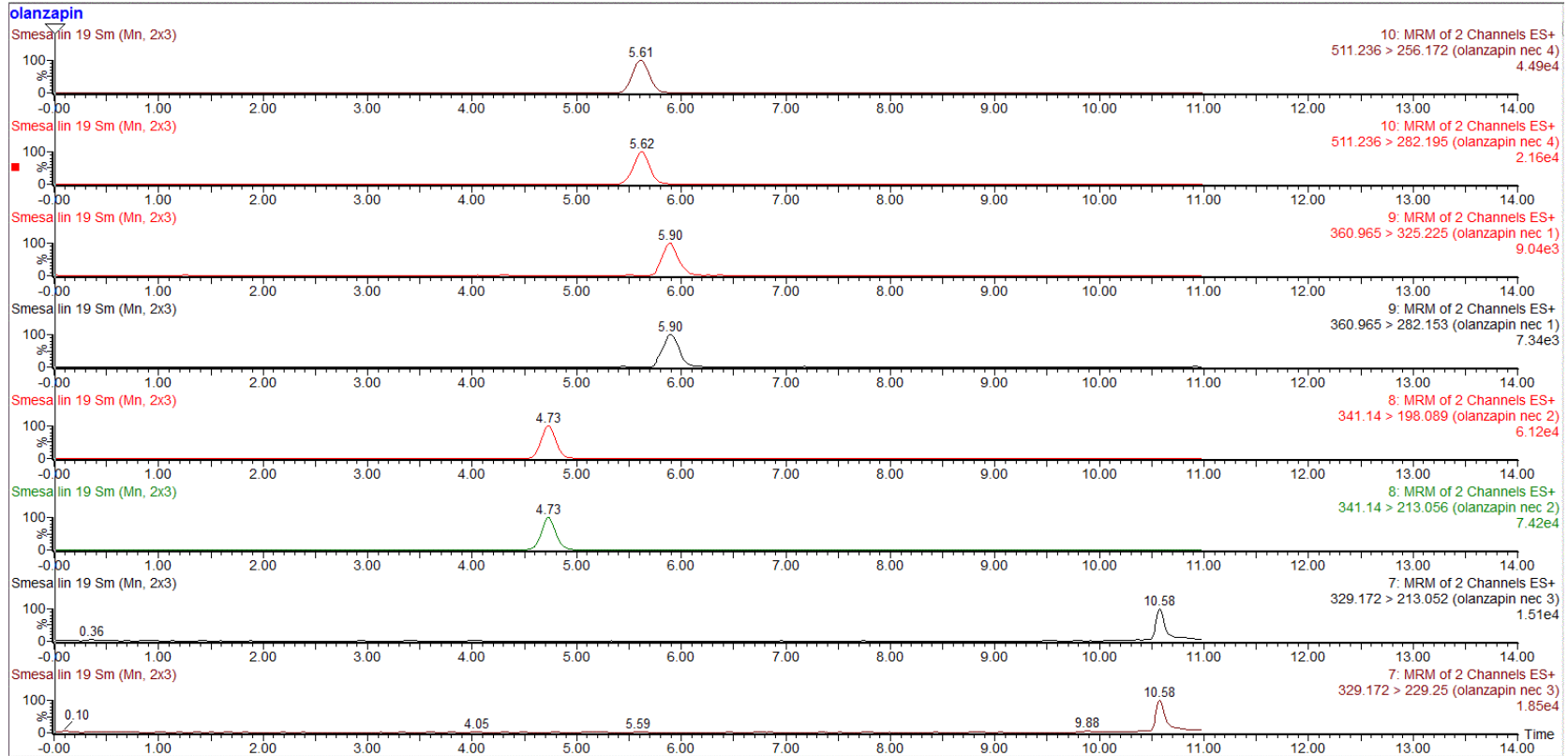
**Tabela 15.** MS parametri za sve tranzicije ispitivanih analita

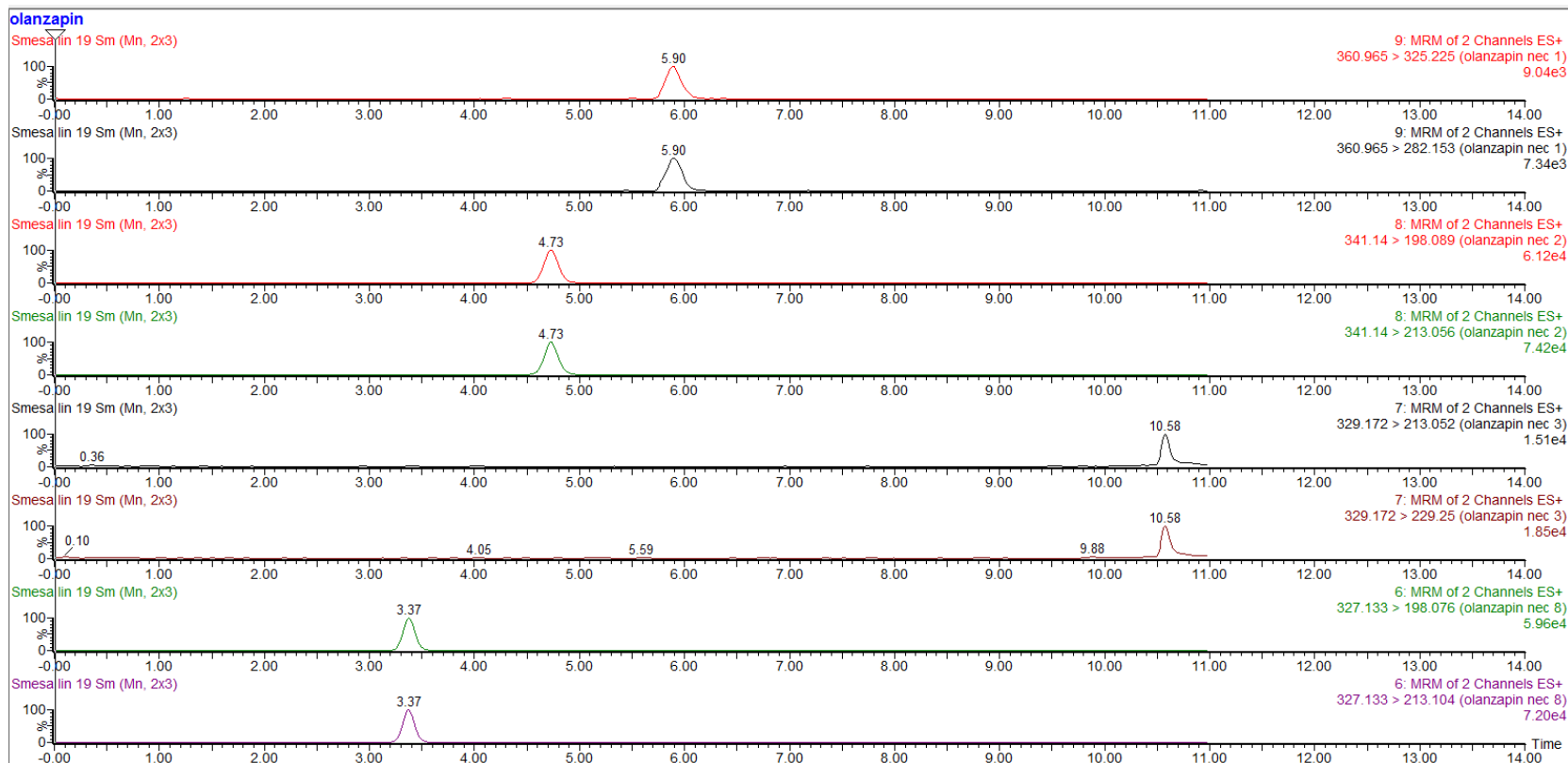
<b>Analit</b>	<b>Tranzicija</b>	<b>Napon kona</b>	<b>Koliziona energija</b>
Olanzapin	313,17 → 84,10	42	22
	313,17 → 256,12*	42	22
Srodna supstanca 1	360,96 → 282,15	40	20
	360,96 → 325,22*	40	12
Srodna supstanca 2	341,14 → 198,09	48	34
	341,14 → 213,06*	48	26
Srodna supstanca 3	329,17 → 213,05	36	28
	329,17 → 229,25*	36	18
Srodna supstanca 4	511,24 → 256,17	52	30
	511,24 → 282,19*	52	36
Srodna supstanca 6	299,15 → 198,10	48	38
	299,15 → 213,06*	48	26
Srodna supstanca 7	230,04 → 169,14	40	28
	230,04 → 198,10*	40	26
Srodna supstanca 8	327,13 → 198,08	50	36
	327,13 → 213,10*	50	26
Mianserin	265,21 → 90,06	42	42
	265,21 → 208,12*	42	20

\* Zvezdicom su obeležene jače tranzicije koje su korišćene u kvantitativnoj analizi

Kako bi se izvršila validacija optimizirane HILIC metode sa MS/MS detekcijom, izvedena je hromatografska analiza pod ovako definisanim optimalnim uslovima. Dobijeni MRM hromatogrami prikazani su na slici 13.







Slika 13. Hromatogram provere optimalnih uslova za smešu olanzapina i srodnih supstanci

### 9.3.2. Validacija

Razvijena HILIC LC/MS metoda je zatim validirana s ciljem primene za praćenje stabilnosti olanzapina u različitim uzorcima. Kao visokoosetljiva metoda omogućava da se detektuju veoma male koncentracije postojećih srodnih supstanci. Prvo su određene LOQ vrednosti za srodne supstance. Određivanje je vršeno eksperimentalnim putem, razblaživanjem osnovnih rastvora srodnih supstanci do najmanje koncentracije koja je ponovljiva, odnosno kod koje je relativna standardna devijacija, nakon pet injektovanja, manja od 2%.

Priprema rastvora za ispitivanje linearnosti, tačnosti i preciznosti je opisana u poglavlju 8.6. Nakon određivanja LOQ vrednosti i pripreme rastvora, izvršena je procena linearnosti, tačnosti i preciznosti, a svi dobijeni rezultati validacije su prikazani u tabeli 16.

**Tabela 16.** Parametri validacije HILIC LC/MS metode

	<i>Olanzapin</i>	<i>Srodna supstanca 1</i>	<i>Srodna supstanca 2</i>	<i>Srodna supstanca 3</i>	<i>Srodna supstanca 4</i>	<i>Srodna supstanca 6</i>	<i>Srodna supstanca 7</i>	<i>Srodna supstanca 8</i>
<b>LOD</b>								
ng mL <sup>-1</sup>	–	0,5	0,2	16,7	0,3	3,3	0,3	0,2
<b>LOQ</b>								
ng mL <sup>-1</sup>	–	1,5	0,5	50,0	0,8	10,0	1,0	0,5
<b>Linearnost</b>								
Opseg koncentracija (ng mL <sup>-1</sup> )	0,5-5,0 µg mL <sup>-1</sup>	1,5-15,0	0,5-5,0	50,0-500,0	0,8-8,0	10,0-100,0	1,0-10,0	0,5-5,0
<i>a</i>	76,319	0,0079	0,1642	0,0001	0,0326	0,0165	0,0342	0,1335
<i>b</i>	25,193	-0,0010	0,0065	0,0663	0,0041	-0,0251	0,0104	-0,0066
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,9916	0,9818	0,9931	0,9800	0,9980	0,9913	0,9953	0,9989
<b>Tačnost</b>								
Koncentracija 1 (ng mL <sup>-1</sup> )	0,8 µg mL <sup>-1</sup>	1,5	0,5	50,0	0,8	10,0	1,0	0,5
<i>Recovery</i> 1 (%) <sup>a</sup>	99,6	104,3	117,8	98,1	97,0	130,2	124,2	130,0
Koncentracija 2 (ng mL <sup>-1</sup> )	1,0 µg mL <sup>-1</sup>	7,5	2,5	250,0	4,0	50,0	5,0	2,5

<i>Recovery</i> 2 (%)	101,8	87,3	93,8	98,8	104,7	98,3	106,9	86,4
Koncentracija 3 (ng mL <sup>-1</sup> )	1,2 µg mL <sup>-1</sup>	9,0	3,0	300,0	4,8	60,0	6,0	3,0
<i>Recovery</i> 3 (%)	101,4	99,8	108,0	112,8	115,4	118,3	94,9	103,5
<b>Preciznost</b>								
Koncentracija (ng mL <sup>-1</sup> )	1,0 µg mL <sup>-1</sup>	7,5	2,5	250,0	4,0	50,0	5,0	2,5
RSD (%) <sup>b</sup>	2,0	14,4	6,1	9,8	14,4	16,7	13,0	6,1

a – nagib, b – odsečak na ordinati, R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije (> 0,99 za aktivne supstance, > 0,98 za srodne supstance)

<sup>a</sup> *Recovery*: 98%–102% za aktivne supstance, 70%–130% za srodne supstance u LOQ koncentraciji, 80%–120% u ostalim koncentracijama

<sup>b</sup> RSD: 2% za aktivne supstance, 15%/20%/25% za srodne supstance



#### **9.4. Ispitivanje olanzapina pod *stres* uslovima primenom HILIC/LC/MS/MS metode**

Kao poslednji korak u ovoj doktorskoj disertaciji, razvijena i validirana HILIC/LC/MS/MS metoda je iskorišćena za praćenje stabilnosti olanzapina pod *stres* uslovima. U tu svrhu, olanzapin je tretiran različitim *stres* agensima, kao što su kiselina, baza i oksidaciono sredstvo. Stabilnost je praćena u definisanim vremenskim intervalima primenom prethodno postavljene HILIC metode sa masenom detekcijom.

Olanzapin je prvo izložen dejstvu kiseline (0,1 M HCl), zatim baze (0,1 M NaOH) i na kraju oksidacionog sredstva (30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). U sva tri slučaja, pokazao se stabilnim nakon perioda od 24h tj. nivo ispitivanih srodnih supstanci se nije povećao u poređenju sa početnim koncentracijama.

## 10. ZAKLJUČAK

1. Ispitano je hromatografsko ponašanje olanzapina i osam srodnih supstanci na HILIC kolonama različitih hemijskih karakteristika. Smeša je analizirana pod istim hromatografskim uslovima na četiri različite kolone (silika, cijano, diolna i ZIC HILIC). Iz dobijenih hromatograma izvedeni su sledeći zaključci: analiti se najkraće zadržavaju u cijano i cviterjenskoj koloni, zatim u diolnoj, pa u silika koloni. Selektivnost je najslabija na cviterjenskoj koloni; srodna supstanca 5 je neretenciona na svim kolonama; a redosled eluiranja je skoro u svim slučajevima isti, ali zbog razlika u selektivnosti, analiti nisu podjednako dobro razdvojeni u svim kolonama. Jedina supstanca koja menja redosled eluiranja jeste srodna supstanca 4, koja se eluira pre olanzapina na diolnoj, silika i cviterjenskoj koloni, ali nakon olanzapina na cijano koloni.
2. Ispitani su retencioni mehanizmi olanzapina i srodnih supstanci u HILIC sistemu. Fitovanjem eksperimentalno dobijenih rezultata u teorijske modele definisani su dominantni procesi separacije. U tu svrhu analizirani su svi adsorpcioni, particioni, mešoviti i kvadratni modeli. Male vrednosti statističkih parametara  $R^2$  i  $Q^2$  za adsorpcioni i particioni model pokazale su da ni adsorpcija ni particija ne dominiraju u ukupnom retencionom mehanizmu, dok su male vrednosti za mešoviti model pokazale da osim ta dva, u ukupnom retencionom mehanizmu učestvuju verovatno i neki drugi mehanizmi i da je on izuzetno kompleksan. Jedino je kvadratni model pokazao zadovoljavajuće vrednosti  $Q^2$  parametra, ali je on u literaturi dokazan da nije pogodan za predviđanje hromatografskog ponašanja. Nakon teorijskih modela, rezultati su fitovani u Neue empirijski matematički model. Ipak, rezultati statističkih parametara za Neue model su pokazali da u ovom kompleksnom slučaju ni on nema mogućnost da na zadovoljavajući način predvidi retenciono ponašanje i detaljno opiše analizirani hromatografski sistem.

3. Uz pomoć već postojećih eksperimentalnih podataka kreiran je novi, kubni splajn interpolacioni model. Budući da je za svaku od supstanci dostupno šest eksperimentalnih tačaka, kreiran je splajn za pet intervala, a na svakom od tih intervala kreiran je polinom trećeg reda. Izračunate  $Q^2$  vrednosti su bile vrlo blizu jedinici, što ukazuje na visok kvalitet predloženog modela i njegovu sposobnost predviđanja retencionog ponašanja. Dodatno su proverene i sposobnosti ekstrapolacije splajn modela u regionima bliskim spoljašnjim ivicama eksperimentalnog skupa. Test je pokazao dobre sposobnosti predviđanja ovog modela, što predstavlja njegovu veliku prednost nad kvadratnim modelom. Eksperimentalnim testiranjem sposobnosti predviđanja splajn modela, upoređivanjem eksperimentalne vrednosti i vrednosti dobijene splajn modelom, utvrđeno je da su odstupanja u predviđanju bila manja od 10%. Primenljivost novokreiranog splajn modela potvrđena je na separaciji još jedne smeše u HILIC sistemu i dobijene su zadovoljavajuće  $Q^2$  vrednosti.
  
4. Zatim, razvijena je metoda za razdvajanje olanzapina i njegovih sedam srodnih supstanci, primenom AQbD principa. Ovaj princip je, po prvi put primenjen u ovoj doktorskoj disertaciji za razvoj HILIC metode sa gradijentnim eluiranjem. Nakon definisanja kritičnih kvaliteta atributa i kritičnih procesnih parametara, sprovedeni su eksperimenti i određen je *design space* u okviru koga promena eksperimentalnih uslova ne dovodi do narušavanja kvaliteta predložene HILIC gradijentne metode. Optimalno hromatografsko razdvajanje je postignuto na na *Betasil Diol* koloni, a uz primenu gradijentnog eluiranja. Mobilna faza A sastojala se od 20 mmol L<sup>-1</sup> rastvora amonijum-formijata, pH podešenog mravljom kiselinom na 3,0 i acetonitrila u odnosu 90:10 V/V. Mobilna faza B je bila čist acetonitril. Udeo vodene faze na početku linearnog gradijenta bio je 5,3%, a gradijent je trajao ukupno 31 minut (13 minuta linearni gradijent, zatim 3 minuta plato za čime je sledilo rekondicioniranje u trajanju od 15 minuta). temperatura kolone 41°C; protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>, a talasna dužina detekcije 235 nm \*

5. Razvijena HILIC metoda sa UV detekcijom uspešno je prenet na LC/MS/MS sistem korišćenjem *Aquity* UPLC kalkulatora. Dobijena je veoma osetljiva i selektivna metoda koja se može koristiti za praćenje stabilnosti olanzapina. Procenjen je uticaj značajnih parametara masene detekcije i određene su njihove optimalne vrednosti u cilju dobijanja maksimalnog intenziteta signala praćenih tranzicija analita i internog standarda. Metoda je testirana na stabilnost, linearnost, tačnost i preciznost u sklopu kompletne validacije. Postavljena metoda je iskorišćena za ispitivanje stabilnosti olanzapina pod stres uslovima, gde se pokazalo je utvrđeno da je olanzapin stabilan 24h u kiseljoj, baznoj sredini i pod dejstvom oksidacionog sredstva.

## 11. LITERATURA

- [1] Guo, Y.: Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Analyst* 2015; 140: 6452–6466.
- [2] Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 2011; 692: 1–25.
- [3] Dejaegher, B., Vander Heyden, Y.: HILIC methods in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci* 2010; 33: 698–715.
- [4] Hemstrom, P., Irgum, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29: 1784–1821.
- [5] Alpert, A.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr A* 1990; 499: 177–196.
- [6] Dejaegher, B., Mangelings, D., Vander Heyden, Y.: Method development for HILIC assays. *J Sep Sci* 2008; 31: 1438–1448.
- [7] Poole, C.F.: *The Essence of Chromatography*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands 2003.
- [8] Snyder, L.R.: Role of the solvent in liquid-solid chromatography. Review. *Anal Chem* 1974; 46: 1384–1393.
- [9] Jandera, P., Hajek, T.: Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *J Sep Sci* 2009; 32: 3603–3619.
- [10] Buszewski, B., Noga, S.: Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402: 231–247.
- [11] Jin, G., Guo, Z., Zhang, F., Xue, X., Jin, Y., Liang, X.: Study on the retention equation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Talanta* 2008; 76: 522–527.

- [12] Karatapanis, A., Fiamegos, Y.C., Stalikas, C.D.: A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid chromatography using model organic compounds. *J Chromatogr A* 2008; 1218: 2871–2879.
- [13] Neue, U.D., Kuss, H.J.: Improved reversed-phase gradient retention modeling. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 3794–3803.
- [14] Torres-Lapasió, J.R., Garcíá-Alvarez-Coque, M.C., Bosch, E., Rosés, M.: Considerations on the modelling and optimization of resolution of ionizable compounds in extended pH-range columns. *J Chromatogr A* 2005; 1089: 170–186.
- [15] Schoenmakers, P.J., Billiet, H.A.H., Tijssen, R., De Galan, L.J.: Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1978; 149: 519–537.
- [16] Jandera, P.: Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems? *J Chromatogr A* 2006; 1126: 195–218.
- [17] Rosés, M., Subirats, Z., Bosch, E.: Retention models for ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: Effect of variation of mobile phase composition and temperature. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 1756–1775.
- [18] Vivo-Truyols, G., Torres-Lapasio, J.R., Garcia-Alvarez-Coque, M.C.: Error analysis and performance of different retention models in the transference of data from/to isocratic/gradient elution. *J Chromatogr A* 2003; 1018: 169–181.
- [19] Radunović, D.: *Numeričke metode* (treće izdanje), Akademska misao, Beograd, Srbija, 2003.
- [20] Zolić, A.: *Numerička matematika I* (prvo izdanje), Matematički fakultet, Beograd, Srbija, 2008.
- [21] Rao, G.S.: *Numerical Analysis* (3rd edn), New Age International (P) Ltd., Publishers, New Delhi, India 2006.

- [22] Ediss, C., Tam, Y.K.: An interactive computer program for determining areas bounded by drug concentration curves using Lagrange interpolation. *J Pharmacol Toxicol Meth* 1995; 34: 165–168.
- [23] International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Harmonized Tripartite Guideline. Topic Q8 (R2): Pharmaceutical Development. Geneva (Switzerland); 2009.
- [24] Dispas, A., Avohou, H.T., Lebrun, P., Hubert, P.: Quality by Design approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances. *Trends Analyt Chem* 2018; 101: 24–33.
- [25] Orlandini, S., Pinzauti, S., Furulanetto, S.: Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 443–450.
- [26] Cela, R., Ordonez, E.Y., Quintana, J.B., Rodil, R.: Chemometric–assisted method development in reversed–phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1287: 2–22.
- [27] Zečević, M., Malenović, A., Stojanović, B.: *Odabrana poglavlja farmaceutske regulative u kontroli lekova* (prvo izdanje), Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija, 2017.
- [28] Rozet, E., Lebrun, P., Debrus, B., Boulanger, P., Hubert, Ph.: Design space for analytical methods. *TRAC- Trends in Anal Chem* 2013; 42: 157–167.
- [29] *European Pharmacopoeia*, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM & HealthCare), Council of Europe 7th ed, 2013.
- [30] Mbinze, J.K., Lebrun, P., Debrus, B., Dispas, A., Kalenda, N., Mavar Tayey Mbay, J., Schofield, T., Boulanger, B., Rozet, E., Hubert, Ph., Marini, R.D.: Application of an innovative design space optimization strategy to the development of liquid chromatographic methods to combat potentially counterfeit nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Chromatogr A* 2012; 1263; 113–124.

- [31] Rivera, K.: A review of criterial functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *J Liq Chromatogr R T* 2000; 23: 2097–2121.
- [32] Taraji, M., Haddad, P.R., Amos R.I.J., Talebi, M., Szucs, R., Dolan, J.W., Pohl, C.A.: Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: a review. *Anal Chim Acta* 2018; 1000: 20–40.
- [33] Jovanović, M., Rakić, T., Tumpa, A., Jančić-Stojanović, B.: Quality by Design approach in the development of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the analysis of iohexol and its impurities. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 110: 42–48.
- [34] Terzić, J., Popović, I., Stajić, A., Tumpa, A., Jančić-Stojanović, B.: Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *J Pharm Biomed Anal* 2017; 134: 18–26.
- [35] Mallik, R., Raman, S., Liang, X., Grobin, A.W., Choudhury, D.: Development and validation of a rapid ultra-high performance liquid chromatography method for the assay of benzalkonium chloride using a quality-by-design approach. *J Chromatogr A* 2015; 1413: 22–32.
- [36] Debrus, B., Guillaume, D., Rudaz, S.: Improved Quality-by-Design compliant methodology for method development in reversed-phase liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 84: 215–223.
- [37] Furlanetto, S., Orlandini, S., Pasquani, B., Del Bubba, M., Pinzauti, S.: Quality by Design approach in the development of a solvent-modified micellar electrokinetic chromatography method: finding the design space for the determination of amitriptyline and its impurities. *Anal Chim Acta* 2013; 802: 113–124.
- [38] Pasquani, B., Orlandini, S., Caprini, C., Del Bubba, M., Innocenti, M., Brusotti, G., Furlanetto, S.: Cyclodextrin- and solvent-modified micellar electrokinetic chromatography



for the determination of captopril hydrochlorothiazide and their impurities: a Quality by Design approach. *Talanta* 2016; 160: 332–339.

[39] Orlandini, S., Pasquani, B., Caprini, C., Del Bubba, M., Squarcialupi, L., Colotta, V., Furlanetto, S.: A comprehensive strategy in the development of a cyclodextrinmodified microemulsion electrokinetic chromatographic method for the assay of diclofenac and its impurities: mixture-process variable experiments and quality by design. *J Chromatogr A* 2016; 1466: 189–198.

[40] Kalariya, P.D., Patel, P.N., Srinivasab, R., Kumar-Talluri, M. V. N.: Quality by Design based development of a selective stability-indicating UPLC method of dolutegravir and characterization of its degradation products by UPLC-QTOF-MS/MS. *New J Chem* 2015; 39: 6303-6314.

[41] Schmidt, A.H., Molnár, I.: Using an innovative quality-by-design approach for development of a stability indicating UHPLC method for ebastine in the API and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 78–79: 65–74.

[42] Ren, Z., Zhang, X., Wang, H., Jin, X.: Using an innovative quality-by-design approach for the development of a stability-indicating UPLC/QTOF-ESI-MS/MS method for stressed degradation products of imatinib mesylate. *RSC Adv* 2016; 6: 13050–13062.

[43] Leon, J., Dusci, L., Hackett, P., Fellows, L.M., Ilett, K.F.: Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B* 2002; 773: 191–197.

[44] Bedor, N.C.T.C., Bedor, D.C.G., de Sousa, C.E.M., Bonifacio, F.N., Branco, D.M.C., Leal, L.B., de Santana, D.P.: The development and validation of a method for quantifying olanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015; 42: 305–313.

[45] Bonde, S.L., Bhadane, R.P., Gaikwad, A., Gavali, S.R., Katala, D.U., Narendiran, A.S.: Simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in human plasma by LC–MS/MS: Its pharmacokinetic application, *J Pharm Biomed Anal* 2014; 90: 64–71.

- [46] Lou, H., Ruan, Z., Jiang, B., Chen, J.: Simultaneous quantification of olanzapine and its metabolite N-desmethyloanzapine in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *Biomed Chromatogr* 2014; 29: 671–678.
- [47] Josefsson, M., Roman, M., Skogh, E., Dahl, M.L.: Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethyloanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 576–582.
- [48] Berna, M., Ackermann, B., Ruterbories, K., Glass, S.: Determination of olanzapine in human blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B* 2002; 767: 163–168.
- [49] Nielsen, M.K.K., Johansen, S.S.: Determination of olanzapine in whole blood using simple protein precipitation and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol* 2009; 33: 212–217.
- [50] Urdigere, A.K.R., Besagarahally, B.L., Basavaiah, K: Sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of olanzapine in human urine. *Arab J Sci Eng* 2012; 37: 1381–1387.
- [51] Cui, D., Li, Y., Lian, M., Yang, F., Meng, Q.: 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.
- [52] Rao, R.N., Raju, A.N., Narsimha, R., Babu, G.R.: Isolation and characterization of process related impurities of olanzapine using HPLC and ESI–MS/MS. *J Sep Sci* 2008; 31: 107–118.
- [53] Krishnaiaha, C., Murthy, M.V., Kumar, R., Mukkanti, K.: 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.

- [54] Pathak, A., Rajput, S.J.: Development of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of olanzapine and fluoxetine in combined dosage forms. *J Chrom Sci* 2009; 47: 605–611.
- [55] Jovanović, M., Rakić, T., Jančić-Stojanović, B., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Assessment of  $\beta$ -lactams retention in hydrophilic interaction chromatography applying Box–Behnken Design. *J Sep Sci* 2012; 35: 1424–1431.
- [56] Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B., Rakić, T., Malenović, A., Ivanović, D., Medenica, M.: Five different columns in the analysis of basic drugs in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Cent Eur J Chem* 2013; 11: 1150–1162.
- [57] Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2013; 1301: 27–37.
- [58] Jovanović, M., Rakić, T., Jančić-Stojanović, B., Ivanović, D., Medenica, M.: Retention mechanism assessment and method development for the analysis of iohexol and its related compounds in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 2014; 17: 4217–4232.
- [59] Jovanović, M., Rakić, T., Jančić-Stojanović, B.: Theoretical and empirical models in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Inst Sci Technol* 2014; 42: 230–266.
- [60] *United States Pharmacopoeia* 38, The United States Pharmacopoeial Convention, 2013.
- [61] Hiriyanna, S.G., Basavaiah, K., Goud, P.S.K., Dhayanithi, V., Raju, K., Pati, H.P.: Identification and characterization of olanzapine degradation products under oxidative stress conditions. *Acta Chrom* 2008; 20: 81–93.
- [62] Maksić, J., Tumpa, A., Stajić, A., Jovanović, M., Rakić, T., Jančić-Stojanović, B.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in analysis of granisetron HCl and its related substances. Retention mechanisms and method development. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 123: 93–103.

[63] International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Harmonized Tripartite Guideline. Topic Q3B (R2): Impurities in New Drug Products. Geneva (Switzerland); 2006.

## 12. PRILOG

### NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE OBJAVLJENI U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA

1. **Tumpa, A.**, Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Modeling of HILIC retention behavior with theoretical models and new spline interpolation technique. J Chemometrics 2017 : 31 31 (9) 2017, <https://dpi.org/10.1002/cem.2910> **M21**
2. **Tumpa, A.**, Stajić, A., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. J Pharm Biomed Anal 2017; 134: 18–26. **M21**

### NAUČNI RADOVI IZ DOKORSKE DISERTACIJE SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA I ŠTAMPANI U IZVODU (M34)

1. **Tumpa, A.**, Mišković, S., Stanimirović, Z., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M.: Theoretical models and new spline interpolation technique in modeling of HILIC retention behaviour on the example of olanzapine and its eight impurities, XVI Chemometrics in Analytical Chemistry, Barcelona, Spain, 2016.

OSTALI NAUČNI RADOVI OBJAVLJENI U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG  
ZNAČAJA

1. **Tumpa, A.**, Kalinić, A., Jovanović, P., Erić, S., Rakić, T., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M.: Theoretical models and QSRR in retention modeling of eight aminopyridines. *J Chromatogr Sci* 2015; 54: 436–444. **M23**
2. **Tumpa, A.**, Rakić, T., Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B.: Optimization of chromatographic separation of acetylsalicylic acid, amlodipine, impurity A of amlodipine, and atenolol in hydrophilic interaction liquid chromatography employing DoE methodology. *J Liq Chrom Relat Tech* 2015; 38: 1555–1560. **M23**
3. Jovanović, M., Rakić, T., **Tumpa, A.**, Jančić-Stojanović, B.: Quality by Design approach in the development of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the analysis of ioxehol and its impurities, *J Pharm Biomed Anal* 2015; 110: 42–48. **M21**
4. Maksić, J., **Tumpa, A.**, Popović, I., Jančić-Stojanović B.: Ispitivanje olopatadin hidrohlorida pod stres uslovima metodom tečne hromatografije hidrofilnih interakcija. *Hem Ind* 2016; 70(3): 339–47. **M23**
5. Maksić, J., **Tumpa, A.**, Stajić, A., Jovanović, M., Rakić, T., Jančić-Stojanović, B.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in analysis of granisetron and its related substances. Retention mechanisms and method development. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 123: 93–103. **M21**
6. **Tumpa, A.**, Miladinović, T., Rakić, T., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B.: Quality by Design determination of diclofenac potassium and its impurities by high-performance liquid chromatography. *Anal Lett* 2016; 49: 445–457. **M23**

7. Terzić, J., Popović, I., Stajić, A., **Tumpa, A.**, Jančić–Stojanović, B.: Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *J Pharm Biomed Anal* 2016; 125: 385–393. **M21**

OSTALI NAUČNI RADOVI SAOPŠTENI NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA I ŠTAMPANI U IZVODU (M34)

1. Maksić, J., Jovanović, M., Rakić, T., **Tumpa, A.**, Popović, I., Jančić–Stojanović, B.: Investigation of olopatadine hydrochloride under stress conditions by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. XXX International Congress on Chromatography. Salzburg, Austria, 2014.
2. **Tumpa, A.**, Jančić–Stojanović, B., Savić, V., Medenica, M.: Artificial neural networks in retention modeling of newly synthesized aminopyridines. International Symposium on Chromatography, Salzburg, Austria, 2014.
3. **Tumpa A.**, Rakić T., Jovanović M., Jančić–Stojanović B.: Optimization of chromatographic separation of acetylsalicylic acid, amlodipine, impurity A of amlodipine and atenolol in hydrophilic interaction liquid chromatography employing DoE methodology. VI Kongres Farmaceuta Srbije, Beograd, Srbija, 2014.
4. **Tumpa, A.**, Kalinić, M., Jovanović, P., Erić, S., Rakić, T., Jančić–Stojanović, B., Medenica, M.: Theoretical models and QSRR in retention modeling of eight aminopyridines in reversed phase liquid chromatography. 21<sup>st</sup> International Symposium on Separation Sciences, Ljubljana, Slovenija, 2015.
5. Maksić, J., **Tumpa, A.**, Stajić, A., Jovanović, M., Rakić, T., Jančić–Stojanović, B.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in analysis of

- granisetron and its related substances. Retention mechanisms and method development. XXI International Symposium on Separation Sciences. Ljubljana, Slovenia, 2015.
6. Čudina, O., **Tumpa, A.**, Stajić, A., Janković, S., Stefanović, S., Jančić-Stojanović, B., Medenica, M.: Optimization and validation of an ultra pressure liquid chromatography – tandem mass spectrometry for determination of glycopeptide antibiotics in plasma samples. 18th edition of EuroAnalysis, The European Conference on Analytical Chemistry, Bordeaux, Francuska, 2015.
  7. Maksić, J., Stajić, A., **Tumpa, A.**, Medenica, M., Jančić–Stojanović, B.: Design of experiments methodology in selection of optimal conditions for HILIC/MS/MS analysis of olopatadine in human tears. II International Conference on Sample Treatment. Lisbon, Portugal, 2016.



## 12. BIOGRAFIJA AUTORA

Anja Tumpa rođena je 26. juna 1989. godine u Beogradu. Osnovnu školu "Mihajlo Petrović Alas" i Prvu beogradsku gimnaziju završila je sa odličnim uspehom. Studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2008/2009. godine i diplomirala 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,08. Tokom studija, bila je član a kasnije i predsednik hora studenata Farmaceutskog fakulteta „Raskovnik“.

Nakon završetka pripravničkog staža, u julu 2014. godine položila je stručni ispit. Doktorske akademske studije, modul Analitika lekova, započela je školske 2013/2014. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U periodu od novembra 2013. do avgusta 2016. godine bila je zaposlena na Projektu 172052 koje finansira Ministarstvo nauke i tehnološkog razvoja kao istraživač pripravnik, a zatim je izabrana u zvanje istraživač saradnik u maju 2015. U tom periodu angažovana je i kao saradnik u nastavi na predmetima Sportska farmacija i Eksperimentalni dizajn, u okviru Katedre za analitiku lekova. Od septembra 2016. godine zaposlena je u Farmalogistu kao saradnik u kvalitetu, a od decembra 2018. godine kao rukovodilac kvaliteta.

Do sada je objavila devet naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja (pet radova u časopisima M21 kategorije i četiri rada u časopisima M23 kategorije). Iz doktorske disertacije, objavila je dva rada u međunarodnim časopisima (oba rada u časopisima M21 kategorije). Učestvovala je sa osam publikacija saopštenih na naučnim skupovima međunarodnog značaja koji su štampani u izvodu M34 kategorije.

Posедуje aktivno znanje engleskog jezika i služi se francuskim jezikom.