

UDK 615 (497.11)

ISSN 0004-1963 (Štampano izd.)

ISSN 2217-8767 (Online)

ARHIV ZA FARMACIJU

Godina 64

Broj 2

Beograd, 2014.

ČASOPIS SAVEZA
FARMACEUTSKIH
UDRUŽENJA SRBIJE

TEMATSKI BROJ - 1

SEPARACIONE METODE U KONTROLI LEKOVA

– IZAZOVI I MOGUĆNOSTI PRIMENE –

2/2014

SADRŽAJ – CONTENTS

Reč gostujućeg urednika

Originalni naučni radovi – Original scientific papers

- **Liljana Bogdanovska, Sehmedin Saliu, Mirjana Popovska, Aneta Dimitrovska, Liljana Ugrinova, Rumenka Petkovska** 69

Development and validation of RP-HPLC assay of chlorhexidine in gingival crevicular fluid

Razvoj i validacija RP-HPLC metode za određivanje hlorheksidina u gingivalnoj tečnosti

- **Jelena Žirojević, Katica Drljević-Đurić, Aleksandra Đurđević** 83

Determination of oxcarbazepine and its related substances using UHPLC method with UV detection

Određivanje okskarbamazepina i srodnih supstanci primenom UHPLC metode sa UV detekcijom

- **Tijana Rakić, Marko Jovanović, Anja Tumpa, Biljana Jančić-Stojanović, Mirjana Medenica** 95

Optimization of HILIC method for the analysis of bisoprolol and its impurities considering uncertainties in peak position

Optimizacija HILIC metode za analizu bisoprolola i njegovih nečistoća uz procenu mogućnosti variranja položaja pikova

- **Ivana Perović, Andelija Malenović, Ana Vemić, Nada Kostić, Darko Ivanović** 112

Razvoj hromatografskih metoda za analizu sulfametoksazola, trimetoprima, njihovih degradacionih proizvoda i konzervanasa u sirupu

Development of chromatographic methods for analysis of sulfamethoxazole, trimethoprim, their degradation products and preservatives in syrup

- **Slavica Kojić-Marinković, Mihaela Tumbas, Tijana Rakić, Biljana Jančić-Stojanović** 128

Plakett-Burman dizajn u proceni robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje sadržaja natrijum-valproata

Plackett-Burman design in robustness testing of liquid chromatographic method for determination of sodium-valproate

- **Branka Ivković, Milkica Crevar-Sakač, Zorica Vujić**

144

Hemijska stabilnost lekova: uticaj svetlosti i temperature na stabilnost montelukasta u rastvoru

Chemical stability of drugs: influence of light and temperature on montelukast stability in solution

Prilozi – Contributions

- **Izveštaj sa nacionalnog simpozijuma o lekovima, Brizbejn, Australija** 163
- **Izveštaj sa 62. simpozijuma Saveza farmaceutskih udruženja Srbije, Kopaonik, Srbija** 166
- **Izveštaj sa 16. Riječkih dana bioetike, Rijeka, Hrvatska** 176
- **Izveštaj sa 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lisabon, Portugalija** 179
- **Prikaz naučne monografije „Nanoinkapsulacija – primena i značaj u isporuci aktivnih supstanci”, autora Ljiljane Đekić** 202

Reč gostujućeg urednika

Separacione metode danas nesumljivo imaju najznačajniju ulogu u kontroli kvaliteta lekova. Gotovo sve farmaceutske supstance i farmaceutski proizvodi u svojoj kontroli imaju neku od separacionih metoda. Ako se kreće od sinteze farmaceutske supstance separacione metode imaju nezamenljivu ulogu u prečišćavanju i dobijanju proizvoda odgovarajućeg stepena čistoće. Dalje, sama kontrola farmaceutske supstance uključuje separacione metode za ispitivanje srodnih supstanci i za određivanje sadržaja, kao i za druga ispitivanja. Konačno, separacione metode su od posebnog značaja u kontroli gotovog farmaceutskog proizvoda, kao i u praćenju njegove stabilnosti. Razlog tome svakako leži u činjenici da se mnogobrojni analitički problemi upravo rešavaju separacionim metodama pri čemu najveću primenu imaju hromatografske metode.

Cilj tematskog izdanja dva broja časopisa *Arhiv za farmaciju* pod nazivom *Separacione metode u kontroli lekova – izazovi i mogućnosti primene* bio je da se kroz revijalne rade, originalne naučne rade, kao i stručne rade prikažu mogućnosti primene separacionih metoda u kontroli lekova. Tako se u revijalnom radu Terzić i autori navodi pregled primena DryLab® softvera u razvoju i proceni robusnosti metoda tečne hromatografije (eng. *Liquid Chromatography* – LC). Može se reći da razvoj novih hromatografskih metoda zauzima posebno mesto u kontroli lekova jer se na taj način obezbeđuje dobijanje rezultata ispitivanja visoke tačnosti i pouzdanosti. U tematskom izdanju *Separacione metode u kontroli lekova – izazovi i mogućnosti primene* ima više rada koji se bave razvojem novih hromatografskih metoda a čija je odgovarajuća primena potvrđena kroz postupak validacije. Tako je u radu Žirojević i autori prikazan razvoj i validacija UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography* – UHPLC) metode za određivanje okskarbamazepina i srodnih supstanci. Zatim, u radu Perović i autori prikazan je razvoj i validacija HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) metoda za analizu sulfametoksazola, trimetoprima, njihovih nečistoća i konzervansa u sirupu. Analiza višekomponentnog sirupa koji sadrži doksilamin-sukcinat, efedrin-hidrohlorid, dekstrometorfanshidrobromid, paracetamol i konzervans natrijum-benzoat novorazvijenom i validiranom HPLC metodom opisana je u radu Ivković i autori. Kao sastavni deo validacije izvodi se i procena robusnosti metode i preporučuje se njeno izvođenje nakon definisanja optimalnih hromatografskih uslova a pre ispitivanja ostalih parametara validacije. U radu Kojić-Marinković i autori prikazana je procena robusnosti HPLC metode za određivanje natrijum-valproata primenom metodologije eksperimentalnog dizajna. Metodologija eksperimentalnog dizajna primenjena je i u proceni variranja položaja pikova na primeru bisoprolola i njegovih nečistoća analiziranih u sistemu tečne hromatografije hidrofilnih interakcija (eng. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC) što je sistematično prikazano u radu Rakić i autori. Sasvim sigurno, metode tečne hromatografije omogućavaju da se dođe do veoma značajnih podataka u različitim aspektima procene stabilnosti. Samo rezultati dobijeni tačnim i proverenim metodama mogu biti pouzdani i

dovesti do odgovarajućih zaključaka. Jedan od takvih primera je dat u radu Ivković i autori u kome je opisano praćenje stabilnosti montelukasta u rastvoru primenom LC metode. Drugi primer primene LC metode u praćenju stabilnosti jeste rad u kome su proizvodi dobijeni nakon studija forsirane degradacije na amlodipin-besilatu i bisoprolol-fumaratu praćeni HILIC metodom (Kasagić-Vujanović i autori).

U radovima Dobričić i autori, kao i Gagić i autori prikazan je značaj hromatografskih metoda u fazama prečišćavanja leka, kao i procesu praćenja sinteze lekova. U radu Dobričić i autori prikazan je značaj i primena hromatografskih metoda za prečišćavanje amida kortijske kiseline iz hidrokortizona i etilestra L-glicina, dok je u radu Gagić i autori prikazana primena tankslojne hromatografije i hromatografije u koloni u praćenju sinteze α -tokoferil-lizin estra.

Očigledno je da su u ova dva tematska broja *Arhiva za farmaciju* prikazane brojne primene separacionih metoda u kontroli lekova. Međutim, značaj separacionih metoda ogleda se i u različitim fazama primene leka. Tako je u radu Bogdanovska i autori prikazana primena HPLC metode u određivanju hlorheksidina u gingivalnoj tečnosti nakon lokalne primene biodegradabilnog terapijskog sistema dok je u radu Otašević i autori opisana primena HPLC metode za praćenje ekstrakcije mikofenolne kiseline iz salive.

Na kraju, laboratorije za kontrolu kvaliteta lekova neprestano moraju unapređivati performanse svog rada što se radi kroz međulaboratorijska uporedna ispitivanja što je na jasan i detaljan način opisano u radu autora Pejović.

Konačno, može se reći da je nizom radova u ovom tematskom izdanju časopisa *Arhiv za farmaciju* pokazan značaj hromatografskih metoda u kontroli lekova, kao i u nekim aspektima primene leka. Kroz originalne naučne radove (Bogdanovska i autori, Žirojević i autori, Rakić i autori, Perović i autori, Kojić-Marinković i autori, Kasagić-Vujanović i autori, Dobričić i autori, Otašević i autori) ponuđena su nova naučna rešenja za određene definisane naučne ciljeve. Kratkim saopštenjima (Ivković i autori, Gagić i autori) prikazana su značajna naučna istraživanja, a koja predstavljaju neophodan deo daljih naučnih studija. Stručni radovi (Ivković i autori, Pejović) bave se određenim temama koje mogu biti od značaja za veliki deo čitalačke publike časopisa *Arhiv za farmaciju*.

Gostujući urednik

Doc. dr Biljana Jančić-Stojanović

Development and validation of RP-HPLC assay of chlorhexidine in gingival crevicular fluid

Liljana Bogdanovska^{1*}, Sehmedin Saliu², Mirjana Popovska²,
Aneta Dimitrovska¹, Liljana Ugrinova¹, Rumenka Petkovska¹

¹ Department of Applied Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy,
University “Ss. Cyril and Methodius”, Mother Teresa 47, Skopje,
Republic of Macedonia

² Department of Oral Pathology and Periodontology, Faculty of Dentistry,
University “Ss. Cyril and Methodius”, Mother Teresa 47, Skopje,
Republic of Macedonia

*Corresponding author, e-mail: lbogdanovska@ff.ukim.edu.mk

Summary

A reversed – phase HPLC method with UV detection for determination of chlorhexidine in gingival crevicular fluid (GCF) was optimized and validated, using chlorpheniramine as an internal standard. The chromatographic separation was performed on Discovery C18 HPLC column with 0.01 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH=3.0), triethylamine and acetonitrile (66:1:33, V/V/V), as mobile phase. Under the optimized HPLC conditions, linearity was obtained in the range of 0.5-5.0 µg mL⁻¹ with LOD 0.07 µg mL⁻¹ and LLOQ 0.5 µg mL⁻¹. The described method can be successfully applied for determination of chlorhexidine concentrations in GCF obtained from patients with chronic periodontal disease treated with PerioChipTM.

Key words: chlorhexidine digluconate, PerioChipTM, RP-HPLC,
gingival crevicular fluid, periodontal disease

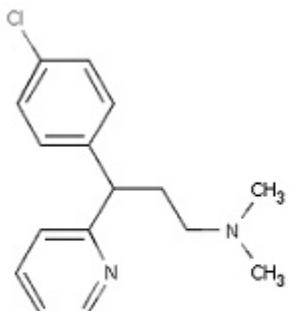
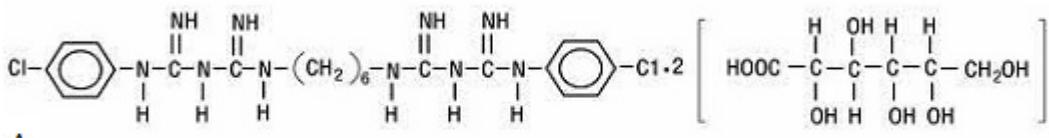
Introduction

It is widely accepted that the inflammatory periodontal disease is caused by bacteria in the dental plaque. However, its nature depends to a large extent on the interaction between periopathogenic bacteria, the environment and the response of the host's defense mechanisms to the bacterial assault [1]. Gingival crevicular fluid (GCF) is a serum transudate or inflammatory exudate and can be collected from periodontal pockets in patients suffering from periodontal disease [2]. GCF consists of cellular elements, electrolytes, organic compounds, metabolic and bacterial products and enzyme and enzyme inhibitors. Although very similar to serum, GCF contains much less proteins [3].

The most commonly used therapy for periodontal disease consists of supra - and subgingival plaque and calculus removal (scaling and root planning, SRP). Although SRP is essential in management of healthy periodontium, it can be time-consuming, unpleasant for patients and technically difficult to perform [4]. In adjunction to SRP, antibiotics and antiseptics have been used successfully to treat moderate to severe forms of periodontal disease [4]. Systemically and locally applied antibiotics as well as locally applied antiseptics are administered to improve periodontal health of patients treated with SRP [5].

Although systemic administration of antibiotics is an effective approach to alter the progression of certain forms of periodontitis, there are several disadvantages such as inadequate therapeutic concentrations at the site of action, gastrointestinal disturbances, hypersensitivity and development of bacterial resistance. Its drawbacks can be overcome by local application of antimicrobial or antiseptic agents using controlled-delivery systems applied into periodontal pockets [6].

Chlorhexidine (CHX), 1,1'-hexamethylene-bis [5-(4-chlorophenyl) biguanide] (Figure 1A), is an antimicrobial and cationic bisbiguanide that possesses a broad spectrum of antibacterial activity and shows substantivity, safety and lack of toxicity [7]. Applied locally, CHX has been shown to inhibit a large number of bacterial species found in the subgingival plaque at concentrations of $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ [8].



B

Figure 1. A) Structure of chlorhexidine digluconate B) Chlorpheniramine maleate

Slika 1. A) Struktura hlorheksidin glukonata B) Hlorfeniramin maleata

Usually, CHX does not achieve effective concentrations within the periodontal pockets for sufficiently long period of time, thus subgingival irrigation with CHX solutions is usually not effective in the treatment of periodontitis [8]. The PerioChip™ is a biodegradable local drug delivery system that releases chlorhexidine in periodontal pockets over 7-10 days. Several clinical trials have shown that the PerioChip™ used as adjunct to SRP significantly aids in reducing probing pocket depths [9, 10].

Previous studies have reported quantification of chlorhexidine in saliva [11], whole blood [12] and serum [13] by HPLC with UV or MS detection. LC-MS methods are sensitive and selective, but require highly qualified personnel and expensive instrumentation. To the best of our knowledge, only one HPLC method with UV detection for determination of CHX in GCF has been developed, which employed ion-pair reagent in the mobile phase [9].

The main purpose of this study was to develop a simple, sensitive and reliable RP HPLC method for quantification of CHX in GCF. Therefore, this study was focused on the development, optimization and validation of a simple bioanalytical RP-HPLC

method that can be employed for routine analysis of CHX concentrations in GCF after the PerioChip™ application in periodontal pockets.

Materials and methods

Chemicals and materials

Chlorhexidine digluconate and chlorpheniramine maleate (internal standard, IS) were provided by Sigma Aldrich (Germany) and Supriya Lifescience Ltd. (India). Methanol and acetonitrile (HPLC grade) were supplied by Carlo Erba, Italy. Analytical grade sodium phosphate (Na_3PO_4), triethylamine (TEA) and phosphoric acid were purchased from Sigma Aldrich (Germany). HPLC grade water was used for chromatographic analysis. Whatman 3MM chromatography paper strips 2 mm x 5 mm (Whatman Lab Sales Ltd., UK) were used for GCF collection. Human serum was obtained from healthy volunteers (Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, University of “Ss. Cyril and Methodius”, Skopje, Macedonia). PerioChip™ containing 2.5 mg of chlorhexidine digluconate was supplied by Perio Products Ltd., Jerusalem, Israel.

Collection of GCF samples

GCF samples were obtained from 30 patients suffering from chronic periodontitis. The patients had at least 2 periodontal pockets with probing pocket depths of ≥ 5 mm. A single chip was placed into each predetermined periodontal pocket using dental forceps, after isolation and drying the associated tooth. The PerioChip™ completely decomposes after 7-10 days of placement. GCF samples were collected after 1 and after 24 hours of PerioChip™ placement and then after 2, 4, 6 and 7 days. GCF was collected applying the method of Koss et al. In brief, the paper strips were placed in the selected periodontal pockets until mild resistance was felt and left in place for 30 s [14].

Apparatus and chromatographic conditions

The HPLC analysis was conducted on Shimadzu Nexera HPLC system equipped with UV diode array detector. The chromatographic separation was performed on Discovery C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm (Supelco, USA) at 25°C. The mobile phase was acetonitrile, 0.01 mol L $^{-1}$ phosphate buffer adjusted to pH=3.0 with phosphoric acid and triethylamine (33:66:1, V/V/V). Flow rate was 1 mL min $^{-1}$. The injection volume was 50 μL and the UV detection was performed at 253 nm. The total run time for the HPLC analysis was 10 min.

Preparation of standard solutions and quality control (QC) samples

Stock standard solutions of chlorhexidine digluconate (1.0 mg mL^{-1}) and chlorpheniramine maleate (1.0 mg mL^{-1}) were prepared in methanol and refrigerated at 4°C in dark volumetric flasks. Working standard solutions of CHX were made daily by diluting the stock standard solution of CHX with mobile phase to concentrations of 50.0, 75.0, 100.0, 125.0, 150.0, 200.0 and $500.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Working standard solution of IS was made daily by diluting the stock standard solution of IS with mobile phase to concentration of $125.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Calibration curve standard solutions were prepared using working standard solutions of CHX and IS on 7 paper strips previously spiked with 2 μL of serum, using the following procedure: 2 μL of separate CHX working standard solution and 15 μL of IS working standard solution were added to each paper strip. Paper strips were extracted with 200 μL of acetonitrile. Final concentrations of calibration curve standard solutions were 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.50, 2.0 and $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. QC (*Quality Control*) sample solutions were prepared in the same manner as calibration curve standard solutions in concentrations of 0.50, 1.50, 2.50 and $4.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ and stored at -20°C . GCF exists as a serum transudate, therefore calibration curve standard solutions and QC samples were prepared in serum because GCF is not commercially available nor easily collectable in large volumes [15].

GCF sample preparation

After collection of GCF, paper strips were removed and placed in preweighted Eppendorf tubes and kept at -20°C until analysis. Before the HPLC analysis, GCF samples were thawed at room temperature. 15 μL from $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ IS solution was added to the GCF sample. After adding acetonitrile as an extracting solvent up to volume of 200 μL , the GCF sample solutions were vortex mixed for 3 minutes. The liquid content of the tubes was transferred to glass autosampler vials. Injection volume was 50 μL . The weight of the fluid was calculated as a difference between the mass of the strips before GCF collection and after their application in the pocket. The obtained value, expressed as μg , was converted to volume in μL assuming the density of GCF was 1 mg mL^{-1} [14]. The concentration of CHX in GCF samples obtained from patients was calculated by multiplying the value obtained after the HPLC analysis by factor $200/V$, where V is the volume of the GCF samples expressed in μL .

Validation procedure for the bioanalytical HPLC method

The validation of the developed bioanalytical RP HPLC method for determination of CHX in GCF was performed according to EMA (*European Medicines Agency*) Guideline for validation of bioanalytical methods [16].

Linearity-The calibration line was constructed with seven calibration standards in the range from 0.50 to 5.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CHX, including *LLOQ* (*Lower Limit of Quantification*) and the *ULOQ* (*Upper Limit of Quantification*). The calibration curve was obtained using linear regression analysis of CHX peak area to internal standard peak area ratio *vs.* concentration. Limit of detection (LOD) was calculated as the concentration level resulting in peak area three times the baseline noise. *Selectivity* – Selectivity of the method was investigated by comparing blank GCF sample solutions and QC sample solutions containing 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CHX.

Accuracy and precision – Intra-day accuracy and precision was determined using five replicates of each of the following QC sample solutions: 0.50, 1.50, 2.50 and 4.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ which represent *LLOQ*, low QC sample (LQC), medium QC sample (MQC) and high QC sample (HQC), respectively. The QC sample solutions were analyzed on the same day to establish intra-day accuracy and precision and on three different days to investigate inter-day accuracy and precision.

Recovery – The extraction recovery for CHX and IS were calculated by comparing the peak areas measured after extraction of five replicates of QC sample solutions in the following concentrations: 0.50, 1.50, 2.50 and 4.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with peak areas of solutions with the same concentration prepared in mobile phase.

Stability – CHX sample solution stability was tested by chromatographic analysis of QC samples at LQC and HQC levels. The freeze-thaw stability (36 h at - 20 °C, three cycles), short-term stability (2 h, room temperature), long-term stability (30 days, - 20 °C) and autosampler stability (immediately after extraction and 16 hours after preparation) were investigated.

Results and discussion

HPLC method's optimization

Chromatographic conditions were varied to achieve efficient separation of CHX and the IS from the components of the matrix and a chromatographic response in a short run time per analysis for both the analyte and IS. During preliminary investigations, mobile phase composition, flow rate and injection volume were optimized. Several mobile phases containing 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer (pH=3.0) and acetonitrile were investigated where the composition of the organic phase varied from 20 % – 40 %. It was observed that a mobile phase consisting of acetonitrile, 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer (pH=3.0) and triethylamine (33:66:1, *V/V/V*) was the most appropriate choice. In order to reduce the peak tailing, 1 % triethylamine was used. The flow rate was investigated in the range from 0.5 – 1.5 mL min^{-1} and the final flow rate was set to be 1.0 mL min^{-1} . The injected sample volume was tested in the range from 20 μL to 50 μL in order to achieve the required sensitivity, accuracy and precision for selective

determination of CHX in GCF. It was found that 50 μL was optimal volume to obtain maximal peak enhancement, especially for the extracted samples in which the lowest concentration of CHX was expected.

Chlorpheniramine shows similar chromatographic behavior, elutes near CHX and does not interfere with components from the sample matrix. Therefore, it was selected as internal standard for this method. The structure of the IS is shown in Figure 1B. ACN was chosen as the extracting solvent because of the high extraction power for both CHX and the IS.

HPLC method's validation

System suitability

The system suitability test was an integral part of the chromatographic method development and it was used to verify that the system was adequate for the analysis to be performed. The suitability of the chromatographic system was demonstrated by the retention time, resolution, plate number, tailing factor and retention factor values are shown in Table I.

Table I System suitability parameters

Tabela I Parametri za proveru pogodnosti sistema

Parameter	CHX	IS
Retention time (t_R) (min)	7.14	5.01
Resolution (R_s)	7.094	4.518
Number of theoretical plates (N) (USP)	5852	7462
Tailing factor (T_f)	1.339	1.244
Retention factor (k)	1.8	1.01

Linearity

Good linearity was observed in the range from 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ – 5.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Coefficient of determination R^2 was 0.9911, the LOD was 0.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the LLOQ was 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Linear regression equation for CHX in GCF was $y = (0.5926 \pm 0.02) x - (0.0014 \pm 0.05)$. All analytical parameters of the linear regression equations were calculated for confidence interval of 95 %.

Selectivity

The chromatograms of blank GCF and GCF spiked with CHX and IS are presented in Fig. 2. As shown in Fig. 2b, no endogenous interferences were found at the retention times of CHX and GCF, confirming the selectivity of the method. Well separated peaks of IS and CHX were obtained at approximately 5.01 min. and 7.14 min., respectively.

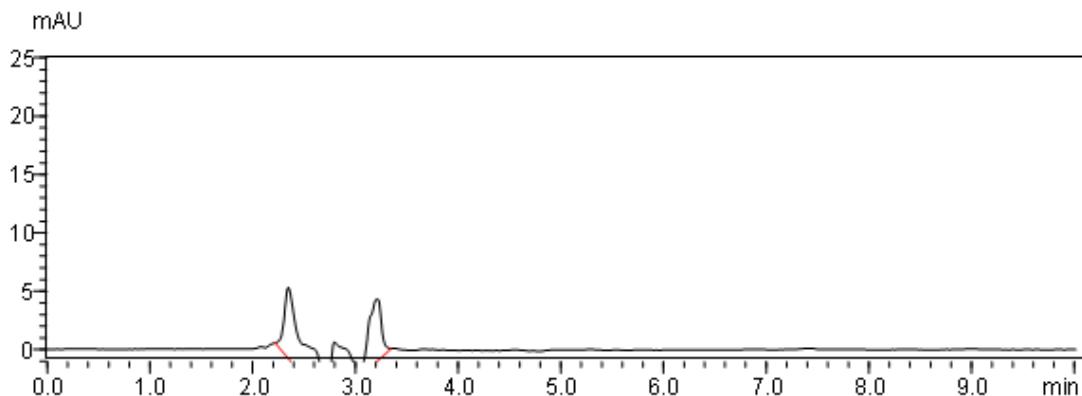


Figure 2A. Representative chromatogram of a blank GCF sample

Slika 2A. Reprezentativni hromatogram blanka GCF uzorka

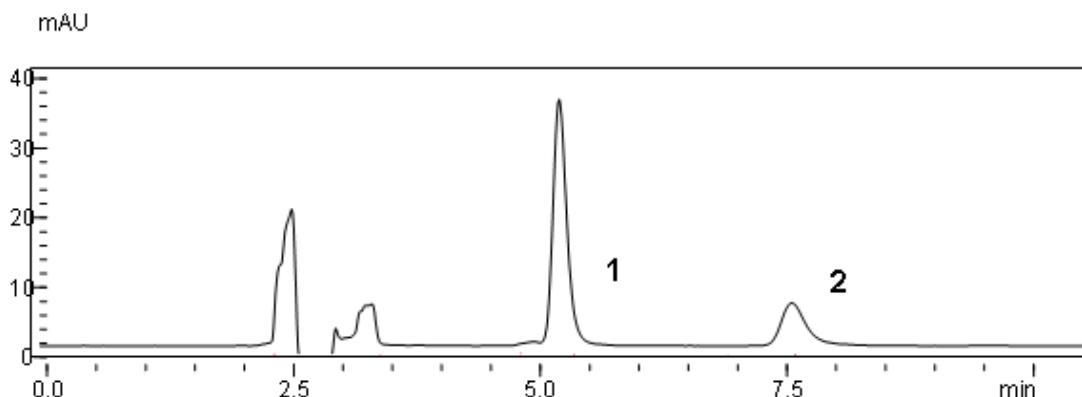


Figure 2B. Representative chromatogram of a blank GCF sample spiked with $0.50 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX (2) and $10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ IS (1)

Slika 2B. Reprezentativni hromatogram blanka GCF uzorka opeterćen sa $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ CHX (2) i $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ IS (1)

Accuracy and precision

The intra-day and inter-day accuracy and precision are shown in Table I. The mean of intra- and inter- day accuracy were in the range 98.3 % – 101.9 % and 100.3 % – 106.02 %, respectively. RSD values for intra- and inter- day precision were 3.98 % – 5.66 % and 0.56 % – 4.30 %.

Table II Precision and accuracy of the proposed method

Tabela II Preciznost i tačnost metode

	CHX in QC sample ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found CHX ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a	Accuracy (%)	Precision (CV, %)
Intra-day ($n=5$)	0.50	0.49 \pm 0.03	98.39	5.66
	1.50	1.50 \pm 0.08	99.76	5.12
	2.50	2.44 \pm 0.10	99.68	3.98
	4.00	4.08 \pm 0.17	101.91	4.23
Inter-day ($n=30$)	0.50	0.50 \pm 0.02	100.30	4.30
	1.50	1.54 \pm 0.05	102.41	3.13
	2.50	2.65 \pm 0.01	106.02	0.56
	4.00	4.10 \pm 0.14	102.48	3.36

^a mean \pm SD

Extraction recovery

The mean extraction recovery values \pm RSD across four concentrations were 92.14 % \pm 8.07 %, 93.50 % \pm 2.69 %, 97.03 % \pm 2.94 %, 97.61 % \pm 0.96 % and 95.2 % \pm 2.1 % for internal standard that suggested good extraction recovery. Results are shown in Table III.

Table III Extraction Recovery data**Tabela III** Rezultati za Recovery nakon ekstrakcije

Added CHX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Determined CHX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)^a	Recovery (%)	RSD (%)
0.50	0.46 \pm 0.04	92.14	8.07
1.50	1.40 \pm 0.04	93.50	2.69
2.50	2.43 \pm 0.07	97.03	2.94
4.00	3.90 \pm 0.03	97.61	0.96

^a mean \pm SD, n=5*Stability*

GCF samples may encounter different conditions that influence the stability of the samples during collection and analysis, thus stability experiments were performed. The results showed that GCF samples spiked with CHX are stable after three freeze-thaw cycles, after 16 hours in the autosampler and at room temperature for 2 hours. The study has shown that samples could be kept frozen at – 20° C, for one month. The stability results are presented in Table IV.

Table IV Stability of CHX in GCF samples**Tabela IV** Stabilnost CHX u GCF uzorcima

CHX ($\mu\text{g mL}^{-1}$) in QC samples	Determined CHX^a	
Freeze-thaw stability	Fresh samples ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Relative to fresh sample (%)
0.50	0.49 \pm 0.03	101.01 \pm 1.78
4.00	4.08 \pm 0.17	101.79 \pm 1.09
Short-term stability		
0.50	0.48 \pm 0.13	97.65 \pm 3.64
4.00	3.99 \pm 0.02	98.81 \pm 1.72
Autosampler stability		
0.50	0.47 \pm 0.24	98.21 \pm 3.18
4.00	3.98 \pm 0.01	99.67 \pm 0.78
Long-term stability		
0.50	0.48 \pm 0.56	98.63 \pm 1.30
4.00	3.97 \pm 0.69	98.56 \pm 0.60

^a mean \pm SD

Method application

In order to examine the potential of the method for clinical application, it was applied to analyse samples of GCF collected from patients suffering from chronic periodontitis after local application of the PerioChipTM. The chromatogram of patient's GCF sample obtained 1 hour after the insertion of the PerioChipTM is presented in Figure 3.

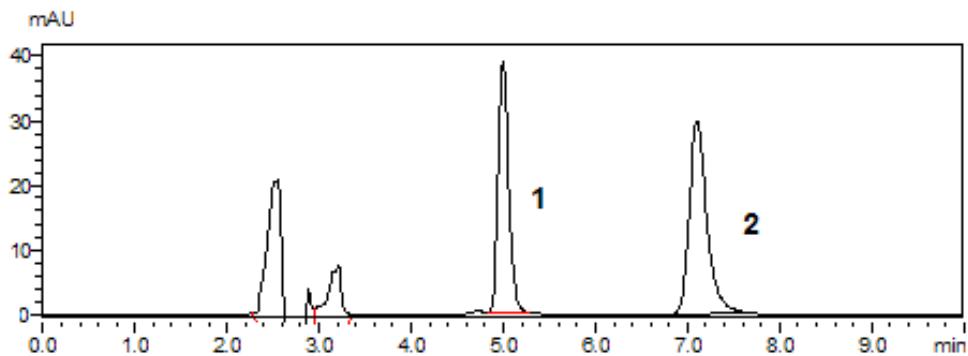


Figure 3. Representative chromatogram of a patient GCF sample obtained 1 hour after the application of the PerioChip (1-IS, 2-CHX)

Slika 3. Reprezentativni hromatogram uzorka GCF pacijenta dobijen 1 sat nakon primene PerioChip (1-IS, 2-CHX)

After the subgingival placement of the PerioChipTM, we have found that the CHX in GCF reached maximum concentration of $1452.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ after 1 hour. The concentration then decreased in the range from $1200.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ – $750.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the next 70 hours and reached $500.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ at the end of the study period. Mean CHX concentrations in GCF obtained from patients after PerioChipTM applications are shown in Table V.

Table V Mean chlorhexidine concentrations in GCF obtained from 30 patients after PerioChipTM application

Tabela V Srednja vrednost koncentracije hlorheksidina u GCF dobijena analizom uzorka dobijenih od 30 pacijenata nakon primene PerioChipTM

Time (h)	CHX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Mean \pm SD	RSD (%) ^a
1	1452.8 \pm 187.88	12.93
24	1200.3 \pm 255.98	21.33
48	911.9 \pm 81.22	10.44
96	783.6 \pm 74.32	9.48
144	750.5 \pm 62.39	8.31
168	500.5 \pm 35.47	7.09

^aRSD – inter-individual variability of CHX concentration in GCF

It is noteworthy that CHX levels in GCF were maintained over 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for about 72 hours and they remain above 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for up to seven days. This concentration has been reported to be the minimum inhibitory concentration (MIC) for more than 99 % of bacterial flora isolated from periodontal pockets [7].

The results given in Table V suggest high inter-individual variability among the patients included in the study. This might be due to the variations in GCF flow, the great variability in GCF flow between patients with different degrees of periodontal inflammation as well as the reduction in the GCF flow rate that might be expected at the end of the treatment [7].

Conclusion

A simple isocratic RP HPLC method with UV detection for quantification of CHX in GCF has been developed and validated. The proposed method has been successfully applied to the analysis of GCF samples from patients suffering from chronic periodontal disease. Considering high sensitivity and small aliquots of biological sample required for sample analysis, this method can be easily applied for the therapeutic drug monitoring in patients undergoing therapy or pharmacokinetic evaluation of other drug delivery systems containing CHX used in periodontal treatment.

References:

1. Soskolne WA. Subgingival delivery of therapeutic agents in the treatment of periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol M.* 1997; 8(2):164–74.
2. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098: 216–29.
3. Patel PV. Gingival crevicular fluid (GCF): An oral biomarker in the diagnosis and quantification of periodontal diseases. *J Invest Periodontol.* 2010; 3 (6):45–63.
4. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodont Res.* 2002; 37:389–98.
5. Perinetti G, Paolantonio M, Cordella C, D'Ercole S, Serra E, Piccolomini R. Clinical and microbiological effects of subgingival administration of two active gels on persistent pockets of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:273–81.
6. Greenstein G. Local drug delivery in the treatment of periodontal diseases: Assessing the clinical significance of the results. *J Periodontol.* 2006; 77:656–78.
7. Schwach Abdellaou K, Vivien-Castioni N, Gurny. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50:83–99.
8. Paolantonio M, D'Ercole S, Pilloni A, D'Archivio D, Lisanti L, Graziani F, Femminella B, Sammartino G, Perrillo L, Tete S, Perfetti G, Spoto G, Piccolomini R, Perinetti G. Clinical, microbiologic, and biochemical effects of subgingival administration of a xanthan-based chlorhexidine gel in the treatment of periodontitis: a randomized multicenter study. *J Periodontol.* 2009; 80:1479–92.
9. Soskolne WA, Chajek T, Flashner M, Landau I, Stabholz A, KolatchB, Lerner EI. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip™ in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:1017–21.
10. American Academy of Periodontology. The role of Controlled drug delivery for periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71:125–40.
11. Musteata FM, Pawliszyn J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase extraction. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37: 1015–24.
12. Xue Y, Tang M, Hieda Y, Fujihara J, Takayama K, Takatsuka H, Takeshitta H. High-performance liquid chromatographic determination of chlorhexidine in whole blood by solid-phase extraction and kinetics following an intravenous infusion in rats. *J Anal Toxicol.* 2009; 33:85–91.
13. Kudo K, Ikeda n, Kiyoshima A, Hino Y, Nishida N, Inoue N. Toxicological analysis of chlorhexidine in human serum using HPLC on a polymer-coated ODS column. *J Anal Toxicol.* 2002; 26:119–22.
14. Koss M, Castro C, Salum K, Lopez M. Enzymatic profile of gingival crevicular fluid in association with periodontal status. *Lab med.* 2009; 40:277–80.
15. Vineau DS, Kindberg CG, Development and validation of a sensitive method for tetracycline in gingival crevicular fluid by HPLC using fluorescent detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1997; 16:111–17.
16. EMA, *Guideline on bioanalytical method validation*, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.* Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).

Razvoj i validacija RP-HPLC metode za određivanje hlorheksidina u gingivalnoj tečnosti

Liljana Bogdanovska^{1*}, Sehmedin Saliu², Mirjana Popovska², Aneta Dimitrovska¹, Liljana Ugrinova¹, Rumenka Petkovska¹

¹ Katedra za primenjenu hemiju i farmaceutsku analizu, Univerzitet „Čirilo i Metodije“ – Farmaceutski fakultet, Majke Tereze 47, Skoplje, Republika Makedonija

² Katedra za oralnu patologiju i periodontologiju, Univerzitet „Čirilo i Metodije“ – Stomatološki fakultet, Majke Tereze 47, Skoplje, Republika Makedonija

* autor za prepisku, e-mail: lbogdanovska@ff.ukim.edu.mk

Kratak sadržaj

Optimizirana je i validirana revezno-fazna HPLC metoda sa UV detekcijom za određivanje hlorheksidina u tečnosti gingivalnog sulkusa (eng. *Gingival Crevicular Fluid* – GCF) primenom hlorfeniramina kao internog standarda. Hromatografska analiza urađena je na Discovery C18 HPLC koloni sa mobilnom fazom koja se sastojala od 0,01 mol L⁻¹ fosfatnog pufera (pH=3,0), trietilamina i acetonitrila u odnosu (66:1:33, V/V/V). Pod optimalnim hromatografskim uslovima ispitana je linearost u opsegu koncentracija od 0,5 µg mL⁻¹ do 5,0 µg mL⁻¹ sa sledećim vrednostima za limite: LOD 0,07 µg mL⁻¹ I LLOQ 0,5 µg mL⁻¹. Metoda je uspešno primenjena za određivanje koncentracije hlorheksidina u GCF kod pacijenata sa hroničnom parodontopatijom nakon primene PerioChipTM.

Ključne reči: hlorheksidin diglukonat, PerioChipTM, RP-HPLC, tečnost gingivalnog sulkusa, parodontopatija

Determination of oxcarbazepine and its related substances using UHPLC method with UV detection

Jelena Žirojević, Katica Drljević-Đurić, Aleksandra Đurđević*

¹ Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Vojvode Stepe 458,
Belgrade, Serbia

*Author for correspondence, E-mail: aleksandra.djurdjevic@alims.gov.rs

Summary

A simple and rapid ultra - high performance liquid chromatographic (UHPLC) method for the separation and determination of oxcarbazepine and its related substances in tablets, was developed. Chromatographic separation of oxcarbazepine from its related substances (degradation and by-products) was achieved on a reversed phase C₁₈ column (Pinnacle DB C18, RESTEK, 100 x 2.1 mm, 1.9 µm particle size) using gradient program with water (as mobile phase A) and acetonitrile (as mobile phase B), at a flow rate 0.5 mL min⁻¹ and UV detection at 254 nm. The column temperature was 30°C. The method has good selectivity towards oxcarbazepine and its related substances. The accuracy of the method for oxcarbazepine assay, expressed as mean recovery was 101.8 %, and of the method for quantification of degradation products was 95.9 % – 103.3 %. Limit of quantification for oxcarbazepine and its degradation products ranged from 0.60 µg mL⁻¹ to 1.30 µg mL⁻¹. The linearity range for oxcarbazepine assay was from 2.4 to 3.60 mg mL⁻¹ ($R^2=0.999$). Mean value for oxcarbazepine assay from the tablets was 299.92 mg (label claim 300 mg). The method can be used for routine analysis and the quality control of oxcarbazepine drug substance and its formulated products.

Key words: oxcarbazepine, related substances, UHPLC method, gradient elution

Introduction

10,11-dihydro-10-oxo-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide (Oxcarbazepine) is an anticonvulsant and mood stabilizing drug used in the treatment of epilepsy and reduction in anxiety symptoms accompanying the epilepsy seizures. Oxcarbazepine is structurally a derivative of carbamazepine which is also an effective anticonvulsant [1–3]. Oxcarbazepine is not official in any Pharmacopoeia. Considering the biological significance of oxcarbazepine, several quantitative analytical procedures have been reported for its determination in various matrices [4]. In pharmaceutical formulations such methods include spectroscopic [5–9], HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*) [10, 11], HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) [12, 13], GC (*Gas Chromatography*) [14], and voltammetry [15]. The process synthesis of oxcarbazepine involves many steps so that many by-products could be carried over to the final product. Also the storage condition and temperature variations may lead to the formation of degradation products in formulations. The fast and reliable method is required for analysis of related substances in oxcarbazepine formulations. The focus of the present study was to develop and accurate, selective and reproducible method for the determination of oxcarbazepine in the presence of low levels of its degradation and by-products. Examined by products were: CGP 52118, CGP 83596, CGP 16554 and CGP 84426 and degradation products were: CGP26202, GP 47705, CGP18671, G 32883, GP477 3 and GP 51045.

The developed method was UHPLC with gradient elution. The mobile phase was composed of water and acetonitrile without addition of any additives.

1. Experimental

2.1 Materials and reagents

All reagents were of analytical reagent grade. Gradient grade acetonitrile was obtained from Merck AG, Darmstadt, Germany. Deionized water (EasyPure) was used throughout the study. Diluent was mixture of acetonitrile and water (80:20 V/V). Standard substances of oxcarbazepine and its related substances as well as Trileptal® film tablets, 300 mg label claim were supplied by Novartis Pharma Stein AG, Switzerland.

2.2 Apparatus

Experiments were done on the Nexera X2 UPLC modular system composed LC-30 AD pump, an SPD-M 20A diode array detector an SIL-30AC auto-injector, a DGU 20 A5 degasser and CBM 20A system controller (all from Shimadzu, Kyoto, Japan). A reversed phase C₁₈ (Pinnacle DB C18, 100 x 2.1 mm, 1.9 μm particle size, RESTEK)

column was used for separation. Maximum applied pressure was 1000 bar. Chromatographic data were analysed with Shimadzu Lab Solutions software.

2.3 Chromatographic conditions

The mobile phase was water (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B). Before delivering into the system it was filtered through 0.45 µm PTFE filter and degassed using vacuum. The analysis was carried out under gradient conditions using a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ at 30°C temperature. Gradient conditions are given in Table I.

Table I Gradient conditions

Tabela I Uslovi gradijenta

Step	Time [min]	A [%]	B [%]
1	0	92	8
2	6	92	8
3	11	40	60
4	11.1	92	8
5	13	92	8

Chromatograms were recorded at 254 nm for both oxcarbazepine and related substances.

2.4 Analytical procedure

For testing suitability of chromatographic system test solution (*System Suitability Test – SST*) consisting of oxcarbazepine and 10 related substances (Fig. 1) was prepared. Concentration of each compound in this solution was approximately 3 µg mL⁻¹ which corresponds to 0.1 % of working concentration for assay. SST solution was used to determine resolution factor.

For assay of oxcarbazepine in Trileptal® film tablets standard solution was prepared by weighing and dissolving standard substance oxcarbazepine to yield concentration approximately 3 mg mL⁻¹.

For quantification of related substances mix solution consisting of oxcarbazepine and its degradation products was prepared. Concentration of oxcarbazepine, GP 47703, GP 47705 and GP 51045 were approximately 3 µg mL⁻¹ which corresponds to 0.1 % of working concentration for assay. Concentration of CGP 26202 and CGP 18671 were approximately 6 µg mL⁻¹ which corresponds to 0.2 % of working concentration for

assay. Concentration of G 32883 was approximately 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ which corresponds to 0.3 % of working concentration for assay.

In order to simulate situation in real sample and to prove selectivity of UHPLC method solution of a synthetic mixture of oxcarbazepine and its 10 related substances was made in which oxcarbazepine concentration was 3 mg mL^{-1} and all related substances were at the level 0.1 % (approximately 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

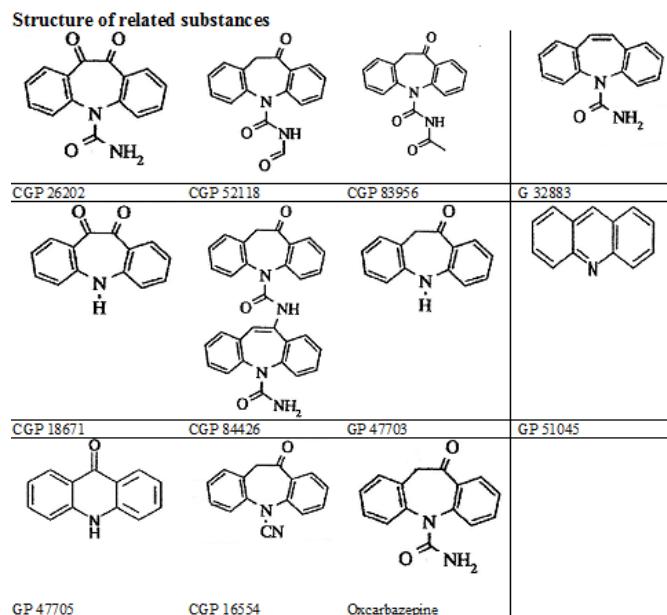


Figure 1. Molecular structures of oxcarbazepine and its related substances (degradation and synthesis by-products substances)

Slika 1. Molekulske strukture okskarbamazepina i njegovih srodnih supstanci (degradacioni proizvodi i sporedni proizvodi iz procesa sinteze)

2.5 Sample preparation

20 tablets were accurately weighed and finally powdered. An accurately weighed portion of the powder equivalent to 300 mg of oxcarbazepine was transferred to a 100 mL volumetric flask. A 70 mL of diluent was added and sonicated for 15 min., than thoroughly shaken for 15 minutes and brought to volume with diluent and filtered.

2. Results and discussion

2.1 Method development

During the method development top priority was given to complete separation of oxcarbazepine from its related substances. We required resolution ≥ 1.4 between each pair of peaks. Also, repeatability of peak area should give relative standard deviation $\leq 3\%$ for each peak in solution for quantification of degradation products ($n = 6$) and $\leq 1\%$ for oxcarbazepine in solution for assay.

Molecular structures of oxcarbazepine and its related substances studied in this work are presented in Figure 1. All these materials were subjected to separation by reversed phase UHPLC. We found that separation and resolution were pH independent, so the pH of the mobile phase was not adjusted. Acetonitrile was used as solvent modifier to improve separation. Since we could not meet the required quality chromatographic separation using isocratic elution we optimized the gradient elution with water as phase A and acetonitrile as phase B. Several gradient conditions were tried, applying *One Factor at Time Approach*, in which gradient slope was varied, bearing in mind that total time of analysis should be less than 15 min. The temperature of column was varied between 25°C and 40°C with 30°C giving the best resolution. The flow rate was subjected to optimization with the aim to shorten the total time of analysis without adversely affecting the resolution. Column characteristics and high applied pressure allowed good flow rate at 0.5 ml/min. At this flow rate the retention of oxcarbazepine and related substances is satisfactory so that subsequent analysis was made with flow rate of the mobile phase 0.5 mL min⁻¹. Injected volume of the analyte was varied from 0.1 µL to 1 µL and obtained peak areas and relative standard deviations were satisfactory with 1 µL of injected volume. A typical chromatogram of a SST solution is given in Figure 2.

The peaks were identified according to their retention times by comparison with co-injected individual standards. Reproducible peak shapes were obtained under the optimum conditions. Therefore the C₁₈ column choice was good. The retention time (t_R), the relative retention time (RRT), relative response factors and resolutions were determined and recorded in Table II.

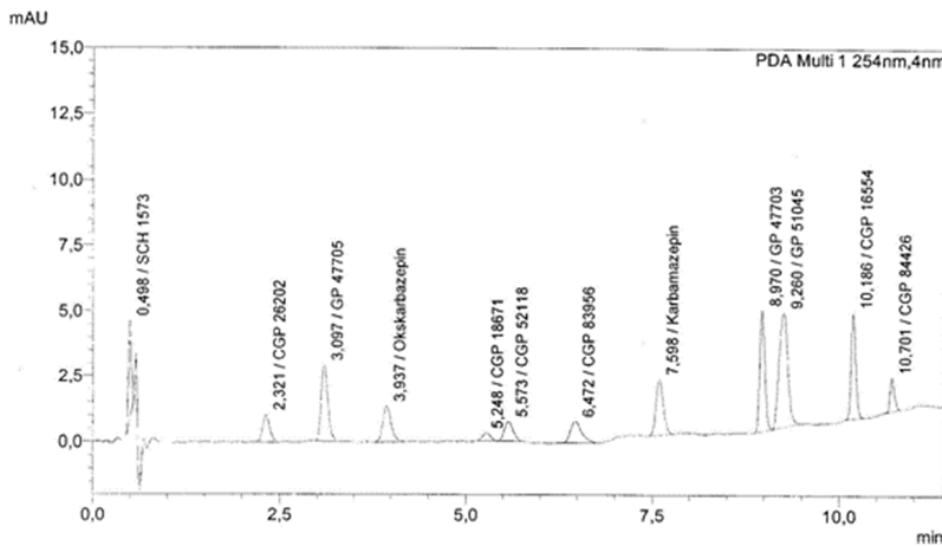


Figure 2. Chromatogram of SST solution under gradient conditions with water as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B at 30°C and UV detection at 254 nm

Slika 2. Hromatogram rastvora za proveru pogodnosti sistema u uslovima gradijentnog eluiranja sa dodom kao mobilnom fazom A i acetonitrilom kao mobilnom fazom B na 30°C i detekcijom na 254 nm

Table II Chromatographic parameters of oxcarbazepine and its related substances

Tabela II Hromatografski parametri okskarbamazepina i njegovih srodnih supstanci

Compound	Type*	Rt (min)	RRT	RRF	Rs
CGP 26202	DP	2.32	0.59	1.22	-
GP 47705	DP	3.10	0.79	0.09	4.2
Oxcarbazepine	DS	3.94	1	1	4.2
CGP 18671	DP	5.25	1.33	0.86	6.1
CGP 52118	BP	5.57	1.41	-	1.5
CGP 83956	BP	6.47	1.64	-	3.5
G 32883	DP	7.60	1.93	1.1	4.7
GP 47703	DP	8.97	2.28	0.4	7.9
GP 51045	DP	9.26	2.35	0.1	1.5
CGP 16554	BP	10.19	2.59	-	5.2
CGP 84426	BP	10.70	2.72	-	3.8

*DP – Degradation product, BP – By-product, DS – Drug substance

2.2 Accuracy for degradation products

Standard mixture containing known amounts of degradation products were analysed by UHPLC under optimal conditions. The accuracy of the method was checked for 5 different concentration levels spanning the range 20 % – 120 % from specification limits. Defined quantity of each of the degradation product was added to the placebo and chromatographed. Mean recoveries are given in the Table III.

Table III Accuracy of the method expressed as mean *Recovery*

Tabela III Tačnost metode izražena kao srednja *Recovery* vrednost

Compound	20 %	50 %	70 %	100 %	120 %	Mean (%)
CGP 26202	96.3	104.9	96.6	98.0	101.9	99.5
GP 47705	95.9	97.8	95.5	97.9	98.3	97.1
Oxcarbazepine	103.0	104.2	100.6	104.8	103.7	103.3
CGP 18671	95.0	101.9	102.5	98.2	98.3	99.1
G 32883	96.1	104.5	95.7	103.8	99.4	99.9
GP 47703	97.9	95.8	95.1	95.3	95.2	95.9
GP 51045	98.8	98.6	98.3	98.0	98.0	98.3

2.3 Accuracy for oxcarbazepine assay

The accuracy of the method for quantification of drug substance was determined by applying the method to placebo to which known amount of oxcarbazepine corresponding to 80 %, 100 % and 120 % of label claim had been added. At each level five determinations were performed. Mean *Recoveries* at each level are 102.0 %, 101.5 % and 102.0 %, respectively and 101.8 % mean value.

2.4 Selectivity

To demonstrate the selectivity of the method the placebo was prepared and spiked with oxcarbazepine and each of the related substances and it was found that the excipients don't interfere either with oxcarbazepine or any of related substances. This indicated that method is selective for separation and determination of oxcarbazepine and its degradation products in film tablets (Figure 3).

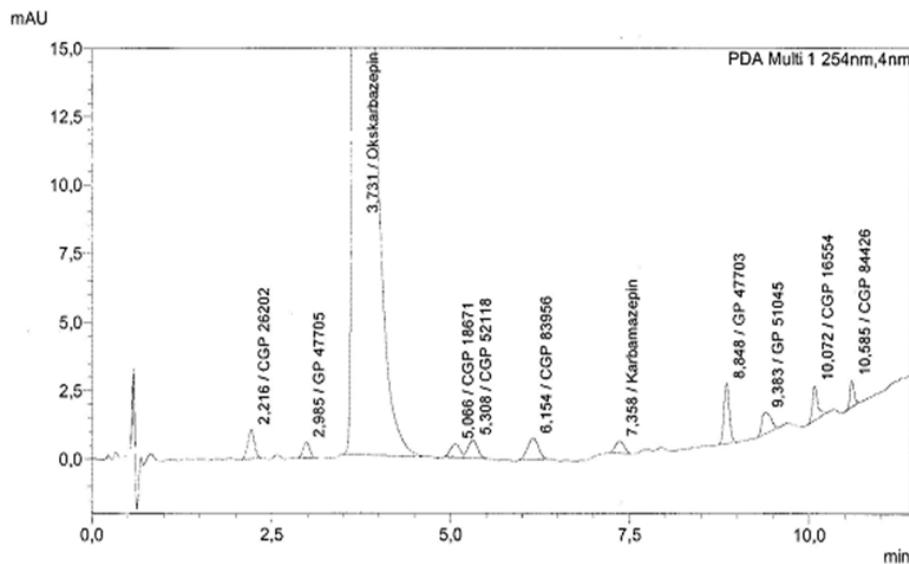


Figure 3. Chromatogram of placebo solution spiked with oxcarbazepine and its related substances

Slika 3. Hromatogram placebo rastvora sa dodatkom okskarbamazepina i njegovih nečistoća

2.5 Linearity

Calibration graphs (concentration vs. peak area) were constructed at 5 concentration levels for oxcarbazepine and its degradation products. At each concentration level 3 determinations were made. Table IV. gives concentration range, linearity equation, correlation coefficient (R^2), precision expressed as RSD (*Relative Standard Deviation*) and LOQ for all compounds.

Table IV Linear regression data for determination of oxcarbazepine and its related substances**Tabela IV** Podaci linearne regresije za metodu za određivanje sadržaja okskarbamazepina i njegovih srodnih supstanci

Parameter Compound	Concentration range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Regression equation	R^2	RSD (%)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Related substances					
CGP 26202	1.28 – 7.68	$1E+06X - 139.72$	0.998	1.24	1.28
GP 47705	0.65 – 3.90	$2E+07X - 59.61$	1.000	1.62	0.65
Oxcarbazepine	0.64 – 3.82	$1E+06X + 196.56$	0.995	1.40	0.64
CGP 18671	1.22 – 7.32	$2E+06X + 247.38$	0.995	2.95	1.22
G 32883	1.85 – 11.1	$2E+06X - 187.73$	0.998	1.87	1.85
GP 47703	0.60 – 3.6	$4E+06X - 83.83$	1.000	0.32	0.60
GP 51045	0.58 – 3.48	$2E+07X - 655.66$	0.999	0.17	0.58
Oxcarbazepine assay (mg mL^{-1})					
Oxcarbazepine	2.40 – 3.60	$2E+06X + 31695$	1.000	0.18	-

2.6 Method application

The validated UHPLC method was applied for determination of oxcarbazepine and its degradation products in Trileptal® film tablets, 300 mg (Novartis, Pharmastein AG, Stein, Swiss). Specification limits for assay of oxcarbazepine were 285.0 – 315.0 mg/tablet. Shelf-life specification included determination of CGP 26202 ($\leq 0.2\%$), CGP 18671 ($\leq 0.2\%$), G 32883 ($\leq 0.5\%$), other individual ($\leq 0.1\%$), sum of other degradation products ($\leq 0.5\%$) and total of degradation products ($\leq 1.0\%$). Samples are prepared in triplicate and analysed. Typical chromatogram is presented in Figure 4. Mean value, expressed as the percentage of the label claim, was 99.76 % indicating that the amount of oxcarbazepine in the tablets met the requirements (95 % – 105 % of the

label claim). Amount of degradation produced in sample solution could be calculated either using peak areas of corresponding peaks in quantification solution or using RRT and RRF values given in Table II. In analysed sample of Trileptal® film tablets amount of all related substances were bellow specification limits.

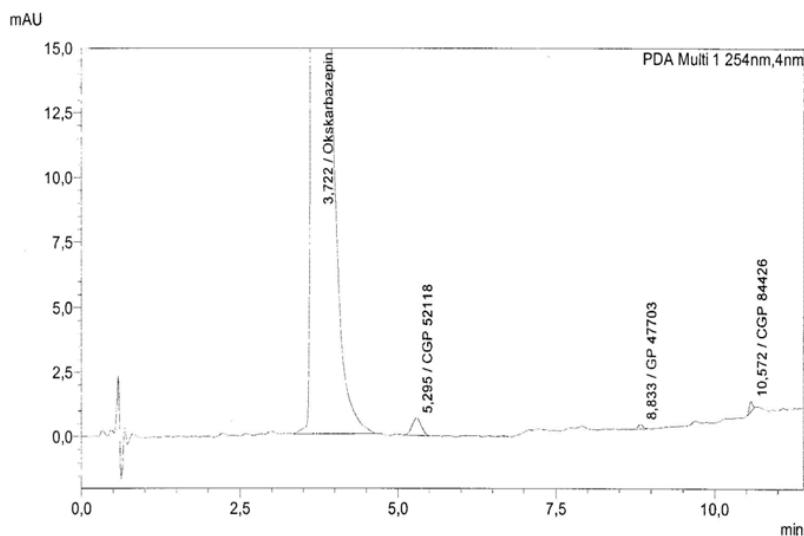


Figure 4. Chromatogram of Trileptal® film tablets obtained under optimal conditions

Slika 4. Hromatogram Trileptal® film tableta dobijen pod optimalnim hromatografskim uslovima

3. Conclusion

The described gradient reversed phase UHPLC method for the determination of oxcarbazepine and its degradation products in dosage form has been evaluated for accuracy, precision, selectivity, linearity and LOQ. The developed method has an advantage over existing literature methods with respect to the total time of analysis and consumption of organic solvents. It is suitable not only for separation and determination of degradation products but also for monitoring of synthesis by-products and it has applicability in routine analysis of oxcarbazepine.

References

1. Oxcarbazepine: Pharmacokinetic interactions and their clinical relevance. *Epilepsia* 1994; 35(3):S14–S9.
2. Flesch G, Overview of the clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine. *Clin Drug Investig*. 2004; 24(4):185–203.
3. Shororor S, Oxcarbazepine: a review. *Seizure* 2000; 9(2):75–9.
4. Enéas PCR, Oliveira RBP, Pianetti GA. Oxcarbazepine: validation and application of an analytical method. *Braz J Pharm Sci*. 2010; 46(2):265–72.
5. Basavaiah K, Rajendraprasad N, Cijo M X, Vinay KB, Ramesh PJ. Development and validation of stability indicating spectrophotometric methods for the determination of oxcarbazepine in pharmaceuticals. *JSIR*, 2011; 70:346–51.
6. Ramaa CS, Chothe PP, Naik AA and Kadam VJ. Spectrophotometric method for the estimation of oxcarbazepine in tablets. *Indian J Pharm Sci* 2006; 68:265–66.
7. Gandhimati M and Ravi TK. Use of Folin-Ciocalteu phenol reagent and 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine HCl in the determination of oxcarbazepine in pharmaceuticals. *Acta Pharm*. 2008; 58:111–18.
8. Satish MA and Nagendrappa G. Spectrophotometric determination of oxcarbazepine in pharmaceutical formulation. *Int J Pharm Sci*. 2010;2:93–8.
9. KrishnaCh. M, RaoS.V. V, Rao N.V.S. M, Rambabu C. Spectrophotometric determination of oxcarbazepine by condensation reactions using 2-chlorophenylhydrazine and anthranilic acid. *JPR* 2011; 10(4):3317–19.
10. Reddy TS and Devi PS. Validation of a high performance thin layer chromatographic method with densitometric detection for quantitative analysis of two anticonvulsants in tablets. *J. Planar Chrom.-MTLC*. 2007; 20:451–56.
11. Bhoite SD, Dhole NS, Bhoir S, Sangole P, Thorat S, Development and validation of stability indicating HPTLC method for determination of oxcarbazepine in bulk and pharmaceutical formulation, *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013; 5(3):127–32.
12. Qi ML, Wang P, Wang LJ, Fu R N. LC method for the determination of oxcarbazepine in Pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal*. 2003; 31:57–62.
13. Rao KS, Belorkar N and Rao MEB. Development and validation of stability indicating liquid chromatographic method for the quantitative determination of oxcarbazepine in tablet dosage forms. *J Young Pharm*. 2009; 1:270–77.
14. Greiner-Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, Virji MA and Krasowski MD. Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetum. *J Chromatogr Sci*. 2007; 45:616–22.
15. Calvo MEB, Renedo OD, Martínez MJA. Determination of oxcarbazepine by square wave adsorptive stripping voltammetry in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal*. 2007; 43(3):1156–60.

Određivanje okskarbamazepina i srodnih supstanci orimenom UHPLC metode sa UV detekcijom

Jelena Žirojević, Katica Drljević-Đurić, Aleksandra Đurđević*

Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Vojvode Stepe 458, Beograd, Srbija

*Autor za prepisku, E-mail: aleksandra.djurdjevic@alims.gov.rs

Kratak sadržaj

Razvijena je jednostavna i brza hromatografska metoda visokih performansi (UHPLC) za razdvajanje i određivanje okskarbamazepina i nečistoća u tabletama. Hromatografsko razdvajanje okskarbamazepina od srodnih supstanci (degradacionih proizvoda i sporednih proizvoda sinteze) izvršeno je na reverzno-faznoj C18 koloni (Pinnacle DBC 18, RESTEK, 100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm veličine čestica) pri gradijentnom programu eluiranja sa vodom kao mobilnom fazom A i acetonitrilom kao mobilnom fazom B, pri brzini protoka mobilne faze $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ i pri UV detekciji na 254 nm. Temperatura kolone bila je 30°C . Limit kvantifikacije za okskarbamezepin i degradacione proizvode bio je u oblasti od $0,60 \text{ mL}^{-1}$ do $1,30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Tačnost metode za određivanje sadržaja okskarbamazepina, izražena kao srednja *Recovery* vrednost bila je 101,8 % a za kvantifikaciju degradacionih proizvoda 95,9 % – 103,3 %. Opseg linearnosti za određivanje karbamazepina je $2,40 \text{ mg mL}^{-1}$ do $3,60 \text{ mg mL}^{-1}$ ($R^2=0,999$). Srednja vrednost određivanja sadržaja okskarbamazepina u tabletama iznosila je 299,92 mg (nominalno, 300 mg). Predložena metoda može se koristiti u rutinskoj kontroli kvaliteta aktivne supstance iz doziranih oblika koji sadrže okskarbamazepin.

Ključne reči: okskarbamazepin, degradacioni proizvodi, UHPLC metoda, gradijentno eluiranje

Optimization of HILIC method for the analysis of bisoprolol and its impurities considering uncertainties in peak position

Tijana Rakić^{1*}, Marko Jovanović¹, Anja Tumpa¹,
Biljana Jančić-Stojanović¹, Mirjana Medenica²

¹ University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

² University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Physical Chemistry and
Instrumental Methods, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

*corresponding author: Phone: +381 11 3951 333; email:tijana.rakic@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

This paper presents the robust optimization of hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the analysis of bisoprolol and its impurities A and C. Chemometric strategy is applied for detailed understanding of system's behavior and establishing the mathematical relationship between investigated factors (acetonitrile content in the mobile phase, pH of the water phase and buffer concentration in the water phase) and chromatographic responses. Grid point search methodology is then performed with the aim to identify the point with satisfactory separation quality for all analyzed substances and to achieve minimal analysis duration. Oversized chromatograms are made creating an extra band broadening for each chromatographic peak corresponding to the value of standard deviation in order to evaluate the incertitude originating from the model uncertainty. On the other hand, the uncertainty originating from the variation of experimental parameters is assessed by simulated experimental design robustness testing. Finally, the obtained robust optimal conditions were: chromatographic column Kinetex HILIC 100Å (100 mm x 4.5 mm, 2.6 µm particle size); mobile phase composed of acetonitrile – water phase (35 mM ammonium acetate, pH 4.9 adjusted with glacial acetic acid) (85:15 v/v); flow rate 1 mL min⁻¹, column temperature 30 °C and UV detection at 254 nm.

Keywords: robust optimization, HILIC, bisoprolol, impurities

Introduction

Science based approach to liquid chromatographic (LC) method development includes thorough understanding of method performances under different conditions, systematic incorporation of quality into the method and full control over all possible negative outcomes. Therefore, chemometric techniques have been widely used for LC method developments in scientific literature [1]. However, the interest for them is rising constantly in pharmaceutical practice and industry, mainly, due to the introduction of recent regulations (ICH Q8 [2], ICH Q9 [3] and ICH Q10 [4]). Applying sophisticated mathematical, statistical and computational skills analysts are challenged to create as best methods as possible in terms of various desired quality characteristic. The core idea of the process is mathematical description of the system behavior establishing the accurate relationship between important method parameters and desired goals and subsequent theoretical examination of the experimental space. In the majority of cases, the most important LC method targets are the achievement of maximal separation quality within minimal analysis duration. However, recent trends in pharmaceutical analysis emphasize the importance of robustness issue in early phases of the method development since the identified optimum is completely useless if its quality cannot be preserved during experimental procedure [5-7].

Robust optimization leads to the creation of LC methods which are more reliable and therefore the risk for method failure in the validation phase is significantly decreased. It can be considered as a “pre-validation” since it mimics the robustness testing procedure in the validation phase but with significant saving of money and time [5]. The robust optimum should preserve desired quality level while slight variations in defined experimental conditions are performed simulating the expected uncertainty in adjustment of method parameters. However, the accuracy and stability of defined optimum depends also on the accuracy of the created mathematical relationship that describes optimum’s dependence on investigated factors [6].

This paper will present the robust optimization of hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) method for the analysis of bisoprolol and its impurities taking into consideration two important sources of optimum uncertainty: the one originating from the mathematical model uncertainty and the other originating from the incertitude in adjustment of method’s parameters.

Pharmaceutical analysis shows increasing interest in HILIC since it is especially suitable for the analysis of the group of polar ionisable compounds, such are numerous pharmaceutically active compounds [8-9]. Method development in this type of chromatography is challenging due to the complex retention mechanism that is not yet well explained in the literature. Moreover, this system is very sensitive to the slight

changes in experimental conditions making the issue of robust optimization even more complicated.

The chemical structure of bisoprolol and investigated impurities is presented in Figure 1.

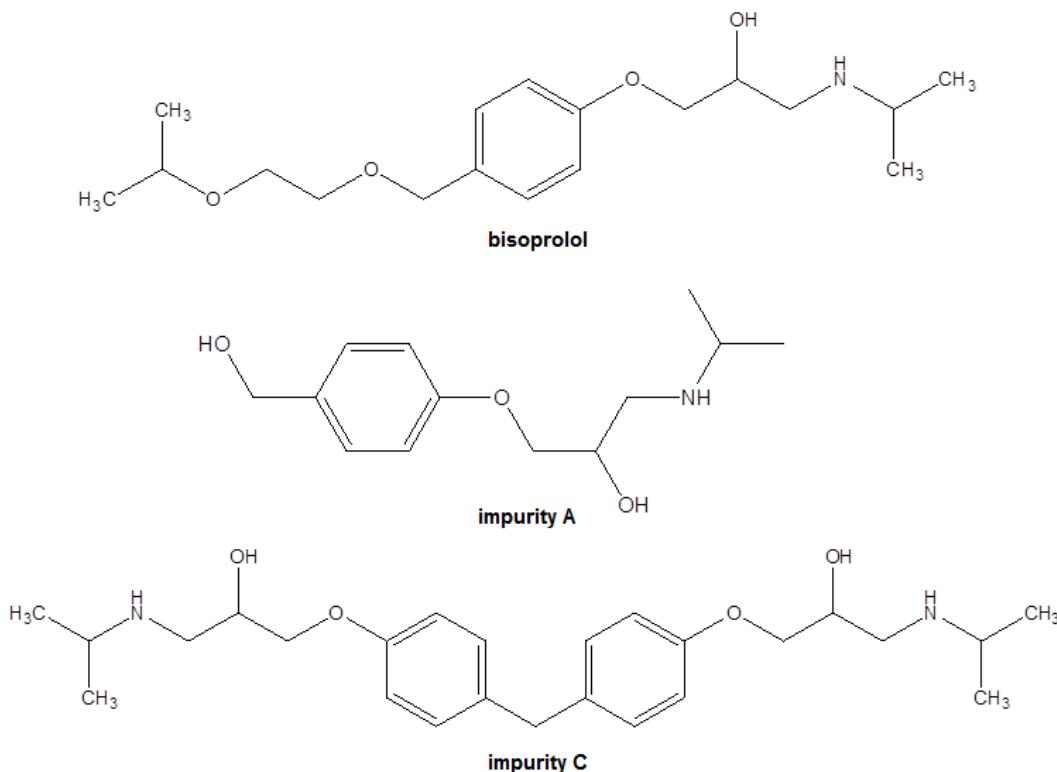


Figure 1. Chemical structure of the investigated substances

Slika 1. Hemisjska struktura ispitivanih supstanci

Literature survey revealed several papers describing the determination of bisoprolol either alone or in combination with other antihypertensive drugs in pharmaceutical dosage forms were found. For determination of bisoprolol alone, spectrophotometric methods [10-11] and chromatographic methods [12] were developed. On the other hand, for drug combinations, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) methods were mainly suggested [13-16]. Simultaneous analysis of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms was carried out by HPTLC (*High Performance Thin Layer Liquid Chromatography*) [13]. RP-HPLC (*Reversed Phased High Performance Liquid Chromatography*) methods were developed for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and

hydrochlorothiazide in tablet formulation [14, 15, 16], and for bisoprolol fumarate and amlodipine besylate in tablets [17]. Also, fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods was developed [18]. The method for the investigation of bisoprolol and impurities is included in European Pharmacopeia 7 [19]. Several papers dealing with HPLC determination of bisoprolol and potential impurities simultaneously were found [20, 21].

This paper would be the first one in which HILIC method is applied for the determination of bisoprolol fumarate and its impurities. Moreover, this is the first paper where robust optimization of the separation of these analytes was carried out.

Experimental

Chemicals

All used reagents were of the analytical grade. The mobile phase and the solvents were prepared from acetonitrile (*Lab Scan*, Lab Scan, Gliwice, Poland), ammonium acetate (*J. T. Backer*, Deventer, The Netherlands), glacial acetic acid (*Zorka Pharma*, Šabac, Serbia), and HPLC grade water (*Simplicity 185*, Millipore, Germany). Bisoprolol and its impurities were of Ph. Eur quality (obtained from *PharmaS*, Belgrade, Serbia).

Standard Solutions

Stock solutions were prepared dissolving the substances in the acetonitrile – aqueous phase (30 mM ammonium acetate, pH 4.5 adjusted by acetic acid) 85:15 v/v, in order to obtain the concentration of $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ for bisoprolol fumarate, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ for impurity A and $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ for impurity C.

Mobile Phase

The mobile phase composition was defined as acetonitrile – aqueous phase (with ammonium acetate) where the amount of organic solvent, buffer type and pH of the aqueous phase were varied according to Box-Behnken experimental plan.

Chromatographic conditions

The experiments were performed on chromatographic system *Finnigan Surveyor* (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting of HPLC Pump, Autosampler Plus and UV/VIS Plus Detector. *ChromQuest* (Thermo Electron, San Jose Operations, San Jose, CA, USA) was used for data collection. The analytical column was Kinetex HILIC 100Å (100 mm x 4.5 mm, 2.6 μm particle size), (Phenomenex,

Torrance, CA, USA). Flow rate was 1 mL min⁻¹ and column temperature was 30 °C. UV detection was carried out at 254 nm.

Software

Experimental plan is created in DesignExpert 7.0.0. (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Indirect modeling and grid point search optimization were conducted in MATLAB 7.10.0 (Mathworks, Natick, MA, USA).

Results and discussion

Chemometric approach to LC method development leads to the theoretical explanation of chromatographic system behavior. The first benefit of such strategy is the minimal experimental effort. However, the more important benefit is the ability to resolve complex optimization problems which could hardly be achieved by simple *trial and error* procedure [1]. Moreover, it can reveal interactions that can not be seen when OFAT (one-factor-at-a-time) strategy is followed. Accordingly, the robust optimization of the method for the analysis of bisoprolol and its impurities was achieved following the main steps of chemometric strategy: 1) Definition of the objectives of the method; 2) Definition of investigated factors and their levels; 3) Selection of appropriate experimental design; 4) Creation of mathematical models; 5) Identification of optimal conditions.

1) Definition of the objectives of the method

The method development started with the definition of method targets. The maximal separation between all adjacent peaks and the minimal analysis duration are selected as desired goals. Moreover, the located optimum should be robust enough to enable reliable routine application of the method.

2) Definition of investigated factors and their levels

The next phase of the research involved the assessment of the factors that could influence method performances. HILIC system consists of polar stationary phases and mobile phases with high amount of organic solvent (preferably acetonitrile) and small amount of water phase [8, 9]. The most widely applied columns are bare silica columns. The addition of buffers such as ammonium acetate in water phase is highly recommended since it decreases the electrostatic interaction between ionizable analyte and silanol groups at column surface. Therefore, the preliminary investigations of the examined mixture were done using Kinetex HILIC 100 Å (100 mm x 4.5 mm, 2.6 µm particle size) bare silica column and mobile phase consisted of acetonitrile and water phase modified with the addition of ammonium acetate buffer and glacial acetic acid. It is concluded that the mobile phase content strongly influence the retention behavior of the analyzed substances and the following factors are defined as

potentially significant for detailed investigation in the optimization phase: acetonitrile content in the mobile phase, pH value of the water phase and ammonium acetate concentration in the water phase. Factors and their levels are presented in Table I.

Table I Investigated factors and their levels

Tabela I Ispitivani faktori i njihovi nivoi

Factor	Factor level		
x₁ – acetonitrile content in the mobile phase (%)	82 (-1)	85 (0)	88 (+1)
x₂ – pH of the water phase	3.5 (-1)	4.5 (0)	5.5(+1)
x₃ – ammonium acetate concentration in water phase (mM)	20 (-1)	30 (0)	40 (+1)

*coded factor levels are presented in brackets

It is decided to evaluate the part of experimental space where acetonitrile content is in the range from 82 % to 88 %. The lower organic solvent amount led to the non-retention behavior, while the elution time for the content over 88 % was extremely long. pH range between 3.5 and 5.5 was acceptable for this column type and it was indicated that the adequate separation of the investigated substances within this range could be found. Ammonium acetate content between 20 mM and 40 mM provided sufficient interaction with stationary phase. In this stage of the research it was decided that column type, column temperature, mobile phase flow rate and wavelength of detection will be kept on constant level during the optimization procedure.

3) Selection of the appropriate experimental design

The LC method optimization by chemometric approach requires the application of response surface designs. These designs enable the investigation of each factor on minimum three levels providing the creation of quadratic dependence of the responses on the selected factors. The most commonly applied designs of this type are central composite design, Box-Behnken design, Doehlert design etc [1]. In this separation problem Box-Behnken design was selected for the creation of experimental plan that is presented in Table II.

Table II Experimental plan according to Box-Behnken experimental design**Tabela II** Plan eksperimenta prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu

Number of experiment	x₁	x₂	x₃
1	82	3.5	30
2	88	3.5	30
3	82	5.5	30
4	88	5.5	30
5	82	4.5	20
6	88	4.5	20
7	82	4.5	40
8	88	4.5	40
9	85	3.5	20
10	85	5.5	20
11	85	3.5	40
12	85	5.5	40
13	85	4.5	30
14	85	4.5	30
15	85	4.5	30

*x₁ – acetonitrile content (%) in the mobile phase; x₂ – pH of the water phase;x₃ – ammonium acetate concentration (mM) in the water phase

Box-Behnken design requires lower number of experiments than central composite design and it is suitable for experimental problems where extreme factor combinations are undesirable. Doehlert design enables the estimation of some factors on more than three levels, however, in presented study this feature was not of interest.

The experiments are performed randomly and in each run retention times of the beginning, apex and the end of each peak are recorded.

4) Creation of mathematical models

There is a great number of chromatographic responses that are relevant for the understanding of systems behavior. By applying Box-Behnken and other response surface designs the following relationship between factors and responses can be obtained:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^N b_i X_i + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N b_{ij} X_{ij}$$

where Y is the response; b_0 , b_i , b_{ij} , b_{ii} correspond to the intercept, linear, interaction and quadratic term coefficients, respectively.

However, in modern literature the direct mathematical modeling is not recommended for all outputs [22]. There is a great probability that quadratic function will fail to describe complex responses (such as resolution factor) accurately. On the other hand, the modeling of simple responses such as retention times and retention factors is straightforward and there is a greater probability that second order polynomial model will satisfactorily explain its behavior. Therefore, in this paper the direct modeling is performed for the retention factors of investigated substances in order to examine their chromatographic behavior but also for the retention times of the beginning and the end of each peak since these two retention times will be used for *a posteriori* calculation of separation criterion. The obtained models and statistical parameters are presented in Table III.

Table III The obtained mathematical models for the investigated responses

Tabela III Dobijeni matematički modeli za ispitivane odgovore

	Bt _b	Bk _a	Bt _e	Ct _b	Ck _a	Ct _e	At _b	Ak _a	At _e
b₀	3.24	2.87	3.56	3.92	3.61	4.18	4.44	4.25	4.74
b₁	1.09	1.27	1.19	1.40	1.63	1.45	1.69	1.99	1.78
b₂	0.54	0.69	0.64	0.78	0.93	0.93	0.99	1.18	1.11
b₃	-0.46	-0.51	-0.46	-0.53	-0.60	-0.60	-0.55	-0.65	-0.57
b₁₂	0.13	0.14	0.14	0.16	0.16	0.11	0.24	0.28	0.28
b₁₃	-0.17	-0.24	-0.23	-0.23	-0.30	-0.26	-0.26	-0.32	-0.30
b₂₃	-0.19	-0.25	-0.23	-0.30	-0.31	-0.36	-0.32	-0.37	-0.30
b₁₁	0.29	0.38	0.36	0.37	0.47	0.44	0.52	0.61	0.53
b₂₂	0.11	0.19	0.16	0.16	0.21	0.28	0.24	0.29	0.32
b₃₃	0.02	0.02	0.01	0.03	0.04	0.05	0.03	0.03	0.05
R²	0.999	0.998	0.998	0.998	0.997	0.998	0.999	0.998	0.998
Adj. R²	0.997	0.995	0.996	0.994	0.992	0.993	0.996	0.995	0.995
Pred. R²	0.989	0.979	0.984	0.970	0.962	0.968	0.980	0.980	0.981
Lack of fit (p-value)	0.573	0.458	0.552	0.332	0.283	0.339	0.318	0.408	0.462

* b_0 - b_{33} – the model coefficients; Bt_b , Bt_e – the retention time of the beginning and the end of bisoprolol peak; Ct_b , Ct_e – the retention time of the beginning and the end of impurity C peak; At_b , At_e – the retention time of the beginning and the end of impurity A peak; Bk_a , Ck_a , Ak_a – retention factor of bisoprolol, impurity C and impurity A, respectively; R^2 – coefficient of determination, Adj. R^2 – Adjusted coefficient of determination, Pred. R^2 – Predicted coefficient of determination

The obtained values of coefficient of determination (R^2), adjusted coefficient of determination (Adj. R^2) and predicted coefficient of determination (Pred. R^2) indicate that models succeeded in describing the analyzed responses with high statistical reliability. Moreover, p-values obtained for lack of fit test are all grated than 0.05 suggesting that there was no significant lack of fit.

Analyzing the results obtained in Table III the conclusions about retention behavior of the investigated analytes can be drawn. As it is already wide known, the retention of the different types of compounds in HILIC can be driven by various processes in the retention mechanism (eg. partition, adsorption and/or electrostatic interactions). The involvement of each process in the overall HILIC retention mechanism depends on three groups of factors [8]: 1) surface characteristics of the stationary phase; 2) structural properties of the analyzed compounds and 3) mobile phase composition.

The created second-order polynomial models for each analyte were not only useful in the prediction of their retention within the examined experimental space, but they also enabled in-depth description of their retention behavior in the given HILIC system. Namely, on the basis of the absolute values and the signs of the coefficients of the obtained models the influence of all the examined factors of the mobile phase, as well as their interactions, on the analytes' retention could be determined. Furthermore, this approach also provided an insight into HILIC retention mechanism controlling the retention of bisoprolol and its impurities.

Regarding the coefficients of the obtained quadratic models presented in Table III thorough description of the influence of mobile phase factors on the retention behavior of the analyzed compounds is given below. The absolute value of the coefficient characterizes the magnitude of the effect, whereas the sign of the coefficient shows whether the increase of the factor value increases ("+" sign) or decreases ("–" sign) the retention. Since the coefficients that were statistically significant ($p < 0.05$) entered the final retention models, only they were taken into account while considering the factor influences. On the basis of the coefficients b_1 , b_2 and b_3 influences of acetonitrile content in the mobile phase, pH of the water phase and concentration of ammonium acetate in the water phase on the analytes' retention were estimated, respectively.

Comparing the absolute values of these coefficients in all the models it can be deduced that acetonitrile content in the mobile phase exhibited the strongest influence on the retention of all the compounds, pH of the water phase showed weaker influence, whereas ammonium acetate concentration in the water phase weakest influence. Positive sign of b_1 coefficients implies that the increase of acetonitrile content in the mobile phase led to the increasing of the analytes' retention. This behavior is expected, since less polar mobile phases in HILIC systems have lower elution strength, thereby extending the retention time of polar analytes. In the current research bare silica column was utilized. According to the findings in the literature the surface of this type of HILIC columns is mainly negatively charged when pH of the mobile phase is greater than 4.0 due to the presence of free silanol groups ($pK_a \approx 4.0$) [9]. Therefore, in the examined range of the pH of the mobile phase (3.5 – 5.5), the number of the ionized silanol groups will increase with the increasing pH of the mobile phase. Bisoprolol and its impurities possess secondary amino group in their structures. These groups are strongly basic, thus, it is expected that they will be in their protonated form within the examined pH range of the mobile phase. Provided that direct electrostatic interaction between the oppositely charged groups between these analytes and column surface exist, it can be expected that their retention will increase with the increasing pH of the mobile phase as a consequence of the increased influence of the ion-exchange process in the retention mechanism. Positive sign of b_2 coefficients evidences the increase of the analytes' retention with the increasing pH of the water phase, therefore the existence of ion-exchange process in the retention mechanism was confirmed. Regarding that on the basis of the structural properties of the analyzed compounds and surface characteristics of a silica column this process was expected to be involved in the retention mechanism, buffer salt (ammonium acetate) was also the part of a mobile phase. The aim was to decrease the strong influence of electrostatic forces between the analytes by neutralizing the charge on the column surface and preventing excess retention accordingly. Negative sign of b_3 coefficients in created models shows that the increase of the concentration of ammonium acetate in the water phase led to weaker retention. Thus, previously suggested retention mechanism was confirmed. Furthermore, statistically significant b_1^2 and b_2^2 coefficients in the established models suggest nonlinear dependence of the analytes' retention on acetonitrile content in the mobile phase and pH of the water phase, respectively.

The assessment of the simultaneous influence of the examined factors on the analytes' retention behavior was based on interaction coefficients b_{12} , b_{13} and b_{23} . In order to facilitate the visualization of factor interactions 3D response surface plots are presented in Figure 2.

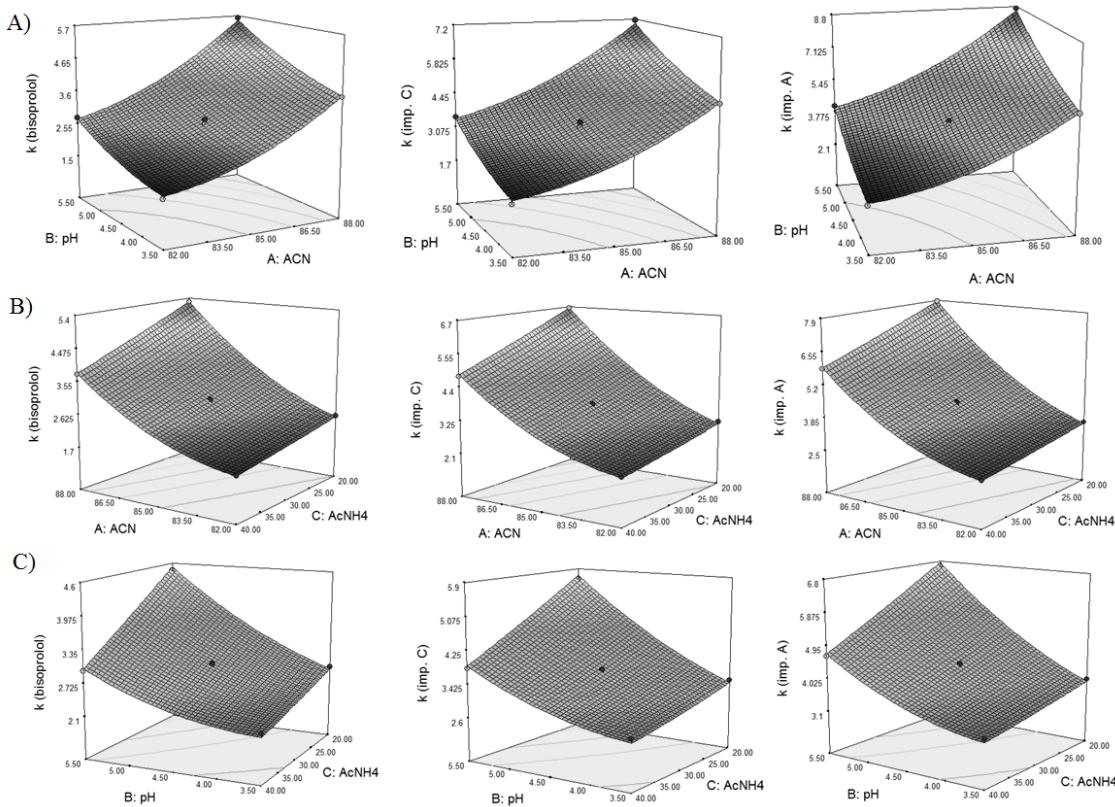


Figure 2. 3D response surfaces obtained for retention factors of the investigated substances presenting their dependence on A) acetonitrile content (ACN) and pH of the water phase (pH); B) acetonitrile content and ammonium acetate concentration in water phase (AcNH₄); C) pH of the water phase and ammonium acetate concentration in water phase

Slika 2. 3D površine odgovora dobijene za retencione faktore ispitivanih supstanci koje predstavljaju njihovu zavisnost od A) sadržaja acetonitrilau mobilnoj fazi (ACN) i pH vrednosti vodene faze (pH); B) sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi (AcNH₄); C) pH vrednosti vodene faze i koncentracije amonijum-acetata u vodenoj fazi

Positive sign of b_{12} coefficients implies that simultaneous increase of acetonitrile content in the mobile phase and pH of the water phase enhances the retention (Figure 2A). On the other hand, negative sign of b_{13} and b_{23} coefficients evidence that the simultaneous increase of acetonitrile content in the mobile phase and decrease of ammonium acetate in the water phase (Figure 2B), as well as increase of pH of the water phase and decrease of concentration of ammonium acetate in the water phase (Figure 2C), respectively, tend to prolong the retention.

5) Identification of optimal conditions

The optimization goal for the investigated system was robust and adequate separation within minimal analysis duration. The quality of separation of adjacent peak pairs was measured by separation criterion s which is equal to the difference between the retention time of the beginning of the second peak and the retention time of the end of the first peak [23]. The value of S criterion that is greater than 0 indicates that the complete baseline separation of the peak pair is achieved. S criterion has advantages comparing to the other traditionally applied separation criteria such as selectivity factor or resolution factor. Namely, the optimal value of both selectivity and resolution factors are influenced by the peak widths and the analyst should decide which value of these factors is high enough for complete separation. On the other hand, S criterion is not influenced by the peak width and therefore the adequate value of the criterion is not arbitrary.

Accordingly, in this optimization problem the achievement of S values greater than 0 for all adjacent peak pairs was set as prior goal. Additionally, during the experimental procedure the interfering peak of fumaric acid appeared. Thus, the separation of this peak from the analyzed substances was considered as well. The secondary optimization goal was the achievement of the minimal analysis duration which was measured as the retention time of the end of the last eluting peak.

Grid point search methodology was applied for the identification of optimal conditions. The experimental space was divided with a grid containing 7 levels for acetonitrile content in the mobile phase (the increment of 1 %), 11 levels for pH of the water phase (the increment of 0.2 pH units) and 5 levels for buffer concentration in the water phase (the increment of 5 mM). The theoretical values of separation criterions and analysis duration are calculated in defined 385 grid points. The optimization procedure intended to locate the point where all S criteria are greater than 0 and where the total analysis duration is less than 10 minutes. However, the accuracy of theoretical investigation of the experimental space is completely dependent on the adequacy of created mathematical models. Therefore, the incertitude originating from the models leads to the uncertainty in accurate location of optimal point. If the uncertainty of mathematical model is not considered, there is no guarantee that the s criterion will achieve calculated value with high probability [5, 6, 22]. In this study the problem of responses uncertainty was overcome by creation of oversized chromatograms [5]. The uncertainties in retention time associated with the predictions achieved with the retention model are presented as an extra band broadening for each chromatographic peak corresponding to the value of standard deviation. After the peaks enlargement, for each of 385 points the new values for the beginning and the end of each peak are calculated and S values and total analysis duration are estimated. Applying the robust optimization strategy, there is a probability of 95 % that the newly obtained responses

will be accurate. The optimal point having the satisfactory value for all targets is defined with the following values of examined factors: acetonitrile content 85 %; pH value of the water phase 4.9 and ammonium acetate concentration 35 mM.

In the final stage of the research, additional source of the optimum instability – the one originating from the adjustment of factors values during the routine experimental procedure – is assessed. The theoretical robustness testing is performed applying 2^3 full factorial design. The same three factors included in optimization phase are investigated; however, the factors levels are narrowed down according to the expected experimental variation. The experimental plan is presented in Table IV.

Table IV The experimental plan for the robustness study

Tabela IV Eksperimentalni plan za testiranje robusnosti

Number of experiment	ACN	pH	AcNH ₄	s ₁	s ₂	s ₃
1	84	4.8	33	0.280	0.228	2.662
2	86	4.8	33	0.310	0.212	1.855
3	84	5.0	33	0.332	0.212	1.560
4	86	5.0	33	0.477	0.411	5.198
5	84	4.8	37	0.451	0.439	6.464
6	86	4.8	37	0.423	0.409	6.511
7	84	5.0	37	0.297	0.232	2.425
8	86	5.0	37	0.441	0.430	6.534

*ACN – acetonitrile content in the mobile phase (%); pH – pH of the water phase; AcNH₄ – ammonium acetate concentration in the water phase (mM); s₁ – separation criterion for bisoprolol and impurity A; s₂ – separation criterion for impurity A and impurity C; s₃ – separation criterion for impurity C and fumaric acid

The obtained values for all separation criteria S are presented in Table IV, as well. Analyzing the obtained values it can be concluded that the defined optimal point will preserve the desired quality even if the slight deviation of examined factors occurs. Unlike the traditionally single factor at the time robustness testing where the response is exposed to the variation of one factor, the experimental design approach examine the response behavior when several (and all) factors deviate at the same time. The other strategy corresponds more to what can be expected in the practice and therefore the obtained results indicate higher assurance of optimum quality.

Finally, the experimental chromatographic verification (Figure 3) confirmed that the applied robust optimization succeeded to identify reliable optimum.

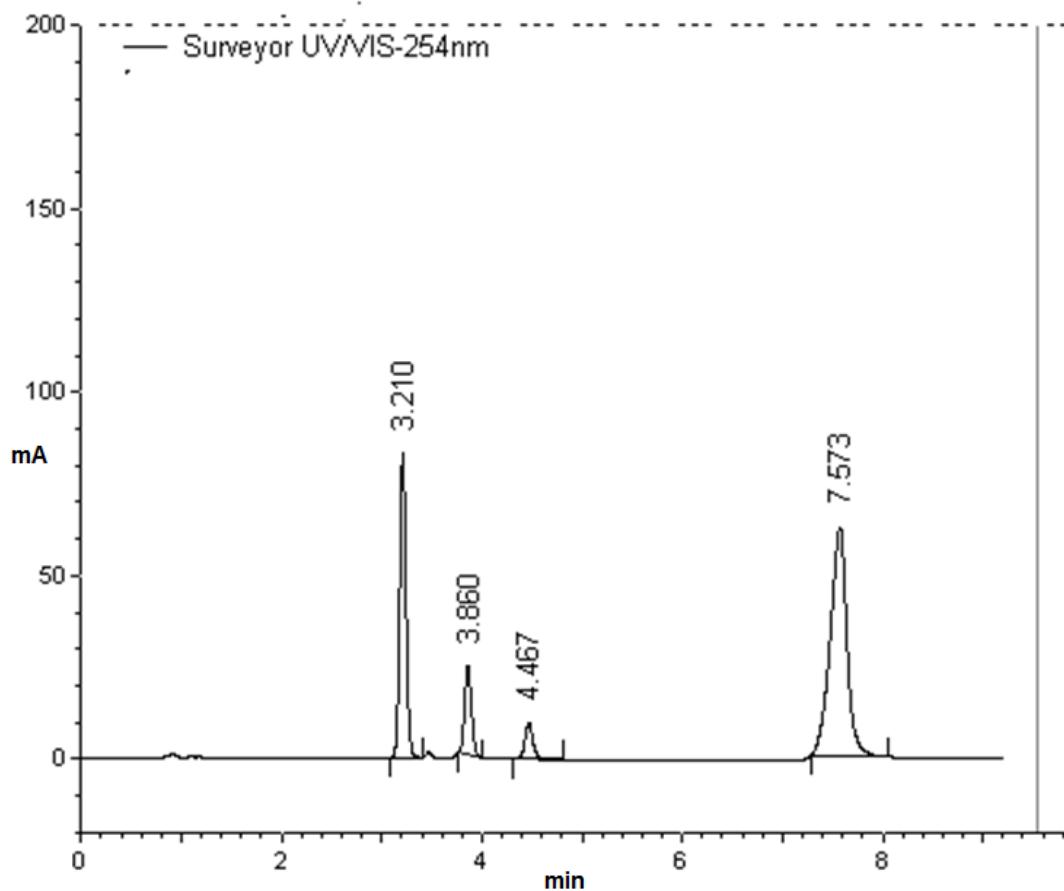


Figure 3. The experimentally obtained chromatogram under the optimal conditions: chromatographic column Kinetex HILIC 100Å (100 mm x 4.5 mm, 2.6 µm particle size); mobile phase composed of acetonitrile – water phase (35 mM ammonium acetate, pH 4.9 adjusted with glacial acetic acid) (85:15v/v); flow rate 1 mL min⁻¹, column temperature 30 °C and UV detection at 254 nm; elution order of substances: bisoprolol (tr = 3.210 min); impurity C (tr = 3.860 min); impurity A (tr = 4.467 min); fumaric acid (tr = 7.573 min)

Slika 3. Eksperimentalno dobijeni hromatogram pod optimalnim uslovima: hromatografska kolona Kinetex HILIC 100Å (100 mm x 4,5 mm, veličina čestica 2,6 µm); mobilna faza: acetonitril – vodena faza (35 mM amonijum-acetat, pH podešen na 4,9 glacijalnom sirćetnom kiselinom) (85:15 v/v); protok mobilne faze 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 30 °C, UV detekcija na 254 nm; redosled eluiranja supstanci: bisoprolol (tr = 3,210 min); nečistoća C (tr = 3,860 min); nečistoća A (tr = 4,467 min); fumarna kiselina (tr = 7,573 min)

Conclusion

This paper presented step by step application of chemometric approach in robust optimization of HILIC method for separation of bisoprolol and its impurities. The theoretical models describing the retention behavior of the analyzed substances are established and their statistical adequacy is confirmed. Models are successfully applied for experimental space navigation and identification of optimal points in terms of satisfactory separation quality and analysis duration. The optimum proved to be robust enough in terms of two sources of potential incertitude: the one originating from the uncertainty in mathematical model and the other originating from the variability in adjustment of process parameters.

Acknowledgements The authors thank the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia for supporting these investigations in Project 172052.

References

1. Cela R, Ordonez EY, Quintana JB, Rodil R. Chemometric-assisted method development in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2013;1287:2–22.
2. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q8 (R2): Pharmaceutical Development, ICH, Geneva, Switzerland, 2009.
3. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q9 : Quality Risk Management, ICH, Geneva, Switzerland, 2005.
4. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q10: Pharmaceutical quality System, ICH, Geneva, Switzerland, 2008.
5. Vivo-Truyols G, Concha-Herrera V, Torres-LapasioJR, Garcia-Alvarez-Coque MC.Robust interpretive optimisation in high-performance liquid chromatography considering uncertainties in peak position. *J Chromatogr A*. 2005;1096:123–32.
6. Rozet E, Lebrun P, Debrus B, Boulanger P, Hubert Ph.Design Space for analytical methods. *TRAC-Trend Anal Chem*. 2013; 42:157–67.
7. Orlandini S, Pinzauti S, Furulanetto S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods.*Anal Bioanal Chem*. 2013; 405:443–50.
8. JanderaP. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal Chim Acta*. 2011;692: 1–25.
9. Greco G,Letzel T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *JChromatogr Sci*. 2013; 51:684–93.

10. Ulu ST, Kel E. Spectrophotometric determination of bisoprolol in pharmaceutical preparations by charge transfer reactions. *Opt Spektrosk.* 2012;112:864–7.
11. Kumbhar ST, Shinde PP, Shinde DB, Solankar PB. Visible spectrophotometric method for estimation of bisoprolol from its bulk and tablet formulation. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013; 6:103–5.
12. Arjun G, Sathis KD, Bindu MB, Naga MM, Ramalingam R, RavinderNath A. A simple HPLC method for quantitation of bisoprolol fumarate in tablet dosage form. *Indian Drugs.* 2009;46:39–42.
13. Yadav SS, Rao JR. Simultaneous HPTLC analysis of bisoprolol fumarate and hydrochlorthiazide in pharmaceutical dosage form. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013;5:286–90.
14. Joshi SJ, Karbhari PA, Bhoir SI, Bindu KS, Das C. RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;52:362–71.
15. Shaikh S, Thusleem OA., Muneera MS, Akmal J, Kondaguli AV, Ruckmani K. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in a tablet dosage form. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(3):1055-7.
16. Patel LJ, Suhagia BN, Shah PB, Shah RR. Simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet dosage form by RP-HPLC method. *Indian J Pharm Sci.* 2006;68:635-8
17. Vora D, Kadav A. Development and validation of a simultaneous HPLC method for estimation of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate from tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70:542–6.
18. Bozal B, Gumustas M, Dogan-Topal B, Uslu B, Ozkan SA. Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. *J AOAC International.* 2013; 96:42-51.
19. European Pharmacopoeia, 7th edition, 2011, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, Strasbourg.
20. Agapova NN, Vasileva E. High-performance liquid chromatographic method for the determination of bisoprolol and potential impurities. *J Chromatogr.* 1993; 654:299–302.
21. Szalka M, Kostka J, Rokaszewski E, Kacymarski K. Analysis of related substances in bisoprolol fumarate on sub-2-μm adsorbents. *Acta Chromatogr.* 2012;24:163–83.
22. Lebrun P, Govaerts B, Debrus B, Ceccato A, Caliaro G, Hubert P, Boulanger B. Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods. *Chemometr Intell Lab Syst.* 2008;9:4–16.
23. Debrus B, Lebrun P, MbinzeKindenge J, Lecomte F, Ceccato A, Caliaro G, MavarTayeyMbaya J, Boulanger B, Marini RD, Rozet E, Hubert Ph. Innovative high-performance liquid chromatography method development for the screening of 19 antimalarial drugs based on a generic approach, using design of experiments, independent component analysis and design space. *J Chromatogr A.* 2011;1218:5205–15.

Optimizacija HILIC metode za analizu bisoprolola i njegovih nečistoća uz procenu mogućnosti variranja položaja pikova

**Tijana Rakić^{1*}, Marko Jovanović¹, Anja Tumpa¹,
Biljana Jančić-Stojanović¹, Mirjana Medenica²**

¹ Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za fizičku hemiju i
instrumentalne metode, Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

U ovom radu prikazana je optimizacija metode tečne hromatografije hidrofilnih interakcija za analizu bisoprolola i njegovih nečistoća A i C uz procenu mogućnosti variranja položaja pikova. Primjenjena je hemometrijska strategija za detaljno razumevanje ponašanja sistema i uspostavljanje matematičke veze između ispitivanih faktora (sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, pH vrednost vodene faze i koncentracija pufera u vodenoj fazi) i hromatografskih odgovora.

Enumerativna tehnika optimizacije upotrebljena je za identifikaciju tačke koja pokazuje zadovoljavajući kvalitet razdvajanja svih ispitivanih supstanci i minimalno vreme trajanja analize. Kreirani su prošireni hromatogrami širenjem pikova svih ispitivanih supstanci za vrednosti standardne devijacije kako bi se procenila mogućnost greške odgovora koja potiče iz greške matematičkog modela. Mogućnost greške koja potiče iz greške u podešavanju eksperimentalnih parametara procenjena je simuliranim testiranjem robusnosti primenom eksperimentalnog dizajna. Konačno, dobijeni optimalni uslovi bili su: hromatografska kolona Kinetex HILIC 100Å (100 mm x 4,5 mm, 2,6 µm veličina čestica); mobilna faza sastavljena od smeše acetonitril – vodena faza (35 mM amonijum-acetat, pH 4,9 podešen glacijalnom sirćetnom kiselinom) (85:15 v/v); protok 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 30 °C i UV detekcija na 254 nm.

Ključne reči: robusnost, HILIC, bisoprolol, nečistoće

Razvoj hromatografskih metoda za analizu sulfametoksazola, trimetoprima, njihovih degradacionih proizvoda i konzervanasa u sirupu

Ivana Perović¹, Andelija Malenović^{2*}, Ana Vemić², Nađa Kostić²,
Darko Ivanović²

¹ Galenika a.d., Batajnički drum bb, 11080 Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

*Autor za prepisku: andja@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

U ovom radu prikazano je definisanje eksperimentalnih uslova i optimizacija metoda reverzno-fazne tečne hromatografije (RP-HPLC) za određivanje sulfametoksazola, trimetoprima i konzervanasa, odnosno degradacionih proizvoda sulfametoksazola i trimetoprima u sirupu. Određivanje sadržaja aktivnih komponenti i konzervanasa vršeno je na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, protok mobilne faze bio je 1,5 mL min⁻¹, dok je detekcija vršena na 235 nm za aktivne komponente i 254 nm za konzervanse. Mobilna faza A sastojala se od smeše 150 mL acetonitrila, 850 mL vode i 1 mL trietanolamina (pH 5,9 podešen razblaženom sirćetnom kiselinom), a kao mobilna faza B korišćen je acetonitril. Odnos mobilnih faza tokom analize definisan je programom gradijenta. Određivanje sadržaja degradacionih proizvoda vršeno je na koloni Zorbax Eclipse Plus-C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica, uz protok mobilne faze od 0,5 mL min⁻¹ i detekciju na 210 nm za 3,4,5-trimetoksibenzojevu kiselinu i 254 nm za sulfanilnu kiselinu i sulfanilamid. Mobilna faza A bila je 50 mM kalijum-dihidrogenfosfat (pH 5,60 podešen sa 0,5 mol L⁻¹ kalijum-hidroksidom), a mobilna faza B bio je acetonitril. Odnos mobilnih faza tokom analize definisan je programom gradijenta. Validacijom postavljenih metoda potvrđeno je da su efikasne i pouzdane, i kao takve pogodne za rutinsku kontrolu.

Ključne reči: Sulfametoksazol, trimetoprim, konzervansi, degradacioni proizvodi, reverzno-fazna tečna hromatografija

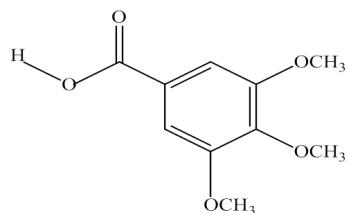
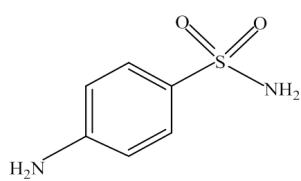
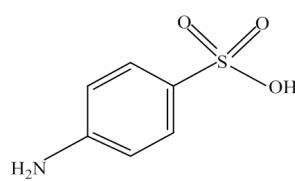
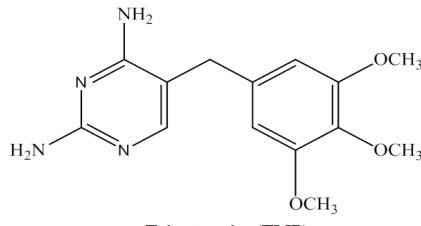
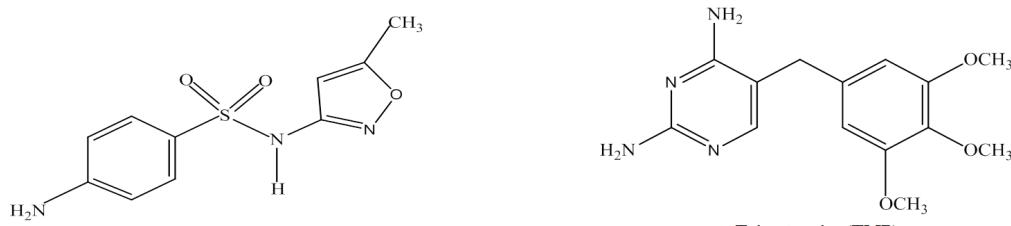
Uvod

Siripi su vodeni preparati slatkog ukusa i viskozne konzistencije. Mogu da sadrže saharozu u koncentraciji od najmanje 45 % m/m. Sladak ukus se može postići i upotrebom drugih poliola ili zasladičića. Siripi obično sadrže korigense ukusa i mirisa. [1]. Za adekvatnu kontrolu kvaliteta ovih farmaceutskih doziranih oblika, pored određivanja sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa, potrebno je pratiti i sadržaj nečistoća. Nečistoće predstavljaju sve neželjene supstance koje mogu biti prisutne u farmaceutskoj supstanci ili farmaceutskom obliku. Njihovo prisustvo, čak i u malim količinama može uticati na efikasnost i bezbednost, jer mogu izazvati neželjene i/ili toksične efekte. Nečistoće mogu da potiču iz postupka sinteze farmaceutske supstance ili da nastanu kao degradacioni proizvodi tokom roka upotrebe farmaceutske supstance, odnosno farmaceutskog oblika. Iz tog razloga je poznavanje porekla, postupaka kontrole i analize nečistoća od presudnog značaja za proizvodnju farmaceutskih supstanci i farmaceutskih doziranih oblika odgovarajućeg kvaliteta.

U ovom radu prikazan je razvoj RP-HPLC metode za određivanje sulfametoksazola (SMX), trimetoprima (TMP), zatim konzervanasa metilparahidroksibenzoata (MP) i propilparahidroksibenzoata (PP), kao i RP-HPLC metode za određivanje nečistoća sulfanilne kiseline (SK), sulfanilamida (SA) i 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline (TBK). Hemijske strukture analiziranih supstanci prikazane su na Slici 1.

U BP 2012 date su monografije *Co – trimoxazole Oral Suspension* i *Paediatric Co – trimoxazole Oral Suspension* u kojima se za određivanje sadržaja TMP i SMX primenjuje UV spektrofotometrijska metoda [2]. S druge strane u USP 35 u monografiji *Sulfamethoxazole and Trimethoprim Oral Suspension* se za određivanje sadržaja SMX i TMP primenjuje RP-HPLC metoda, a za određivanje degradacionih proizvoda primenjuje se TLC (eng. *Thin Layer Chromatography* – TLC) metoda [3]. Pregledom literature utvrđeno je da je za određivanje SMX i TMP u različitim farmaceutskim oblicima primenjivana RP-HPLC metoda [4–6], kao i za istovremeno određivanje SMX i TMP, MP i PP u suspenziji [7]. Za određivanje degradacionih proizvoda TMP u aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskim oblicima razvijene su RP-HPLC metode sa UV i MS (eng. *Mass Spectrometry* – MS) detekcijom [8–10].

Kako je pregledom literature utvrđeno da do sada nisu opisane metode za istovremeno određivanje ispitivanih komponenti u sirupu, cilj ovog rada bio je razvijanje RP-HPLC metoda pogodnih za određivanje SMX i TMP, MP i PP, kao i degradacionih proizvoda sulfametoksazola (SK i SA) i trimetoprima (TMK).



Slika 1. Hemiske strukture sulfametoksazola (SMX), trimetoprima (TMP), sulfanilne kiseline (SK) i sulfanilamida (SA)

Figure 1. Chemical structures of sulfametoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), sulphаниlic acid (SK) and sulphanilamide (SA)

Eksperimentalni deo

Hromatografski sistem. Analiza je vršena na hromatografskom sistemu *Agilent 1290 Infinity*, koji se sastoji od binarne pumpe, termostata za kolonu, autosamplera, sistema za uklanjanje rastvorenog vazduha u mobilnoj fazi i *diode array* detektora. Za prijem i obradu podataka korišćen je *Easy Chrom* softver.

Ostala oprema. Sistem za filtriranje (Core Palmer, USA), analitička vaga (Sartorius ME235P – OCE, Nemačka), pH metar (Metrohm 827 pH lab, Švajcarska), ultrazvučno kupatilo (MRC Ultrasonic cleaner, Izrael) i centrifuga (Rotofix 32, Hettich, Nemačka).

Reagensi. Za hromatografsku analizu korišćen je acetonitril (HPLC gradient grade, J. T. Baker, Holandija), trietanolamin (> 99 %, Sigma, USA), glacijalna sirćetna kiselina (p.a., J. T. Baker, Holandija), kalijum-hidroksid (Merck, Nemačka), kalijum-dihidrogenfosfat (Merck, Nemačka) i voda HPLC kvaliteta dobijena sistemom Purelab Prima (Elga, Engleska).

Standardi. Rastvor standarda za hromatografsku analizu pripremani su od radnih standarda SMX, MP i PP (Galenika a.d., Srbija), TMP radnog standarda (Roche, Švajcarska), kao i referentnih standarda SK, SA i TBK (Roche, Švajcarska).

Farmaceutski dozirani oblik Bactrim® (200 mg sulfametoksazola + 40 mg trimetoprima)/5 mL, sirup, Galenika a.d.

Hromatografski uslovi. *Određivanje sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa* izvršeno je na koloni Zorbax Eclipse XDB – C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica. Mobilna faza A predstavljala je smeš 150 mL acetonitrila, 850 mL vode i 1 mL trietanolamina (pH je podešen na 5,9 razblaženom sirćetnom kiselinom), a mobilna faza B bila je acetonitril. Primenjen je program gradijenta B %/t: 5 %/0; 40 %/7; 40 %/8,5; 5 %/10. Protok mobilne faze bio je 1,5 mL min⁻¹, temperatura kolone 40 °C, volumen injektovanja 2 µL, a talasna dužina detekcije 235 nm za SMX i TMP, odnosno 254 nm za MP i PP. *Određivanje degradacionih proizvoda* izvršeno je na koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica. Mobilna faza A bila je 50 mM kalijum-dihidrogenfosfat (pH podešen na 5,60 sa 0,5 M kalijum-hidroksidom), a mobilna faza B acetonitril. Primenjen je program gradijenta B %/t: 10 %/0; 20 %/5; 50 %/6; 50 %/10; 10 %/10,01; 10 %/15. Protok mobilne faze bio je 0,5 mL min⁻¹, volumen injektovanja 2 µL, temperatura kolone 25 °C, a talasna dužina detekcije 254 nm za SK i SA, odnosno 210 nm za TBK.

Priprema rastvora za određivanje sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa

Rastvarač. Smeš acetonitrila i razblažene sirćetne kiseline (1:100 V/V) (1:3, V/V).

Rastvori standarda. Rastvaranjem odgovarajuće količine standarda u rastvaraču pripremljeni su osnovni rastvori standarda tako da sadrže 0,3 mg mL⁻¹ MP i 0,024 mg mL⁻¹ PP. Odmerene su odgovarajuće količine standarda SMX i TMP, a zatim su dodate odgovarajuće zapremine osnovnih rastvora MP i PP, kako bi se dobio rastvor koji sadrži 0,20 mg mL⁻¹ SMX, 0,040 mg mL⁻¹ TMP, 2,40 µg mL⁻¹ MP i 0,480 µg mL⁻¹ PP.

Rastvori za procenu selektivnosti. Za procenu selektivnosti pripremljen je rastvor *placeba* u koncentraciji koja odgovara sadržaju u sirupu i tretiran je na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Standard koji sadrži 0,20 mg mL⁻¹ SMX, 0,040 mg mL⁻¹ TMP, 2,40 µg mL⁻¹ MP i 0,480 µg mL⁻¹ PP korišćen je za procenu selektivnosti.

Rastvori za procenu linearnosti. Pripremljeni su osnovni rastvori SMX (1,0 mg mL⁻¹), TMP (0,2 mg mL⁻¹), MP (12 µg mL⁻¹) i PP (2,4 µg mL⁻¹). Za konstruisanje kalibracione krive od osnovnih rastvora standarda pripremljeno je pet rastvora koji sadrže od 0,16 mg mL⁻¹ do 0,24 mg mL⁻¹ SMX, od 0,032 mg mL⁻¹ do 0,048 mg mL⁻¹ TMP, od 1,92 µg mL⁻¹ do 2,88 µg mL⁻¹ MP i od 0,384 µg mL⁻¹ do 0,576 µg mL⁻¹ PP.

Rastvori za procenu tačnosti. Pripremljena je smeš *placeba*, SMX, TMP, MP i PP i tretirana na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Po tri rastvora su pripremljena za definisane koncentracije:

- $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$ SMX, $0,032 \text{ mg mL}^{-1}$ TMP, $1,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ MP i $0,384 \mu\text{g mL}^{-1}$ PP (80 % deklarisanog sadržaja);
- $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ SMX, $0,040 \text{ mg mL}^{-1}$ TMP, $2,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ MP i $0,480 \mu\text{g mL}^{-1}$ PP (100% deklarisanog sadržaja);
- $0,24 \text{ mg mL}^{-1}$ SMX, $0,048 \text{ mg mL}^{-1}$ TMP, $2,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ MP i $0,576 \mu\text{g mL}^{-1}$ PP (120 % deklarisanog sadržaja).

Rastvori za procenu preciznosti. Rastvor uzorka sirupa razblažen je rastvaračem, tretiran 10 minuta magnetnom mešalicom, a zatim 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu i na kraju centrifugiran 10 minuta na 4000 obrtaja min^{-1} . Centrifugiran rastvor razblažen je tako da se dobiju rastvori sledećih koncentracija: $0,19 \text{ mg mL}^{-1}$ SMX, $0,038 \text{ mg mL}^{-1}$ TMP, $2,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ MP i $0,480 \mu\text{g mL}^{-1}$ PP.

Rastvori za procenu stabilnosti. Praćena je stabilnost rastvora standarda i uzorka nakon 2 h, 4 h, 8 h, 12 h i 16 h.

Procena robusnosti metode. Variran je po jedan parametar definisanih hromatografskih uslova: kolona, protok mobilne faze, temperatura kolone, pH mobilne faze A i sastav mobilne faze A.

Priprema rastvora za određivanje sadržaja degradacionih proizvoda

Rastvarač. Smeša mobilne faze A i mobilne faze B (90:10, V/V).

Rastvori standarda. Rastvaranjem odgovarajuće količine standarda u rastvaraču pripremljeni su osnovni rastvori standarda tako da sadrže $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ SK, $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ SA i $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$ TBK. Razblaženjem osnovnih rastvora pripremljen je rastvor koncentracije $0,0012 \text{ mg mL}^{-1}$ SK, $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ SA i $0,0004 \text{ mg mL}^{-1}$ TBK.

Rastvori za procenu selektivnosti. Za procenu selektivnosti pripremljen je rastvor *placeba* u koncentraciji koja odgovara sadržaju u sirupu i tretiran je na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Standard koji sadrži $0,0012 \text{ mg mL}^{-1}$ SK, $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ SA i $0,0004 \text{ mg mL}^{-1}$ TBK korišćen je za procenu selektivnosti.

Rastvori za određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije. Rastvarač je injektovan deset puta i izračunata je standardna devijacija odgovora na retencionim vremenima ispitivanih nečistoća ($S_{d_{\text{rastvarača}}}$). Napravljena je serija razblaženja rastvora ispitivanih nečistoća i određena koncentracija analita kojoj odgovara $10 \times S_{d_{\text{rastvarača}}}$ (LOQ), odnosno $3 \times S_{d_{\text{rastvarača}}}$ (LOD). Rastvor LOQ injektovan je šest puta kako bi se potvrdila ponovljivost.

Rastvori za procenu linearnosti. Pripremljeni su osnovni rastvori standarda SK ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), SA ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) i TBK ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Za konstruisanje kalibracione krive od osnovnih rastvora standarda pripremljeno je pet rastvora koji sadrže od $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $1,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,05 \% - 0,36 \%$) SK, od $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,05 \% - 0,60 \%$) SA i od $0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ do $0,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,10 \% - 0,60 \%$) TBK. Opseg za procenu

linearnosti definisan je od LOQ do 120 % u odnosu na specifikacijom datu maksimalno dozvoljenu koncentraciju.

Rastvori za procenu tačnosti. Pripremljena je smeša *placeba*, SK, SA, TBK i tretirana na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Po tri rastvora pripremljena su za definisane koncentracije:

- $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SK, $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SA i $0,08 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (LOQ – limit kvantifikacije);
- $0,60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SK, $1,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SA i $0,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (50 % maksimalno dozvoljene koncentracije);
- $1,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SK, $2,00 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SA i $0,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (100 % maksimalno dozvoljene koncentracije);
- $1,44 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SK, $2,40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ SA i $0,48 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (120 % maksimalno dozvoljene koncentracije)

Rastvori za procenu preciznosti. Rastvor uzorka sirupa razblažen je rastvaračem, tretiran 10 minuta magnetnom mešalicom, zatim 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu i na kraju centrifugiran 10 minuta na 4000 obrtaja min^{-1} . Centrifugiran rastvor razblažen je tako da se dobiju sledeće koncentracije: $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ SMX i $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$ TMP. S obzirom da rastvor uzorka sadrži samo TBK, radi ispitivanja preciznosti rastvor uzorka je opterećen sa 0,3 % SK, 0,5 % SA i 0,5 % TBK.

Rastvori za procenu stabilnosti. Praćena je stabilnost rastvora standarda i uzorka nakon 4 h, 8 h, 12 h i 16 h.

Procena robusnosti metode. Variran je po jedan parametar definisanih hromatografskih uslova i to kolona, protok mobilne faze i pH mobilne faze A.

Rezultati i diskusija

Određivanje sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa

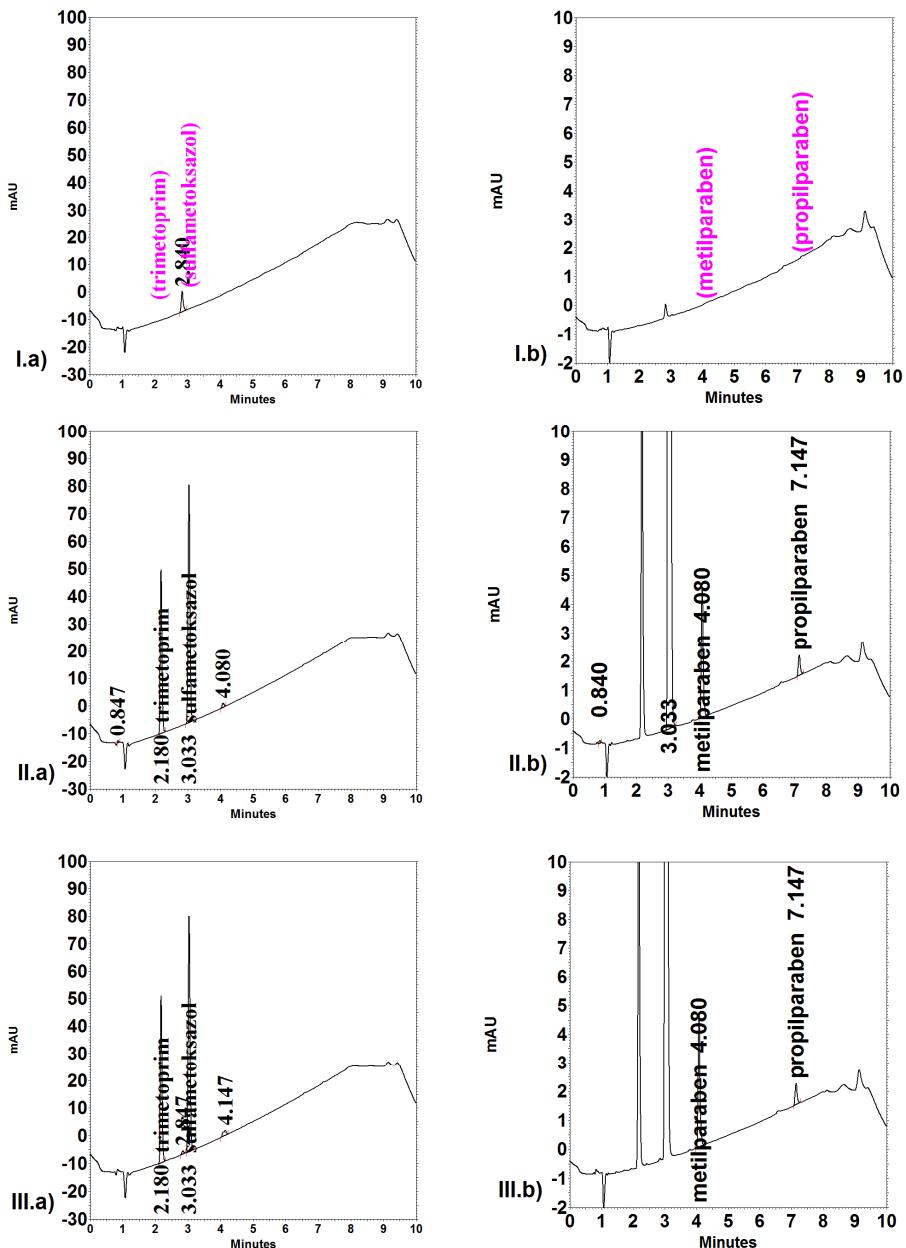
Analizirana jedinjenja (SMX, TMP, MP i PP) značajno se razlikuju po polarnosti tako da je odlučeno da se postavi metoda koja podrazumeva primenu odgovarajućeg gradijenta, jer izokratsko eluiranje ne bi bilo optimalno. Pored toga, analizom hemijske strukture ispitivanih jedinjenja utvrđeno je da prisustvo slobodnih amino grupa SMX i TMP, zbog sekundarnih interakcija sa reverzno-faznom stacionarnom fazom, može dovesti do pojave razvlačenja silaznog dela pika ovih jedinjenja. Kako bi se to eliminisalo, u mobilnu fazu je bilo potrebno dodati trietanolamina kao modifikator koji će sprečiti ove neželjene interakcije. Mobilna faza A bila je smeša 150 mL acetonitrila, 850 mL vode i 1 mL trietanolamina, dok je pH podešen na 5,9 razblaženom glacijalnom sirčetnom kiselinom. Kao mobilna faza B korišćen je acetonitril. Tokom preliminarnih ispitivanja pokazalo se da kritični par predstavljaju pik iz *placeba* i pik SMX.

Odgovarajuće razdvajanje ova dva pika postignuto je sa početnim odnosom mobilnih faza A i B 95 : 5 V/V. Postepenim povećanjem sadržaja acetonitrila (mobilna faza B) od 5 % do 40 % tokom 7 minuta postiže se odgovarajuće razdvajanje svih ispitivanih supstanci. Povećanje sadržaja acetonitrila omogućilo je eluiranje MP i PP, kao lipofilnijih komponenti, do 8 minuta čime je postignuto izuzetno kratko vreme trajanja analize.

Ispitivan je i uticaj stacionarne faze na razdvajanje SMX, TMP, MP i PP. Ispitivanje je sprovedeno na kolonama: Zorbax Eclipse XDB C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica i Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica. Optimalno hromatografsko razdvajanje postignuto je na koloni Zorbax Eclipse XDB C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica, koja je posebno pogodna za razdvajanje baznih jedinjenja. Stacionarna faza XDB (eng. *Extra Densely Bonded*) ima dvostruko blokirane terminalne silanolne grupe čime je postignuto da je veliki je broj slobodnih silanolnih grupa zaštićen, pa su pikovi ispitivanih jedinjenja simetričniji. Na Slici 2. prikazani su hromatogrami rastvora *placeba*, standarda i uzorka na 235 nm i 254 nm.

Na hromatogramu rastvora *placeba* nema pikova čija retenciona vremena odgovaraju retencionim vremenima SMX, TMP, MP i PP, čime je potvrđena selektivnost metode (Slika 2).

Postavljena metoda je zatim validirana kako bi se potvrdilo da je pogodna za određivanje sadržaja SMX, TMP, MP i PP u Bactrim® sirupu. Ispitivani su linearost, tačnost i preciznost, a rezultati su prikazani u Tabeli I i Tabeli II. Dobijeni rezultati u skladu su sa definisanim kriterijumima za prihvatanje rezultata [11]. Pored toga, ispitivana je i stabilnost rastvora i utvrđeno je da su na sobnoj temperaturi rastvor standarda stabilni 16 h, a rastvor uzorka 2 h. Ispitivanjem robusnosti pokazano je da promena serijskog broja kolone, promena brzine protoka, smanjenje pH mobilne faze A i povećanje sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi A ne utiče na tačnost rezultata. Međutim, povećanje temperature kolone dovodi do koeluiranja kritičnog para pikova, pika *placeba* i pika SMX. S druge strane, smanjenje temperature kolone dovodi do koeluiranja pika PP i pika *placeba*. Povećanjem pH vrednosti mobilne faze A dolazi do koeluiranja pika *placeba* i SMX, a smanjenje sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi A negativno utiče na oblik pika PP, a time i na preciznost određivanja. Na osnovu toga može se zaključiti da temperatura kolone mora strogo da se kontroliše, da pH vrednost mobilne faze A ne sme biti veća od 5,9, a sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi A ne sme biti manji od 150 mL. Kao parametri za proveru pogodnosti sistema (eng. *System Suitability Tests – SST*) definisani su faktor rezolucije pika *placeba* i SMX (ne sme biti manji od 1,2), faktor rezolucije pika PP i pika *placeba* (ne sme biti manji od 2) i RSD (eng. *Relative Standard Deviation – RSD*) ponovljenih injektovanja standardnog rastvora PP (ne sme biti veća od 2 %).



Slika 2. Hromatogrami rastvora *placeba* (Ia, Ib); pik iz *placeba* (2,840 min); rastvora standarda (IIa, IIb); TMP (2,180 min), SMX (3,033 min), MP (4,080 min), PP (7,147 min); rastvora uzorka (IIIa, IIIb); a – na 235 nm, b – na 254 nm

Figure 2. Chromatograms of placebo solution (Ia, Ib): peak from placebo (2.840 min); standard solution (IIa, IIb): TMP (2.180 min), SMX (3.033 min), MP (4.080 min), PP (7.147 min); sample solution (IIIa, IIIb), a – at 235 nm, b – at 254 nm

Tabela I Rezultati za procenu linearnosti, tačnosti i preciznosti metode za određivanje sadržaja SMX i TMP

Table I Evaluation of linearity, accuracy and precision for the determination of SMX and TMP

	SMX	TMP
<i>Linearnost</i>		
Koncentracija (mg mL ⁻¹)	0,16–0,24	0,033–0,050
a	$2,1529 \times 10^8$	$7,1823 \times 10^8$
b	454872	134657
r	0,9979	0,9972
<i>Tačnost</i>		
Koncentracija 1 (mg mL ⁻¹)	0,16	0,032
Recovery 1 (%)*	100,96	100,21
Koncentracija 2 (mg mL ⁻¹)	0,20	0,040
Recovery 2 (%)	101,14	99,84
Koncentracija 3 (mg mL ⁻¹)	0,24	0,050
Recovery 3 (%)	101,15	100,08
<i>Preciznost</i>		
Ponovljivost** RSD (%)	0,7	0,9
Srednja preciznost*** RSD (%)	1,4	0,5

a – nagib prave, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacije (> 0,9950)

* 98,00 % – 102,00 %

** RSD < 2,0 %,

*** RSD < 3,0 %

Tabela II Rezultati za procenu linearnosti, tačnosti i preciznost metode za određivanje sadržaja MP i PP

Table II Evaluation of linearity, accuracy and precision for the determination of MP and PP

	MP	PP
<i>Linearost</i>		
Koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,01–3,02	0,40–0,60
a	$1,0185 \times 10^6$	$9,5929 \times 10^5$
b	-57960	-54142
r	0,9980	0,9972
<i>Tačnost</i>		
Koncentracija 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,96	0,39
Recovery 1 (%)*	98,77	100,45
Koncentracija 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,45	0,49
Recovery 2 (%)	101,47	101,41
Koncentracija 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,94	0,59
Recovery 3 (%)	101,45	100,47
<i>Preciznost</i>		
Ponovljivost** RSD (%)	0,9	1,6
Srednja preciznost*** RSD (%)	2,5	0,0

a – nagib prave, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacije ($> 0,995$)

* 98,00 % – 102,00 %

** RSD $< 2,0 \%$,

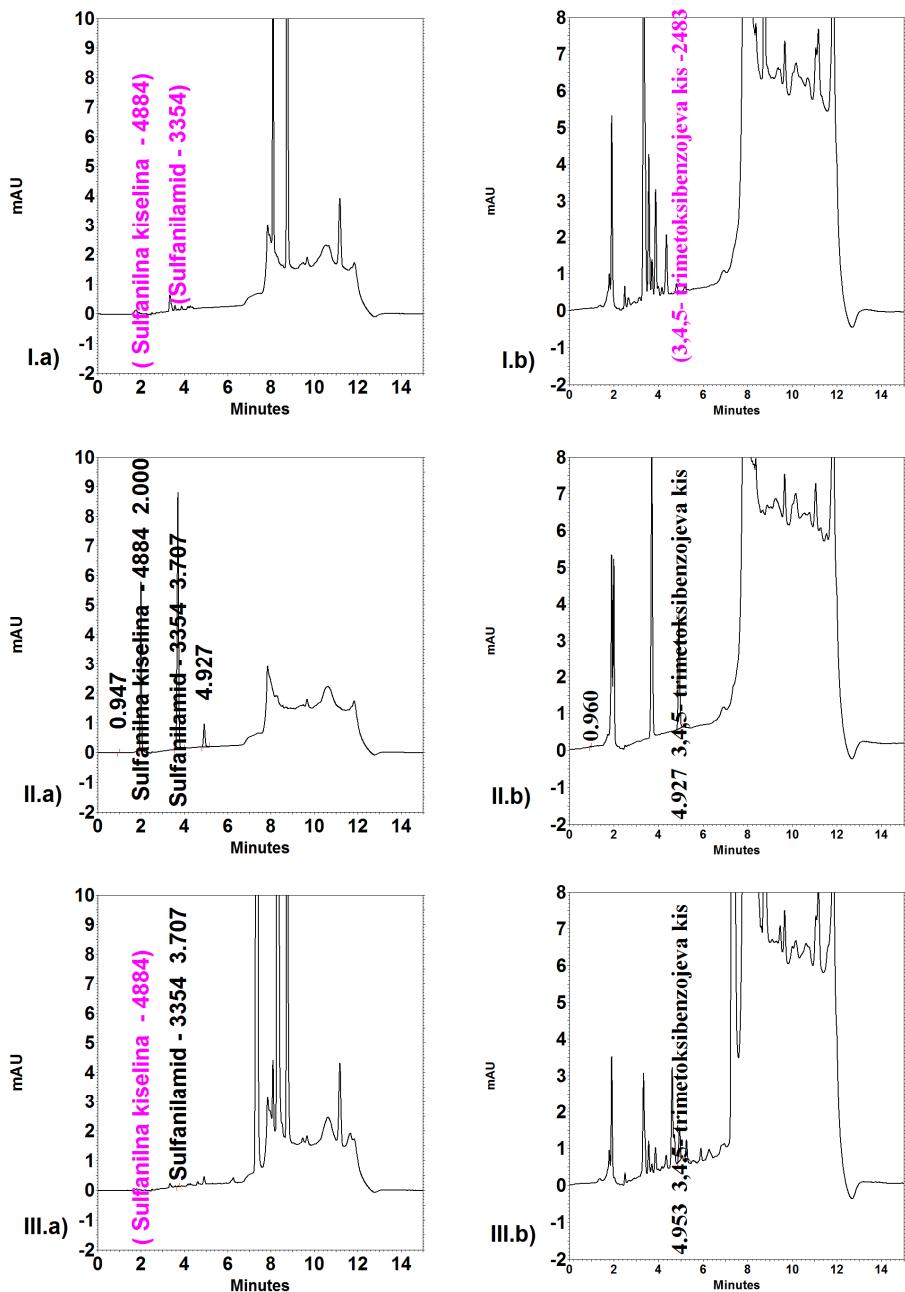
*** RSD $< 3,0 \%$

Određivanje degradacionih proizvoda

Preliminarna ispitivanja za postavljanje metode za određivanje sadržaja degradacionih proizvoda izvršena su na Zorbax Eclipse XDB – C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica i Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica kolonama. Zadovoljavajuće razdvajanje, odgovarajuća rezolucija, odgovarajuće vreme trajanja analize, kao i simetrija piks baznih analita (SK i SA) dobijeni su na koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica. S obzirom da je pH mobilne faze A 5,60, prvo se eluira SK kao polarnija, pa zatim SA i TBK. Početni sastav mobilne faze 90:10 V/V i postepeni porast sadržaja acetonitrila na 20 % u toku prvih 5 minuta neophodan je da bi se postigla odgovarajuća rezolucija između nečistoća. Nakon 5 minuta udeo acetonitrila povećava se na 50 % kako bi se eluirale aktivne komponente i konzervansi. Na Slici 3. prikazani su hromatogrami rastvora *placeba*, standarda i uzorka na 254 nm i 210 nm.

Na hromatogramu rastvora *placeba* nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima SK, SA i TBK, čime je potvrđena selektivnost metode (Slika 3).

Postavljena metoda je zatim validirana kako bi se potvrdilo da je pogodna za određivanje sadržaja SK, SA i TBK u Bactrim® sirupu. Ispitivani su linearost, tačnost i preciznost, a određeni su i limit detekcije i limit kvantifikacije (Tabela III). Limit detekcije i limit kvantifikacije određeni su eksperimentalnim putem. Dobijeni rezultati u skladu su sa definisanim kriterijumima za prihvatanje rezultata [11]. Pored toga, ispitivana je i stabilnost rastvora i utvrđeno je da su na sobnoj temperaturi rastvori standarda i uzorka stabilni 16 h, samo ukoliko se čuvaju zaštićeni od svetlosti. Ispitivanjem robusnosti metode pokazano je da promena kolone različitih serijskih brojeva, smanjenje pH mobilne faze i brzina protoka mobilne faze nemaju uticaja na vrednost sadržaja degradacionih proizvoda. S druge strane, povećanje pH vrednosti mobilne faze ima značajan uticaj, jer dovodi do koeluiranja piks *placeba* sa pikom TMB. Na osnovu toga može se zaključiti da pH mobilne faze A ne sme biti veći od 5,6, a SST parametri definisali su faktor rezolucije piks *placeba* i TMB (ne sme biti manji od 1,2), kao i RSD ponovljenih injektovanja standardnog rastvora nečistoća (ne sme biti veća od 2 %).



Slika 3. Hromatogrami rastvora placebo (Ia, Ib); rastvora standarda nečistoća (IIa, IIb); SK (2,000 min), SA (3,707 min), TBK (4,927 min); rastvora uzorka (IIIa, IIIb); a – na 254 nm, b – 210 nm

Figure 3. Chromatograms of placebo solution (Ia, Ib); standard solution of impurities (IIa, IIb); SK (2.000 min), SA (3.707 min), TBK (4.927 min); sample solution (IIIa, IIIb); a – at 254 nm, b – at 210 nm

Tabela III Rezultati za procenu linearnosti, tačnosti i preciznosti, kao i za limit detekcije i limit kvantifikacije metode za određivanje sadržaja SK, SA i TBK

Table III Evaluation of linearity, accuracy and precision, as well as limit of detection and limit of quantification for the determination of SK, SA and TBK

	SK	SA	TBK
<i>Limit detekcije (µg mL⁻¹)</i>	0,07	0,07	0,03
<i>Limit kvantifikacije (µg mL⁻¹)</i>	0,20	0,20	0,08
<i>Linearost</i>			
Koncentracija (µg mL ⁻¹)	0,20–1,52	0,20–2,40	0,08–0,50
a	$4,7470 \times 10^{-7}$	$4,0141 \times 10^{-7}$	$2,2276 \times 10^{-7}$
b	0,0252	0,0203	-0,0078
r	0,9979	0,9995	0,9986
<i>Tačnost</i>			
Koncentracija 1 (µg mL ⁻¹)	0,20	0,20	0,08
Recovery 1 (%)*	97,16	101,05	89,27
Koncentracija 2 (µg mL ⁻¹)	0,61	1,00	0,20
Recovery 2 (%)	104,19	96,74	91,82
Koncentracija 3 (µg mL ⁻¹)	1,22	2,00	0,41
Recovery 3 (%)	107,81	95,38	96,00
Koncentracija 4 (µg mL ⁻¹)	1,52	2,40	0,50
Recovery 4 (%)	97,21	90,33	89,61
<i>Preciznost</i>			
RSD (%)**	0,7	1,4	1,6

a – nagib prave, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacijske ($> 0,990$)

* 70,00 % – 130,00 %

**RSD < 15,0 %

Zaključak

Za adekvatnu farmaceutsku analizu sulfametoksazola, trimetoprima, metilparahidroksibenzoata, propilparahidroksibenzoata, sulfanilne kiseline, sulfanilamida i 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline u Bactrim® sirupu postavljene su dve RP–HPLC metode sa gradijentnim eluiranjem. Zbog veoma velikih razlika u polarnosti ispitivanih jedinjenja potrebno je postaviti dve RP–HPLC metode za određivanje aktivnih supstanci, njihovih degradacionih proizvoda i konzervanasa. Jednom RP–HPLC metodom može se odrediti sadržaj aktivnih supstanci i konzervanasa, a drugom sadržaj degradacionih proizvoda. Predložene metode su validirane i potvrđeno je da su pogodne za rutinsku kontrolu Bactrim® sirupa. Definisani su parametri za proveru pogodnosti sistema i utvrđeni kritični parametri koji bi mogli dovesti u pitanje pouzdanost rezultata.

Zahvalnica

Ovaj rad realizovan je u okviru naučnog projekta 172052 koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura

1. European Pharmacopoeia 8th edition, Council of Europe, Strasbourg 2014.
2. British Pharmacopoeia, The Pharmaceutical Press, London 2012.
3. The United States Pharmacopoeia 35, United States Pharmacopeia Convention, Rockville 2012.
4. Akay C, Özkan SA. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 30:1207–13.
5. Giegold S, Teutenberg T, Tuerk J, Kiffmeyer T, Wenclawiak B. Determination of sulfonamides and trimethoprim using high temperature HPLC with simultaneous temperature and solvent gradient. *J Sep Sci.* 2008; 31:3497–502.
6. Kulikov AU, Verushkin AG, Loginova LP. Comparison of micellar and reversed-phase liquid chromatography for determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Chromatogr.* 2005; 61:455–63.
7. Epshtain NA. Simultaneous HPLC determinatinon of trimethoprim, sulfamethoxazole and methyl- and propylparaben in suspensions of the co-trimoxazole type. *Pharm Chem J.* 2002; 36:675–9.
8. Barbarin N, Henion JD, Wu Y. Comparison between liquid chromatography–UV detection and liquid chromatography–mass spectrometry for the characterization of impurities and /or degradants present in trimethoprim tablets. *J Chromatogr A.* 2002; 970:141–54.
9. Hess S, Akermann M, Ropte D, Eger K. Rapid and sensitive LC separation of new impurities in trimethoprim. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 25:531–8.
10. Rao RN, Nagaraju V: An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J Pharm Biomed Anal.* 2003; 83:335–77.
11. Crowther JB: Validation of pharmaceutical test methods, in: S. Ahuja, S. Scypinski (Eds.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, New York, 2001;415–43.

Development of chromatographic methods for analysis of sulfamethoxazole, trimethoprim, their degradation products and preservatives in syrup

**Ivana Perović¹, Andelija Malenović^{2*}, Ana Vemić²,
Nada Kostić², Darko Ivanović²**

¹Galenika a.d., Batajnički drum bb, 11080 Belgrade, Serbia

²University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

*Corresponding author: andja@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

In this paper the experimental conditions for optimal reversed-phase liquid chromatographic (RP-HPLC) determination of sulfamethoxazole, trimethoprim and preservatives, as well as degradation products of sulfamethoxazole and trimethoprim in syrup were defined. The determination of active compounds and preservatives was carried out on Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size column, mobile phase flow rate was 1.5 mL min⁻¹, and detection at 235 nm for the active compounds and 254 nm for preservatives. Mobile phase A consisted of 150 mL of acetonitrile, 850 mL of water and 1 mL of triethanolamine (pH 5.90 adjusted with diluted acetic acid), while mobile phase B was acetonitrile. The mobile phase ratio was defined by the gradient program. For the determination of degradation products Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm x 4.6 mm, 3.5 µm particle size column was used, the mobile phase flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and detection at 210 nm for 3,4,5-trimethoxybenzoic acid and 254 nm for sulfanilic acid and sulfanilamide. Mobile phase A was 50 mM potassium dihydrogenphosphate (pH 5.60 adjusted with a 0.5 mol L⁻¹ potassium hydroxide), while mobile phase B was acetonitrile. The mobile phase ratio was defined by the gradient program. Through the validation of the developed methods their efficiency and reliability is confirmed and consequently the adequacy for the routine control.

Key words: sulfamethoxazole, trimethoprim, preservatives, degradation products, reversed-phase liquid chromatography

Plaket-Burman dizajn u proceni robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje sadržaja natrijum-valproata

Slavica Kojić-Marinković¹, Mihaela Tumbas¹, Tijana Rakić²,
Biljana Jančić -Stojanović^{2*}

¹ Pharma Swiss d.o.o., Batajnički drum 5A, Beograd – Zemun, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*autor za prepisku: Tel: +381 11 3951 333; e-mail: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

U ovom radu opisana je primena Plaket-Burman dizajna u proceni robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje sadržaja natrijum-valproata. Kao faktori koji mogu uticati na robusnost metode ispitani su sadržaj acetonitrila, koncentracija natrijum-dihidrogenfosfata, pH vrednost mobilne faze, temperatura kolone, protok mobilne faze i talasna dužina detekcije. U cilju kreiranja plana eksperimenta prema Plaket-Burman dizajnu, na 6 pravih faktora dodato je 5 veštačkih faktora i tako je ispitano 11 faktora izvedenjem 12 eksperimenata. Kao odgovori sistema praćeni su retenciono vreme, broj teorijskih platoa i simetrija pika kao kvalitativni odgovori, dok je kao kvantitativni odgovor praćena površina pika. Na osnovu dobijenih rezultata, a primenom odgovarajućih statističkih i grafičkih metoda, procenjen je uticaj ispitivanih faktora na posmatrane odgovore sistema. Pored toga, za značajne faktore određen je interval pouzdanosti tj. opseg u okviru koga se mogu menjati, a da to ne utiče značajno na odgovor sistema. Na kraju, na osnovu dobijenih rezultata, određeni su i parametri za proveru pogodnosti sistema.

Ključne reči: Plaket-Burman dizajn; robusnost; natrijum-valproat; tečna hromatografija

Uvod

Plaket-Burman dizajn predstavlja vrstu eksperimentalnog dizajna koji omogućava da se izvođenjem relativno malog broja dobro isplaniranih eksperimenta proceni uticaj pojedinačnih faktora na posmatrani odgovor sistema. S obzirom na to da daje informaciju o značajnosti uticaja faktora, smatra se posebno korisnim za procenu robusnosti metoda tečne hromatografije (eng. *Liquid Chromatography – LC*) koje su najzastupljenije metode u kontroli lekova. Robusnost metode predstavlja deo procesa validacije i preporuka je da se izvodi nakon optimizacije metode, a pre ispitivanja ostalih parametara validacije. Prema definiciji Međunarodne konferencije za harmonizaciju tehničkih zahteva za registraciju farmaceutskih proizvoda za humanu upotrebu (eng. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH*), robusnost metode koja se koristi u kontroli lekova mera je njene sposobnosti da se odupre malim i namernim promenama u parametrima metode, a ujedno je i mera pouzdanosti metode tokom rutinske primene [1]. ICH smernice takođe navode da „*jedna od posledica procene robusnosti treba da bude i određivanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema, kako bi se obezbedila pouzdanost analitičke metode kada god se koristi*“. Naime, podaci dobijeni iz testa robusnosti mogu se upotrebiti za definisanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema (eng. *System Suitability Tests – SST*). Ovakav način definisanja SST limita na osnovu eksperimentalnih podataka pouzdaniji je i značajniji od arbitarnog pristupa koji se zasniva na iskustvu analitičara.

Cilj ovog rada bio je da se prikaže primena Plaket-Burman dizajna u proceni robusnosti LC metode za određivanje sadržaja natrijum-valproata. Natrijum-valproat je oficinalan u Ph. Eur. 7 [2] dok je valproinska kiselina oficinalna u Ph. Eur. 7 i USP 35/NF 30 [2, 3]. Kao antiepileptici u terapiji se mogu koristiti pojedinačno u obliku različitih preparata za *per os* primenu, ali i zajedno u obliku tableta sa produženim oslobođanjem. Za određivanje sadržaja natrijum-valproata i valproinske kiseline Ph. Eur. 7.0 propisuje titraciju uz potenciometrijsko određivanje završne tačke [2], dok USP 35/NF 30 [3] propisuje metodu gasne hromatografije (eng. *Gas Chromatography – GC*). GC metoda opisana je i za određivanje magnezijumove soli valproinske kiseline [4], kao i za određivanje nečistoća dimera natrijum-valproata [5]. LC metoda primenjena je za određivanje valproinske kiseline i njenih soli nakon derivatizacije sa fenacil-bromid – trietilaminom u etanolu [6], dok je LC spregnuta sa *Evaporative Light Scattering* detektorom (ELSD) primenjena za određivanje 4 antiepileptika (valproinska kiselina, natrijum-valproat, primidon i karbamazepin) u biološkom materijalu [7]. U dosadašnjoj literaturi opisana je jedna LC metoda sa UV detekcijom za određivanje količine oslobođenog natrijum-valproata iz tableta [8]. U ovom radu opisana je primena Plaket-

Burman dizajna u ispitivanju robusnosti LC metode sa UV detekcijom za određivanje natrijum-valproata.

Procena robusnosti LC metode primenom eksperimentalnog dizajna

Savremeni trendovi u kontroli lekova nameću obavezu da se nakon razvoja metode koja će imati određenu namenu u kontroli lekova, najpre vrši procena robusnosti metode, a zatim da se ispitaju ostali parametri validacije. U cilju dobijanja maksimalnog broja podataka i sagledavanja otpornosti metode, na moguće promene u parametrima metode preporuka je da se primeni eksperimentalni dizajn. Kako je u proceni robusnosti metode cilj definisanje da li neki faktor utiče ili ne na kvalitativne i kvantitativne odgovore sistema, onda je opravdana primena tzv. skrining vrsta dizajna. U literaturi se može naći primena Plaket-Burman dizajna [9–11], kao i punog faktorskog [12–16] i frakcionog faktorskog dizajna [17–21]. S obzirom da je u ovom radu primjenjen Plaket-Burman dizajn, onda će on ovde i biti detaljnije opisan.

Plaket-Burman dizajn

Plaket-Burman dizajn je vrsta frakcionog faktorskog dizajna koji podrazumeva da se interakcije između faktora zanemaruju dok se glavni efekti računaju iz redukovanih broja eksperimenata. Ovo je vrsta dizajna koji se izvodi na dva nivoa pri čemu se N-1 faktora ispituje u N eksperimenata (N je deljivo sa 4). Potreban broj eksperimenata za određeni broj faktora može se naći u referenci [22]. Način kreiranja matrice dizajna dat je u referenci [23]. S obzirom da ukupan broj eksperimenata treba da bude deljiv sa 4, može se desiti da ne postoji dovoljan broj faktora, pa se u takvim slučajevima dodaju tzv. veštački faktori (*dummies*) za koje važi da promena sa nivoa -1 na nivo +1 nema fizičko značenje. Dodatak veštačkih faktora u matricu eksperimenta korisiti se u statističkoj analizi faktorskog modela i poželjno je da se doda najmanje 3 veštačka faktora. Matematički model koji opisuje Plaket-Burman dizajn može se prikazati na sledeći način:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_{N-1}x_{N-1} + b_Nx_N \quad (1)$$

pri čemu je y – odgovor sistema, x – ispitivani faktori, b_0 – odsečak i $b_1 - b_n$ – koeficijenti matematičkog modela.

Analiza Plaket-Burman dizajna

Efekti faktora izračunavaju se prema sledećem izrazu [23]:

$$E_x = \frac{\sum Y(+) - \sum Y(-)}{N/2} \quad (2)$$

gde je E_X efekat odgovarajućeg faktora, $\sum Y(+)$ i $\sum Y(-)$ sume odgovora gde je X na ekstremnim (+) i (-) nivoima, a N broj eksperimenata definisanog dizajna. Za identifikaciju značajnih efekata koriste se statističke i grafičke metode.

Za statističku procenu značajnosti E_X koristi se *statistički t test* [24]:

$$t = \frac{|E_X|}{(S.E.)_e} \quad (3)$$

gde je E_X efekat određenog faktora, a $(S.E.)_e$ standardna greška efekta. Izračunata t vrednost se poredi sa tabelarnom vrednošću, t_{tab} . Efekti kod kojih je $t \geq t_{tab}$ su značajni, dok vrednosti za $t \leq t_{tab}$ ukazuju na neznačajne efekte. Iz prethodnog izraza može se izvesti izraz za određivanje kritične vrednosti E ($E_{kritično}$):

$$E_{kritično} = t_{tab} (S.E.)_e \quad (4)$$

gde je $E_{kritično}$ kritični efekat odgovora. Efekti faktora se smatraju značajnim ako je $|E_X| \geq E_{kritično}$. Vrednost t_{tab} zavisi od broja stepeni slobode za $(S.E.)$ i primjenjenog nivoa značajnosti α . Greška $(S.E.)_e$ može biti procenjena na različite načine koji uključuju Dong-ov algoritam i određivanje preko efekata koji se mogu zanemariti [24].

Grafičko tumačenje značajnosti efekata postiže se najčešće primenom *half-normal probability* grafikona. U cilju kreiranja *half-normal probability* grafikona, efekti su rangirani u nizu prema svojim absolutnim vrednostima. „Neznačajni“ faktori su oni čiji su efekti pozicionirani oko nule, dok efekti značajnih faktora znatno odstupaju od te vrednosti. Prema tome, „neznačajni“ efekti koji imaju normalnu raspodelu sa središtem oko nule su grupisani oko prave linije, dok značajni efekti odstupaju od te prave [24]. Iako je upotreba *half-normal* grafikona preporučljiva u odabiru statistički značajnih efekata, u nekim slučajevima primena *Pareto* dijagrama takođe može biti korisna i dati dobre rezultate.

Iz rezultata koji se dobijaju iz Plaket-Burman dizajna mogu se izračunati intervali pouzdanosti za značajne faktore, kao i SST limiti. Način izračunavanja i određivanja opisan je u referenci [24], a primena ovog pristupa može se naći u referenci [20].

Eksperimentalni deo

Hromatografski sistem. Analiza je vršena na hromatografskom sistemu Dionex Ultimate 3100, Thermo-Fisher Scientific koji se sastoji iz *Quaternary mixing*, UHPLC pumpe LPG-3400, *Diode Array* detektora i Chromeleon Dionex 7.1.0.898 softvera za prikupljanje i obradu podataka.

Reagensi. Za pripremu mobilne faze i rastvora korišćeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (*Merck*, Darmstadt, Nemačka), natrijum-dihidrogenfosfat, monohidrat (*Merck*, Darmstadt, Nemačka), natrijum-hidroksid (*Merck*, Darmstadt, Nemačka) i prečišćena voda HPLC kvaliteta.

Standardi. Natrijum-valproat, radni standard, serijski broj 751.11.08.01, proizvođač Katwijk Chemie bv, Holandija.

Rastvori. Odmereno je tačno 18,75 mg natrijum-valproata, standardne supstance i dodato 0,5 mL acetonitrila i stavljeno u ultrazvučno kupatilo 10 minuta. Nakon toga, dodato je 2 mL 0,1 M natrijum-hidroksida i stavljeno u ultrazvučno kupatilo još 5 minuta. Jedan mL ovog rastvora otipetiran je u odmerni sud od 25 mL i sud je dopunjeno mobilnom fazom do oznake ($c_{\text{natrijum-valproata}} 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$).

Izvođenje eksperimenata za procenu robusnosti metode

Matrica eksperimenta prikazana je u Tabeli I.

Tabela I Plaket-Burman dizajn eksperimenta

Table I Plackett-Burman design of experiments

Br. Eksper.	Faktori											
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	
3	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	
4	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	
5	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	
6	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	
7	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	
8	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
10	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	
12	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	

Faktor A – sadržaj acetonitrila, %

Faktor C – molaritet pufera, mM

Faktor E – pH mobilne faze

Faktor G – temperatura kolone, °C

Faktor J – talasna dužina, nm

Faktor L – protok, mL min.⁻¹

Faktor B – veštački faktor 1

Faktor D – veštački faktor 2

Faktor F – veštački faktor 3

Faktor H – veštački faktor 4

Faktor K – veštački faktor 5

Faktori i njihovi nivoi prikazani su u Tabeli II.

Tabela II Faktori i njihove donje, nominalne i gornje vrednosti

Table II Factors and their lower, nominal and upper values

Faktorski nivoi	Donji (-1)	Nominalni (0)	Gornji (+1)
Promenljiva			
Acetonitril (%)	48	50	52
NaH ₂ PO ₄ (mM)	90	100	110
pH mobilne faze	1,8	2,0	2,2
Protok (mL min ⁻¹)	0,9	1,0	1,1
Temperatura (°C)	20	25	30
Talasna dužina (nm)	209	210	211
Veštački faktor 1	-1	0	+1
Veštački faktor 2	-1	0	+1
Veštački faktor 3	-1	0	+1
Veštački faktor 4	-1	0	+1
Veštački faktor 5	-1	0	+1

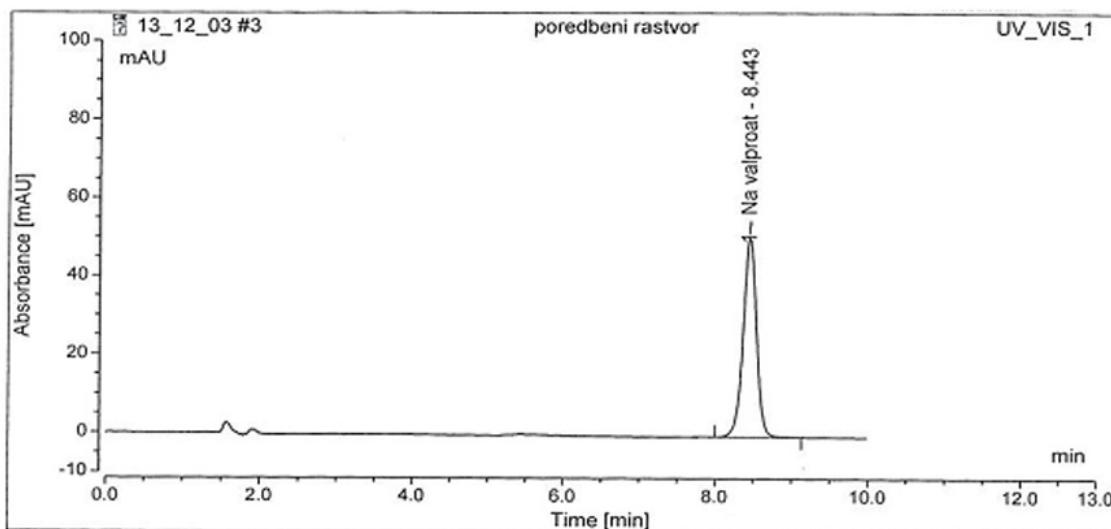
Kada su definisani faktori, njihovi nivoi, plan eksperimenta i odgovori sistema koji će se pratiti, pristupilo se izvođenju eksperimenata prema definisanoj matrici. Eksperimenti su izvedeni randomizirano – nasumično, čime je izbegnut uticaj nekontrolisanih faktora koji postoje u svakom sistemu.

Optimalni hromatografski uslovi. Kolona: Lichrospher RP-18, 250 mm x 4,6 mm; 5 µm veličine čestica; mobilna faza: smeša acetonitril – 0,1 M natrijum-dihidrogenfosfata (50 : 50 v/v, pH 2,0 podešen koncentrovanom *ortho*-fosfornom kiselinom). Protok mobilne faze je 1 mL min⁻¹, temperatura kolone 25 °C i talasna dužina detekcije 210 nm.

Statistička obrada rezultata. Za statističku obradu rezultata korišćen je DesignExpert 7.0.0 softver.

Rezultati i diskusija

U ovom radu opisano je sistematično izvođenje procene robusnosti za LC metodu za određivanje sadržaja natrijum-valproata. Optimalni hromatografski uslovi prikazani su u Eksperimentalnom delu. Hromatogram natrijum-valproata pod optimalnim hromatografskim uslovima prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Hromatogram pri optimalnim hromatografskim uslovima: Kolona: Lichrospher RP-18, 250 mm x 4,6 mm; 5 µm veličine čestica, mobilna faza: acetonitril – 0,1 M natrijum-dihidrogenfosfat (50 : 50 v/v), pH 2,0 podešen koncentrovanom *ortho*-fosfornom kiselinom; protok mobilne faze 1 mL min^{-1} , temperatura kolone 25 °C i talasna dužina detekcije 210 nm.

Figure 1. Chromatogram obtained under optimal chromatographic conditions: column Lichrospher RP-18, 250 mm x 4,6 mm; 5 µm particle size, mobile phase consisted of mixture acetonitrile – 0.1 M sodium-dihydrogenphosphate in the range 50 : 50 v/v, pH of the mobile phase 2.0 adjusted with conc. *ortho*-phosphoric acid, flow rate 1 mL min^{-1} , column temperature 25 °C and wavelength 210 nm.

Definisani optimalni uslovi bili su osnova za pravljenje plana za procenu robusnosti metode. Za početak, kao faktori koji će se ispitivati pri proceni robusnosti metode izabrani su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%), koncentracija natrijum-dihidrogenfosfata (mM), pH mobilne faze, temperatura kolone (°C), protok (mL min^{-1}) i

talasna dužina detekcije. U cilju procene robusnosti metode izabran je Plaket-Burman dizajn kao vrsta skrining dizajna koji omogućava da se ispita uticaj velikog broja faktora izvođenjem relativno malog broja eksperimenata. S obzirom da procena robusnosti metode podrazumeva proveru ponašanja sistema koje nastaje malim i namernim promenama parametara metode, nivoi ispitivanja faktora biraju se tako da imaju mala variranja u odnosu na optimalne uslove. Definisani faktori i njihovi nivoi prikazani su u Tabeli II. Na 6 pravih faktora dodato je 5 veštačkih faktora, što je neophodno za kreiranje plana eksperimenta za Plaket-Burman dizajn. Na ovaj način definisan je eksperimentalni protokol. U sledećoj fazi definisani su odgovori koji će se pratiti tokom procene robusnosti metode. Kao kvalitativni odgovori sistema praćeni su retenciono vreme (R_1), broj teorijskih platoa (R_3) i simetrija pika određena prema Ph. Eur. [2] (R_4), dok je kao kvantitativni odgovor praćena površina pika (R_2).

Dobijene vrednosti odgovora prikazane su u Tabeli III.

Tabela III Plan eksperimenta za testiranje robusnosti i dobijeni rezultati (promene veštačkih faktora nisu naznačene)

Table III Plan of experiments for robustness testing and obtained results (changes of dummies are not given)

Br	A	C	E	G	J	L	R_1	R_2	R_3	R_4
1	48	90	1,8	20	209	0,9	10,194	11,343	11982	1,004
2	52	110	2,2	20	211	1,1	6,344	9,295	11620	1,056
3	52	110	1,8	30	209	0,90	7,787	11,25	12618	0,988
4	52	90	2,2	20	209	0,9	7,904	11,132	12568	1,042
5	48	110	2,2	20	211	0,9	10,032	11,548	12031	0,967
6	52	90	1,8	20	211	1,1	6,689	9,323	11510	0,991
7	48	110	1,8	20	209	1,1	8,513	9,297	11212	1,006
8	52	90	2,2	30	209	1,1	6,124	9,123	11853	1,012
9	48	110	2,2	30	209	1,1	9,294	9,379	11307	0,962
10	52	110	1,8	30	211	0,9	7,803	11,487	12635	0,984
11	48	90	2,2	30	211	0,9	9,061	11,537	12372	0,991
12	48	90	1,8	30	211	1,1	7,847	9,49	11513	0,973

A – sadržaj acetonitrila

C – mM pufera

E – pH mobilne faze

G – temperaturna kolone

J – talasna dužina

L – protok

R_1 – retenciono vreme

R_2 – površina pika

R_3 – broj teorijskih platoa

R_4 – simetrija pika

Nakon toga, vršena je procena uticaja faktora i to primenom statističkih i grafičkih metoda.

Značajnost faktora najpre je procenjena statističkim metodama i to primenom Dong-ovog algoritma i metode efekata koji se mogu zanemariti, način izračunavanja dat je u referenci [24]. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli IV.

Tabela IV Efekti faktora i rezultati za $E_{critical}$ i ME*

Table IV Factor effects and obtained results for $E_{critical}$ and ME

<i>Faktori</i>	<i>Efekti</i>			
	<i>Površina pika</i>	<i>Broj teorijskih platoa</i>	<i>Retencionalno vreme</i>	<i>Simetrija pika</i>
A – sadržaj ACN	-0,164	397,83	-2,048	0,0372
B – veštački faktor 1	0,0177	-2,167	0,156	0,0048
C – mM pufera	0,0513	-62,5	0,3257	-0,0172
D – veštački faktor 2	-0,0337	97,5	-0,4467	0,0138
E – pH mobilne faze	-0,0293	46,83	-0,0123	0,0052
F – veštački faktor 3	0,00667	-21,167	0,2523	-0,0128
G – temperatura kolone	0,05467	229,167	-0,2933	-0,0348
H – veštački faktor 4	-0,008	-4,8333	-0,19667	-0,00217
J – talasna dužina	0,1927	23,5	-0,34	0,00017
K – veštački faktor 5	-0,0083	67,167	-0,191	-0,01017
L – protok mobilne faze	-2,065	-865,167	-1,328	0,01283
E kritično ($\alpha=0,05$)	0,0363	108,487	0,5427	0,0199
ME (0,975; m)	0,2681	204,6425	0,6174	0,0396

* ME – Margin of Error

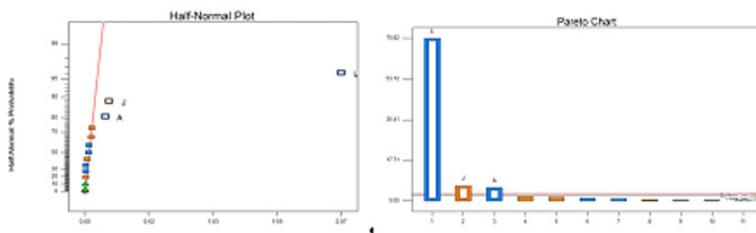
Poređenjem apsolutnih vrednosti dobijenih efekata faktora sa vrednostima $E_{kritično}$ i ME (eng. *Margin of Error* – ME) jasno je da na površinu pika natrijum-valproata najveći uticaj ima brzina protoka mobilne faze, a zatim talasna dužina, kao i sadržaj acetonitrila. Na broj teorijskih platoa najznačajniji uticaj ima brzina protoka mobilne faze, zatim sadržaj acetonitrila i temperatura kolone. Retenciono vreme najviše zavisi od sadržaja acetonitrila i brzine protoka mobilne faze. Simetrija pika je najstabilniji faktor i na njega faktori imaju najmanji uticaj. Od svih faktora na simetriju pika najviše utiče sadržaj acetonitrila. Uticaj ostalih faktora je zanemarljiv.

Postoji preporuka da se procena uticaja faktora uvek vrši na više načina tj. primenom i statističkih i grafičkih metoda, zato je ovde izvršena procena faktorskih efekata primenom Pareto dijagrama i *half-normal probability* grafikona koji su prikazani na Slici 2.

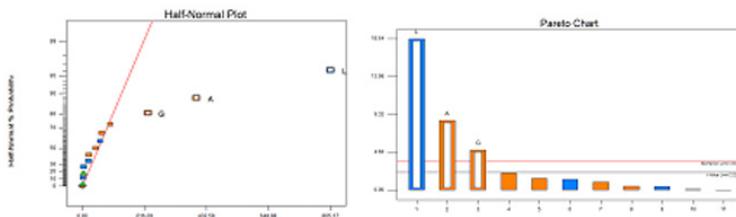
Sa Slike 2 A. iz Pareto dijagrama vidi se da površina pika kao posmatrani odgovor zavisi od brzine protoka mobilne faze (faktor L), jer ovaj faktor prelazi vrednost t -limita. Sadržaj acetonitrila i temperatura kolone takođe se nalaze iznad vrednosti t -limita, ali je njihov uticaj na posmatrani odgovor manje izražen. Sa Slike 2 B. se vidi da na broj teorijskih platoa, kao odgovor sistema, utiču brzina protoka mobilne faze, sadržaj acetonitrila i temperatura kolone i da se ti faktori moraju strogo kontrolisati. U odnosu na promene pH mobilne faze, talasnu dužinu i jonsku jačinu pufera, metoda se može smatrati robustnom, jer su vrednosti efekta ispod t -limita. Sa Slike 2 C. vidi se da na retenciono vreme, kao odgovor sistema, utiče sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, kao i brzina protoka i ti faktori se moraju strogo kontrolisati. Vrednosti ostalih efekata nalaze se ispod t -limita, pa se može zaključiti da je u ispitivanom opsegu faktora ovaj odgovor robustan. Sa Slike 3 D. vidi se da simetrija pika zavisi od sadržaja acetonitrila i temperature kolone jer su vrednosti dobijene za te odgovore iznad t -limita. Za ostale faktore odgovor je robustan.

Prednost pristupa testiranju robuostnosti primenom eksperimentalnog dizajna ogleda se i u mogućnosti izračunavanja intervala pouzdanosti za značajne faktore. Kada faktor ima značajan efekat na odgovor, potrebno je odrediti u kom intervalu nivoi faktora treba da budu kontrolisani, da bi se eliminisao efekat. Određeni su intervali pouzdanosti za značajne faktore i to za faktore koji su procenjeni kao značajni na osnovu Dongovog algoritma za $\alpha = 0,05$. Izračunati intervali pouzdanosti za sve odgovore koji su praćeni dati su u Tabeli V.

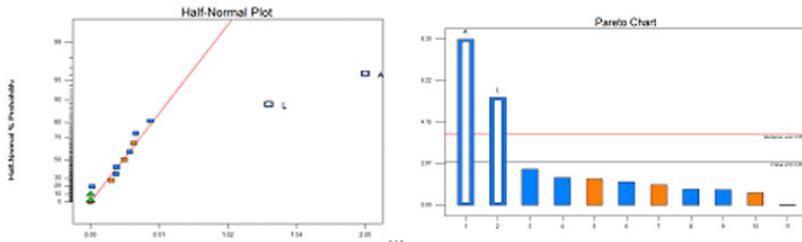
A)



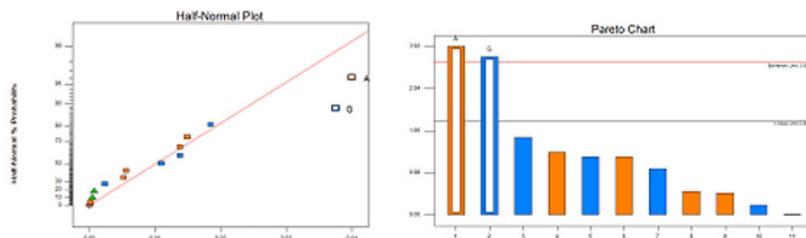
B)



C)



D)



Slika 2. A. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za površinu pika;
B. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za broj teorijskih platoa
C. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za retencione vreme i
D. *Half normal probability* grafikon i Pareto dijagram za simetriju pika.

Figure 2. A. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for peak area;
B. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for number of theoretical plates C. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for retention time and
D. *Half normal probability* graphs and Pareto charts for peak symmetry.

Tabela V Intervali pouzdanosti za značajne faktore preračunati na osnovu Dongovog algoritma**Table V** Intervals of reliability for important factors obtained on the basis of Dong algorithm

Odgovor	Značajni faktori	Interval pouzdanosti na osnovu Ekritično iz <i>Dong</i> -ovog algoritma $\alpha = 0,05$
Površina pika	L	0,98 – 1,02
Broj teorijskih platoa	A	49,45 – 50,55
	G	0,63 – 5,37
Retenciono vreme	L	0,99 – 1,01
	A	49,47 – 50,53
Simetrija pika	L	0,96 – 1,04
	A	48,96 – 51,07
	G	22,14 – 27,86

A - sadržaj acetonitrila u %; G – temperatura kolone (°C); L - brzina protoka mobilne faze (mL min.⁻¹)

Na kraju, određen je SST limit tj. izvedeni su ponovljeni eksperimenti pod uslovima koji daju „najgori“ odgovor iz datog seta eksperimenata. Dobijeni su rezultati za retenciono vreme 6,442 minuta, za broj teorijskih platoa 11190,18 i za simetriju pika 1,0012. S obzirom da se metoda primenjuje za određivanje sadržaja natrijum-valproata može se definisati da je hromatografski sistem pogodan ako je broj teorijskih platoa veći od 10000 i ako je simetrija pika manja od 1,2.

Na ovaj način izvršena je procena robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje sadržaja natrijum-valproata, a takođe su iz istog seta podataka dobijene i vrednosti intervala pouzdanosti za značajne faktore, kao i odgovarajući limiti za procenu pogodnosti sistema. Pristup koji uključuje eksperimentalni dizajn omogućio je da se iz rezultata malog broja dobro isplaniranih eksperimenata izvuče veliki broj podataka koju su značajni za postavljenu LC metodu.

Zaključak

U radu je opisana primena Plaket-Burman dizajna u proceni robusnosti LC metode za određivanje sadržaja natrijum-valproata. U cilju ispitivanja uticaja izabralih faktora (sadržaj acetonitrila, molaritet natrijum-dihidrogenfosfata, pH mobilne faze, temperatura kolone, protok mobilne faze i talasna dužina detekcije) kreirana je matrica eksperimenata za Plaket-Burman dizajn. Praćena su 3 kvalitativna odgovora sistema (retencione vreme, broj teorijskih platoa i simetrija pika) i 1 kvantitativni odgovor (površina pika). Na osnovu dobijenih rezultata izračunati su efekti faktora, a zatim, primenom statističkih i grafičkih postupaka procenjen njihov uticaj na posmatrane odgovore sistema. Takođe, izračunat je interval pouzdanosti za značajne faktore i određeni su parametri za proveru pogodnosti sistema.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije za podršku u okviru istraživanja na Projektu 172052.

Literatura

1. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the Third International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Text on Validation of Analytical Procedures, 1994.
2. European Pharmacopoeia, 7th edition, 2011, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, Strasbourg
3. *The United States Pharmacopeia, 35th edition, National formulary 30*, United States Pharmacopeial Convention, 2011, Rockville, USA.
4. Ambasana MA, Kaila HO, Thakkar RS, Saravaia HT, Shah AK. Validation of an analytical method for assay of magnesium valproate by gas chromatography. Inter J ChemTech Res 2011;3:342–47.
5. Subastranjan A, Suresh P, Srinivasulu S, Hemant R. A validated stability-indicating gas chromatography method for determination of divalproex sodium impurities in pharmaceutical preparation. Drug Test Anal 2010; 2:182–87.

6. Lau-Cam CA, Roos RW. HPLC method with precolumn phenacylation for the assay of valproic acid and its salts in pharmaceutical dosage forms. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 1997; 20: 2075–87.
7. Manoj Babu MK. Simultaneous separation and quantitation of four antiepileptic drugs – a study with potential for use in patient drug level monitoring. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34:315–24.
8. Gupta RK, Singh UK, Kumar S, Moothan B. Estimation of sodium valproate in tablet dosage form by RP HPLC without prior derivatization: Application to dissolution studies. *Int J Pharm Sci Drug Res* 2009; 1 (2): 103–06.
9. Mašković M, Jančić-Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Assessment of liquid chromatographic method robustness employing Plackett-Burman design. *Acta Chromatogr* 2010;22:281–96.
10. Dejaegher B, Dumarey M, Capron X, Bloomfield MS, Vander Heyden Y. Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Anal Chim Acta* 2007;595:59–71.
11. Mašković M, Dotsikas Y, Malenović A, Jančić-Stojanović B, Ivanović D, Medenica M. Validation of an oil-in-water microemulsion liquid chromatography method for analysis of perindopril *tert*-butylamine and its impurities. *J AOAC* 2011;94:723–34.
12. Ragonese R, Mulholland M, Kalman J. Full and fractionated experimental design for robustness testing in the high-performance liquid chromatographic analysis of codeine phosphate, pseudoephedrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in pharmaceutical preparation. *J Chromatogr A* 2000;870:45–51.
13. Orwa JA, Van Gerven A, Roets E, Hoogmartens J. Development and validation of a liquid chromatography method for analysis of colistin sulphate. *Chromatographia* 2000;51:433–36.
14. Chepkwony HK, Vermaelen A, Roets E, Hoogmartens J. Development and validation of an reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of spiramycin and related substances. *Chromatographia* 2001;54:51–6.
15. Chepkwony HK, Roets E, Hoogmartens J. Liquid chromatography of troleandomycin. *J Chromatogr A* 2001;914:53–68.
16. Orwa JA, Govaerts C, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. Liquid chromatography of gramicidin. *Chromatographia* 2001;53:17–21.
17. Hund E, Vander Heyden Y, Haustein M, Massart DL, Smeyers-Verbeke J. Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial design. *J Chromatogr A* 2000;874:167–85.
18. Li YG, Liu H, Vander Heyden Y, Chen M, Wang ZT, Hu ZB. Robustness tests on the United States Pharmacopeia XXVI HPLC assay for ginsenosides in Asian and American ginseng using an experimental design. *Anal Chim Acta* 2005;536:29–38
19. Yekkala RS, Vandenwayenberg S, Hoogmartens J, Adams E. Evaluation of an International Pharmacopeia method for the analysis of nelfinavir mesylate by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2006;1134:56–65.

20. Kasagić Vujanović I, Jovanović M, Rakić T, Jančić Stojanović B, Ivanović D. Testiranje robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna. Arh farm 2012;62:475–88.
21. Marengoa E, Gennaroa MC, Gianottia V, Angelinoa S. A test of robustness in IIR-RP-HPLC separation of nine priority pollutant phenols. J Liq Chromatogr Rel Technol 2001;24:341–53.
22. Araujo PW, Brereton RG. Experimental design. I Screening. Trends Anal Chem 1996;15:26–31.
23. Armstrong NA. Pharmaceutical experimental design and interpretation. Taylor & Francis Group, USA; 2006.
24. Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. J Pharm Biomed Anal 2001; 24:723–53.

Plackett-Burman design in robustness testing of liquid chromatographic method for determination of sodium-valproat

**Slavica Kojić-Marinković¹, Mihaela Tumbas¹, Tijana Rakić,
Biljana Jančić-Stojanović^{2*}**

¹ Pharma Swiss d.o.o., Batajnički drum 5A, Beograd – Zemun, Srbija

² University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

* Corresponding author: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs;
tel.: +381 11 3951 333; fax.: +381 11 3972 840;

Summary

In this paper, application of Plackett-Burman design in robustness testing of liquid chromatographic method for determination of sodium valproate. As factors which could have influence on method's robustness content of acetonitrile, concentration of sodium dihydrogenphosphate, pH of the mobile phase, column's temperature, flow rate and wavelenght were investigated. In aim to create plan of experiments for Plackett-Burman design on six real factors, 5 dummies were added. In total, 11 factors were investigated through 12 experiments. As qualitative responses retention times, number of theoretical plates and peak symmetry were followed while as quantitative response peak area was followed. On the basis of the obtained results with statistical and graphical methods, influence of investigated factors on system responses were defined. Further, for significant factors non-significant interval was defined e. g. range in which factor could be changed without influence on response. Finally, results were used for determination of parameters for system suitability tests.

Key words: Plackett-Burman design; Robustness; Sodium valproate,
Liquid chromatography

Hemijska stabilnost lekova: uticaj svetlosti i temperature na stabilnost montelukasta u rastvoru

Branka Ivković*, Milkica Crevar-Sakač, Zorica Vujić

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

*autor za prepisku: tel: +38111 391335; e-mail:blucic@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

U radu je dat prikaz ispitivanja uticaja temperature i svetlosti na stabilnost montelukasta u rastvorima (standardne supstance, tabletama za žvakanje i filmom obloženih tableta) koji se pripremaju u rutinskoj analizi u toku postupka ispitivanja prisustva srodnih supstanci. Sadržaj montelukasta i nastalih degradacionih proizvoda praćen je primenom RP-HPLC metode u definisanim vremenskim intervalima (0, 24 i 48h kada je u pitanju temperatura, odnosno 0 i 12h kada je u pitanju svetlost). Rezultati ispitivanja uticaja temperature, kao spoljašnjeg faktora nestabilnosti, ukazuju da su analizirani rastvori standarda montelukasta, tableta za žvakanje i filmom obloženih tableta stabilni u prihvatljivim granicama. Sadržaj montelukasta se kreće od 98 % – 100 % što zadovoljava farmakopejske zahteve, kao i zahteve specifikacije proizvoda. Pojedinačne i ukupne nečistoće su u dozvoljenim granicama. Prisustvo fotoreaktivnih funkcionalnih grupa u strukturi montelukasta uslovilo je nastanak fotodegradacionih proizvoda u količinama koje su izvan granica definisanih u monografiji montelukasta, kao i granica definisanih u specifikaciji gotovog proizvoda. Do fotodegradacije dolazi već u toku prvih 12 h. Porast sadržaja MOK-3 sulfoksida i nečistoće sa relativnim retencionim vremenom oko 0,76 zabeležen je u sva tri ispitivana uzorka. U vremenskom intervalu od 12 h uočen je porast sadržaja navedenih nečistoća 8-40 puta u poređenju sa vrednostima u početnom vremenu ispitivanja.

Ključne reči: Montelukast, studija stabilnosti, nečistoće, reverzno-fazna tečna hromatografija

Uvod

Procesi sinteze, izolovanja i prečišćavanja jedinjenja su od velikog značaja u postupku dobijanja supstanci za farmaceutsku upotrebu. Postoji opšte pravilo da hemijska čistoća aktivnih farmaceutskih supstanci (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient – API*) predstavlja kritičan parametar za njihovu dalju upotrebu. Američka Agencija za lekove i hranu (eng. *Food and Drug Administration – FDA*), Evropska regulatorna tela kao i ICH (eng. *International Conference on Harmonization – ICH*) smernice definišu granice iznad kojih sve prisutne nečistoće (uključujući i degradacione proizvode) u supstancama za farmaceutsku upotrebu, kao i u gotovim lekovima, moraju da budu izolovane i okarakterisane. Da bi se dobole informacije o stabilnosti aktivne farmaceutske supstance i opisali procesi degradacije izvode se „stres“ studije. U okviru ovih studija API se izlaže kritičnim uslovima pri čemu izbor parametara zavisi od hemijske strukture jedinjenja. Najčešće se ispituje uticaj temperature, vlage, svetlosti, kiseonika, kao i stabilnost u širokom opsegu pH vrednosti[1].

Stabilnost lekova je sposobnost farmaceutsko-tehnološke formulacije da u određenom kontejneru (pakovanju) zadrži hemijske, fizičke, mikrobiološke, toksikološke i terapijske osobine tokom vremena čuvanja i upotrebe leka, pod definisanim uslovima čuvanja. Mera stabilnosti leka je brzina promena koje nastaju u doziranom obliku a koje mogu biti fizičke, hemijske i mikrobiološke.

Fizička stabilnost lekova predstavlja sposobnost leka da zadrži nepromenjene fizičke karakteristike, odnosno, predstavlja odsustvo svih promena u pogledu izgleda formulacije, organoleptičkih osobina doziranog oblika, čvrstoće, veličine čestica, boje, itd.

Mikrobiološka stabilnost je sposobnost lekovite supstance/leka da proizvodi ostanu u definisanim granicama kvaliteta.

Hemijska stabilnost lekovitih supstanci je sposobnost supstance da zadrži nepromenjenu molekulsku strukturu (svoj hemijski identitet). Supstance koje ulaze u sastav leka, a koje su hemijski nestabilne podložne su reakcijama degradacije tokom kojih se dešavaju hemijske reakcije koje mogu da utiču kako na količinu aktivne supstance tako i na pojavu nečistoća, ukratko, na bezbednost i efikasnost primenjenog leka. FDA, EMA (eng. *European Medicines Agency*), kao i ICH smernice zahtevaju obavezno izvođenje testova stabilnosti kako bi se pratila i razumela promena kvaliteta supstanci za farmaceutsku upotrebu i leka, kao krajnjeg proizvoda, tokom vremena i pod uticajem različitih faktora okoline. Poznavanje hemijske stabilnosti jedinjenja, bilo da je u pitanju lek, konzervans ili ekscipijens, omogućava izbor odgovarajuće formulacije, pakovanje, opredeljuje način čuvanja leka i ukazuje na moguće interakcije sa ekscipijensom.

Hemiska degradacija lekova

Poznato je da veliki broj farmaceutski aktivnih supstanci podleže reakcijama degradacije ukoliko su izložene faktorima okoline ili se čuvaju u neadekvatnim uslovima. Hemiska stabilnost leka zavisi od strukturnih karakteristika jedinjenja koja ulaze u sastav leka, tj. od prisustva karakterističnih funkcionalnih grupa. Poznavanjem hemijske strukture supstanci često se mogu predvideti vrste degradacionih reakcija [1].

Najčešće hemijske reakcije koje utiču na degradaciju jedinjenja su hidroliza (solvola), oksidacija, dehidratacija, izomerizacija i racemizacija, fotodegradacija, dekarboksilacija, lek-ekscipijens i lek-lek interakcija, polimerizacija. Navedene hemijske reakcije se dešavaju pod uticajem različitih faktora kao što su promene pH, temperature, prisustvo vlage, svetlost...

Solvola je proces degradacije jedinjenja koji nastaje pod uticajem rastvarača. U ovom slučaju rastvarač je nukleofil koji „napada” elektropozitivne centre u molekuli, često ona jedinjenja koja sadrže „labilne” karbonilne funkcionalne grupe - estre, laktone i laktame. Najčešći rastvarač je voda (hidroliza). Proces hidrolize može biti usporen dodatkom korastvarača (etanol, polietilen glikol) [1].

Oksidacija nastaje kao posledica reakcije sa atmosferskim kiseonikom. Reakcije oksidacije mogu biti katalizovane jonima teških metala i prisustvom svetlosti a krajnji proizvod degradacije može biti stvaranje slobodnih radikala. Funkcionalne grupe koje podležu reakciji oksidacije su alkoholi, fenoli, aldehidi, nezasićene masne kiseline [2].

Dehidratacija je proces eliminacije vode iz jedinjenja koji često dovodi do promene kristalne strukture jedinjenja. Poznato je da neka anhidrovana jedinjenja imaju različitu brzinu rastvaranja u poređenju sa hidratisanim oblikom što može da utiče na brzinu rastvaranja doziranog oblika. Reakciji dehidratacije podležu npr. prostaglandini E1 i E2, eritromicin, šećeri, kao što su glukoza i laktoza (nastaje 5-hidroksimetil furfural).

Izomerizacija je proces prelaska jednog optičkog ili geometrijskog izomera u drugi. Racemizacija se dešava kada se optički aktivan oblik jedinjenja konvertuje u svoj enantiomer. Promena optičke aktivnosti može da rezultira promenom biološke aktivnosti: enantiomer koji nastaje može da ima manji terapijski efekat, nema delovanje ili da ispoljava toksične efekte (talidomid). Epimerizacija je promena konfiguracije na jednom hiralnom C atomu. Reakciji epimerizacije podležu pilokarpin, tetraciklini, etopozid, itd [1].

Fotodegradacija je reakcija degradacije koja se dešava pod uticajem svetlosti, naročito UV zračenja koje ima manju talasnu dužinu i veću energiju u odnosu na dnevnu svetlost. Svetlosna energija koju jedinjenja apsorbuju može dostići tzv. energiju aktivacije nakon čega započinju procesi degradacije ili se apsorbovana energija može preneti na druge molekule koje su dalje podložne reakcijama oksidacije, polimerizacije,

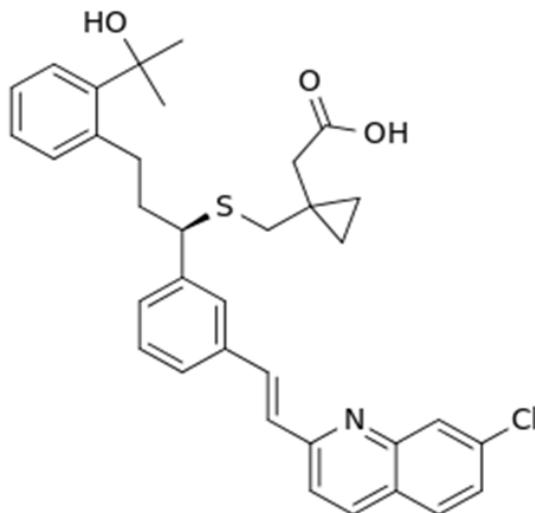
itd. Primeri fotodegradacije su dehidrogenacija nifedipina, fotodegradacija hlorohinina, primahina. Fotodegradacija se može kontrolisati upotrebom neprovidne ili obojene ambalaže.

Porast temperature najčešće ubrzava reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize. Sagledavajući uticaj pH vrednosti sredine na stabilnost jedinjenja treba uzeti u obzir činjenicu da većina supstanci za farmaceutsku upotrebu, u pogledu kiselo-baznih osobina, pripada grupi slabih kiselina ili slabih baza koje su stabilne u opsegu pH vrednosti od 4,0 do 8,0. Promenom pH vrednosti rastvora menja se stepen jonizacije jedinjenja i rastvorljivost što može da vodi ka nestabilnosti jedinjenja. Da bi se sprečila degradacija izazvana velikim promenama pH vrednosti sredine često se koriste puferi: acetatni, citratni, fosfatni. Prisustvo vlage ubrzava hemijske reakcije oksidacije, redukcije, hidrolize i podstiče mikrobiološku kontaminaciju [1].

Kako bi se povećala hemijska stabilnost lekova primenjuju se različiti pristupi kao što su modifikacija molekulske strukture jedinjenja, građenje kompleksa lek-ekscipijens, građenje inkluzionih kompleksa sa ciklodekstrinima, inkorporiranje leka u liposome, micele, emulzije, dodatak stabilizatora (npr. antioksidansi), pakovanje u odgovarajuću ambalažu...

Stabilnost montelukasta

Montelukast je selektivni, oralni antagonista leukotrienskih receptora koji specifično inhibira cisteinil leukotrien CysLT1 receptor (Slika 1). U obliku natrijumove soli koristi se u terapiji hronične astme, bronhospazma, alergijskog rinitisa i urticarija. Hemijski, montelukast je (R,E)-2-(1-((1-(3-(2-(7-hlorohinolin-2-il)vinil)fenzil)-3-(2-hidroksipropan-2-il)fenil)propiltio)metil)ciklopropil sirćetna kiselina.

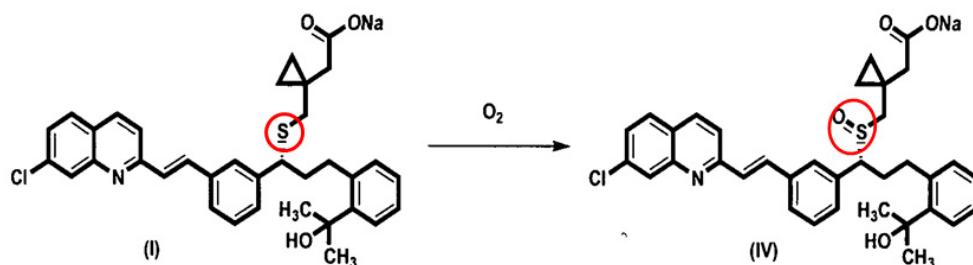


Slika 1. Hemijska struktura montelukasta

Figure 1. Chemical structure of Montelucast

Montelukast je slabo rastvorljivo, lipofilno, amfoterno jedinjenje ($\log P = 8,79$ (ADMET predictor) i $pK_a = 2,7$ i $5,8$ [3]). U strukturi montelukasta nalaze se brojne funkcionalne grupe koje utiču na hemijsku stabilnost ovog jedinjenja. Poznato je da montelukast podleže reakcijama degradacije koje se prema vrsti hemijskih transformacija mogu podeliti u tri grupe [4]:

1. Oksidacija merkapto grupe do sulfoksida (Slika 2):

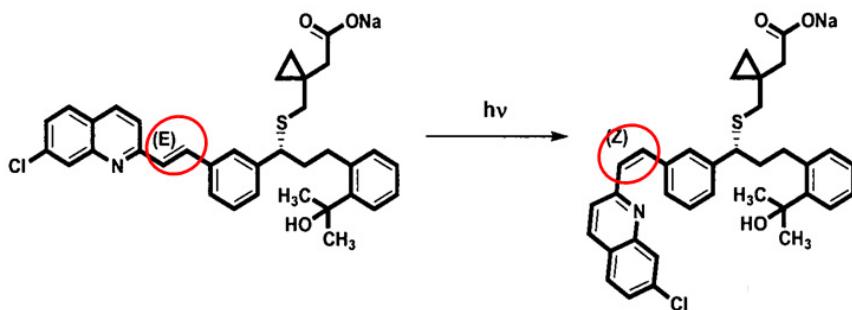


Slika 2. Oksidacija tioetra do sulfoksida

Figure 2. Oxidation of thioether to sulfoxide

Sulfoksid je neaktivna nečistoća koja smanjuje efikasnost unetog leka. Stabilan farmaceutsko-tehnološki oblik je onaj koji ne sadrži više specifikirane količine sulfoksoida kada se čuva pod deklarisanim uslovima.

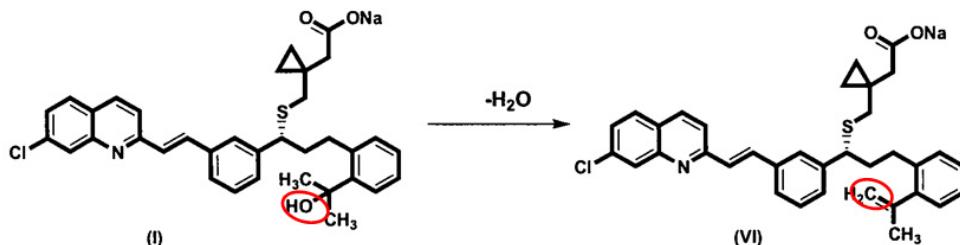
2. Izomerizacija dvostrukе veze (Slika 3):



Slika 3. Izomerizacija dvostrukе veze

Figure 3. Isomerisation of double bond

3. Dehidratacija tercijarnog alkohola (Slika 4):



Slika 4. Dehidratacija tercijarnog alkohola

Figure 4. Dehydratation of tertiary alcohols

Zbog hemijske nestabilnosti montelukasta u pripremi formulacija posebna pažnja je posvećena izboru pomoćnih supstanci (ekscipijensa): sredstva za dopunjavanje, vezivanje, za raspadljivost, za klizanje, kao i lubrikansi [5–6]. Formulacije koje sadrže mikrokristalnu celulozu povećavaju količinu sulfoksoida zbog mogućeg prisustva vodonik-peroksida [7]. Sličan efekat izaziva prisustvo aspartama u formulaciji zbog

čega je njegova količina u tabletama za žvakanje ograničena na 1 mg/tab. Montelukast se u prometu nalazi u obliku filmom obloženih tableta, tableta za žvakanje i granula.

U literaturi su opisane *stability indicating* metode [8–10], metode ispitivanje uticaja svetlosti i temperature na stabilnost montelukasta u rastvoru i čvrstom stanju [10], kao i mehanizam kinetike fotodegradacije [13, 14]. Određivanje montelukasta u doziranim oblicima može se vršiti primenom metode voltametrije [15], spektrofotometrije [16], HPLC metode [17]. Opisane su i metode istovremenog određivanja montelukasta i desloratadina [18] i levocetirizina [19] u doziranim oblicima kao i određivanje montelukasta u biološkom materijalu [20–22].

Stres studije stabilnosti se izvode u ranoj fazi razvoja proizvoda, a koji obuhvata i razvoj i optimizaciju analitičke metode. Ova faza podrazumeva, pored definisanja optimalnih hromatografskih uslova i ispitivanje stabilnosti standardnih i analiziranih rastvora, što ima za cilj definisanje eksperimentalnih procedura i uslova pod kojima će se izvoditi priprema rastvora za analizu. Stabilnost rastvora se definiše kao vremenski interval u okviru koga su rastvori koji se koriste za analizu stabilni. Eksperimentalno se utvrđuje tako što se primenom validirane metode izvrši analiza propisanih ispitivanih i standardnih rastvora unapred utvrđenom dinamikom u odnosu na sveže pripremljeni standardni rastvor.

Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj temperature i svetlosti na stabilnost montelukasta u rastvorima montelukast tableta za žvakanje, montelukast filmom obloženih tableta i rastvoru standarda montelukast natrijuma koji se pripremaju u postupku ispitivanja prisustva i određivanja srodnih supstanci.

Eksperimentalni deo

Oprema: hromatograf Agilent Technologies HP 1200 sa DAD detektorom, Dionex UltiMate 3000 UHPLC sa DAD detektorom.

Reagensi: Za pripremu mobilne faze i rastvora korišćeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (Sigma, Aldrich, Nemačka), ortofosforna kiselina (Sigma, Aldrich, Nemačka), natrijum-dihidrogenfosfat, dihidrat (Sigma, Aldrich, Nemačka), metanol (Sigma, Aldrich, Nemačka), voda HPLC kvaliteta dobijena sistemom TKA (USA).

Standardne supstance: **Montelukast natrijum**, radni standard, **MOK-3 sulfoksid** (2-(1-((1R)-1-(3-[(E)-2-(7-hloro-2-hinolil)-1-etenil]fenil)-3-[2-(1-hidroksi-1-metil etil)fenil] propil sulfinil metil)ciklopropil] sirćetna kiselina) (Slika 3), **Stiren nečistoća** (1-[[[[(1R)-1-[3-[(1E)-2-(7-hloro-2-hinolil)etil]fenil]-3-[2-[1-(1-metil) etil]fenil] propil] metil] ciklopropil] sirćetna kiselina) (Slika 4).

Dozirani farmaceutski oblici: Montelukast tablete za žvakanje i Montelukast filmom obložene tablete.

Preparacija rastvora

Puffer pH 3,7: 4,4 g natrijum-dihidrogenfosfata, dihidrata, prenese se u odmerni sud od 1000 mL, rastvor u 800 mL vode i dopuni vodom do oznake. pH vrednost rastvora se podesi na 3,7 fosfornom kiselinom.

Osnovni standardni rastvor montelukasta, u koncentraciji 1,0 mg mL⁻¹ pripremi se u metanolu, dok su **osnovni standardni rastvori nečistoća (MOK-3 sulfoksida i stiren nečistoće)** u koncentraciji 0,1 mg mL⁻¹ pripremljeni u acetolu. Posle dužeg stajanja stiren nečistoće u metanolnom rastvoru može doći do interakcije alkohola sa dvostrukom vezom pa je aceton, zbog dobre rastvorljivosti i stabilnosti, izabran kao rastvarač za nečistoće.

Rastvori korišćeni za procenu pogodnosti sistema u koncentraciji: montelukast 0,001 mg mL⁻¹, MOK-3 sulfoksid 0,001 mg mL⁻¹ i stiren nečistoća 0,001 mg mL⁻¹ pripreme se u smeši metanol/voda (9:1 V/V).

Analizirani rastvor standarda montelukasta, kao i analizirani rastvori Montelukast tableta za žvakanje i filmom obloženih tableta pripremljene su u koncentraciji od 0,5 mg mL⁻¹ u smeši metanol/voda (9:1 V/V).

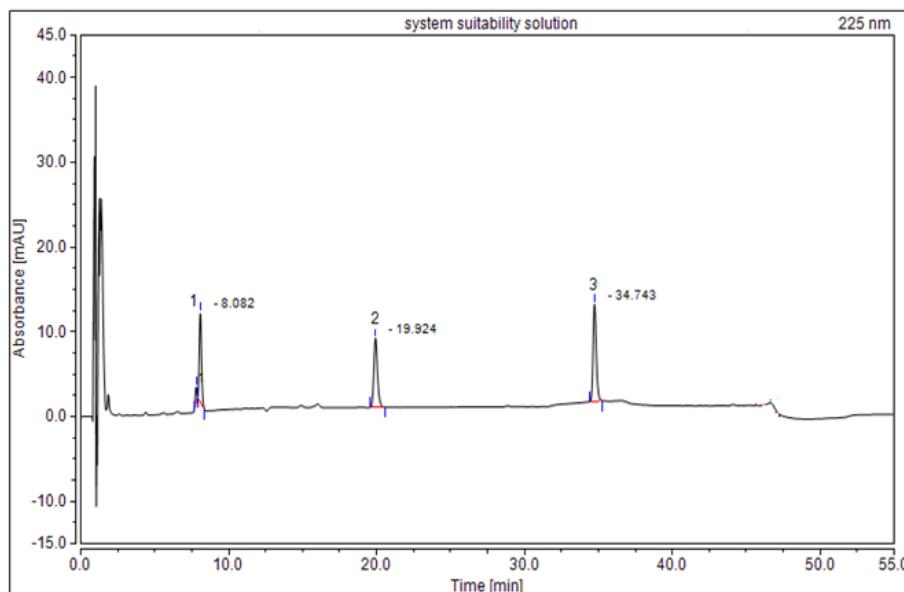
Hromatografski uslovi: kolona–zadovoljavajuće razdvajanje montelukasta i degradacionih proizvoda postignuto je na koloni BDS HYPERSIL C18, 100 mm x 4,6 mm, 3µm veličine čestica uz gradijentno eluiranje mobilnom fazom A koju čini smeša – puffer pH 3,7: ACN u odnosu 80:20 i mobilnom fazom B – smeša puffer pH 3,7: ACN u odnosu 20:80 (V/V). Protok mobilne faze bio je 1 mL min.⁻¹, temperatura kolone 27 °C, talasna dužina detekcije 225 nm i volumen injektovanja 20 µL. Program gradientnog eluiranja: 0-30min A: 50 %→20 %, 30-35 min A: 20 %→5 %, 35-45 min A: 5 %, 45-50 min A: 5→50 %, 50-60 min A: 50 %.

Rezultati i diskusija

U radu su prikazani rezultati ispitivanja stabilnosti montelukasta u rastvorima koji se koriste u postupku ispitivanja srodnih supstanci u toku rutinske kontrole farmaceutskih doziranih oblika montelukasta (filmom obložene tablete i tablete za žvakanje). Ispitivanje stabilnosti je vršeno RP-HPLC metodom koja omogućava razdvajanje aktivne supstance od degradacionih proizvoda, koji mogu nastati u toku pripreme, analize i čuvanja rastvora. Predložena metoda je validirana, i utvrđeno je da je metoda dovoljno osetljiva, selektivna i reproduktivna. Pre izvođenja bilo kog eksperimenta za validaciju metode potrebno je dokazati da je HPLC sistem pogodan, a da definisana procedura obezbeđuje pouzdane, tačne i reproduktivne rezultate. Procena pogodnosti sistema je izvršena praćenjem faktora rezolucije, asimetrije pika kao i broja teorijskih platoa. Podaci su prikazani u Tabeli I i na Slici 5.

Tabela I Parametri pogodnosti sistema**Table I** System suitability parameters

Pik	Jedinjenje	Retenciono vreme (min.)	Faktor rezolucije (R_S) (>2)	Asimetrija pika (T) (<2)	Broj teorijskih platoa (N) (>2000)
1	MOK-3 sulfoksid	8,082	33,34	1,16	13556
2	montelukast	19,924	36,34	1,25	33628
3	stiren nečistoća	34,743	15,84	1,20	131579

**Slika 5. Hromatogram rastvora za proveru pogodnosti sistema****Figure 5. Chromatogram showing system suitability**

U izvedenoj studiji stabilnosti montelukasta u rastvoru praćen je uticaj dva spoljašnja faktora koji mogu uticati na hemijski integritet jedinjenja: temperatura i svetlost. Poznato je da temperatura, kao i svetlost katalizuju mnoge degradacione procese kao što su oksidacija, hidroliza, izomerizacija i sl.

Uticaj temperature na stabilnost montelukasta u rastvoru

Prilikom procene stabilnosti montelukasta u standardnom i ispitivanim rastvorima tableta praćen je sadržaj montelukasta, poznatih i nepoznatih nečistoća u trenutku pripreme rastvora, nakon 24h i 48h, u rastvorima koji su čuvani na sobnoj temperaturi i u frižideru (4°C). Rastvori za analizu su pripremani i čuvani u odmernim sudovima od tamnog stakla. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabelama II, III i IV.

Tabela II Rezultati stabilnosti montelukasta u rastvoru montelukast radnog standarda

Table II Results of stability study of montelukast in the standard solution of Montelukust

Sobna temperatura				
Vreme ispitivanja	Jedinjenje	Površina pika	RSD	Razlika u površini (%)
0	montelukast	1225,96	1,25	-
24		1220,01	0,60	-0,46
48		1205,70	1,39	-1,65
0	MOK-3 sulfoksid	1,83	0,41	-
24		1,83	0,42	-
48		1,84	0,14	+0,55
0	Stiren nečistoća	2,85	0,33	-
24		2,86	0,19	+0,35
48		2,88	0,66	+1,05
Temperatura frižidera (4-8 °C)				
Vreme ispitivanja	Jedinjenje	Površina pika	RSD	Razlika u površini (%)
0	montelukast	1225,96	0,73	-
24		1222,11	0,94	-0,31
48		1217,22	0,81	-0,71
0	MOK-3 sulfoksid	1,83	0,09	-
24		1,83	0,35	-
48		1,83	0,24	-
0	Stiren nečistoća	2,85	0,12	-
24		2,85	0,44	-
48		2,86	0,26	+0,35

Tabela III Rezultati stabilnosti montelukasta u rastvoru Montelukast tableta za žvakanje**Table III** Results of stability study of montelukast in the solution of Montelukust chewing tablets

Sobna temperatura				
Vreme ispitivanja	Jedinjenje	Sadržaj	RSD	Razlika u sadržaju (%)
0	montelukast	99,57	0,26	-
24		99,61	0,25	+0,04
48		98,04	0,25	-1,53
0	MOK-3 sulfoksid	0,14	1,26	-
24		0,14	2,38	-
48		0,15	1,51	+0,01
0	Stiren nečistoća	0,06	0,26	-
24		0,05	0,30	-0,01
48		0,06	0,05	-
0	Nepoznata nečistoća (RRT~0,75)	0,06	2,29	-
24		0,06	2,37	-
48		0,08	2,83	+0,02
Temperatura frižidera (4-8 °C)				
Vreme ispitivanja	Jedinjenje	Sadržaj (%)	RSD	Razlika u sadržaju (%)
0	montelukast	99,57	0,26	-
24		99,69	0,25	+0,12
48		99,05	0,26	-0,52
0	MOK-3 sulfoksid	0,11	1,26	-
24		0,07	3,29	-0,04
48		0,12	1,35	+0,10
0	Stiren nečistoća	0,06	0,26	-
24		0,07	2,09	+0,01
48		0,06	2,11	-
0	Nepoznata nečistoća (RRT~0,75)	0,06	2,29	-
24		0,05	3,22	+0,01
48		0,03	1,52	-0,03

Tabela IV Rezultati stabilnosti montelukasta u rastvoru Montelukast film tableta**Table IV** Results of stability study of montelukast in the solution of Montelukust film coated tablets

Sobna temperatura				
Vreme испитivanja	Jedinjenje	Sadržaj	RSD	Razlika u sadržaju (%)
0	montelukast	99,58	0,09	-
24		99,63	0,08	+0,05
48		99,02	0,09	-0,56
0	MOK-3 sulfoksid	0,08	2,90	-
24		0,08	2,38	-
48		0,08	1,51	-
0	Stiren nečistoća	0,02	0,77	-
24		0,03	0,44	+0,01
48		0,02	0,07	-
0	Nepoznatanečistoća (RRT~0,75)	0,01	2,90	-
24		0,02	2,37	+0,01
48		0,02	2,83	-
Temperatura frižidera (4-8 °C)				
Vreme испитivanja	Jedinjenje	Sadržaj	RSD	Razlika u sadržaju (%)
0	montelukast	99,58	0,09	-
24		99,52	0,05	-0,06
48		99,02	0,10	-0,56
0	MOK-3 sulfoksid	0,08	2,38	-
24		0,06	2,22	-0,02
48		0,08	1,38	-
0	Stiren nečistoća	0,02	0,77	-
24		0,01	0,55	-0,01
48		0,01	1,00	-
0	Nepoznatanečistoća (RRT~0,75)	0,01	2,90	-
24		0,02	1,85	+0,01
48		0,02	1,85	-

Na osnovu dobijenih vrednosti relativnih standardnih devijacija ($RSD < 5\%$) [8, 9] može se izvesti zaključak da je montelukast stabilan u svim ispitivanim rastvorima kako na temperaturi od 4°C tako i na sobnoj temperaturi.

Sadržaj montelukasta u standardnom rastvoru je u opsegu 98-102 %, a pojedinačne i ukupne nečistoće u dozvoljenim granicama [7] čime je potvrđeno da su ispitivani rastvori stabilni 48h. Sadržaj montelukasta u rastvorima tableta za žvakanje, kao i filmom obloženih tableta je u opsegu 95 % – 105 %, a pojedinačne i ukupne nečistoće u dozvoljenim granicama koje su definisane specifikacijom proizvoda (MOK-3 $\leq 0,5\%$, stiren $\leq 0,5\%$, nepoznate nečistoće $\leq 0,2\%$ i ukupne nečistoće $\leq 1,5\%$).

U svim ispitivanim uzorcima rastvora tableta montelukasta detektovane su i nepoznate nečistoće pri čemu je praćena nečistoća čije je prisustvo potvrđeno i u rastvoru standarda montelukasta (RRT 0,75). Ostale nepoznate nečistoće u rastvoru standarda detektovane su u količini manjoj od 0,01 % i tokom ispitivanja nisu pokazivale značajnu tendenciju porasta (njihov sadržaj nije prelazio 0,01 %).

Uticaj svetlosti na stabilnost montelukasta u rastvoru

U strukturi montelukasta nalaze se fotoreaktivne funkcionalne grupe, toetarska i alkenska grupa. Svetlost može katalizovati inicijalnu reakciju oksidacije montelukasta te je stoga praćen porast sadržaja sulfoksida koji nastaje oksidacijom tio etra (Slika 3). Svetlost katalizuje reakcije izomerizacije dvostrukе veze u strukturi montelukasta pri čemu nastaje Z izomer (Slika 4). Specifikacijom proizvoda Z izomer nije definisan kao poznata nečistoća te se u ispitivanju vodi kao nepoznata nečistoća i granice za njegov sadržaj su strožije (0,2 %) u poređenju sa MOK-3 sulfoksidom i stiren nečistoćom (0,5 %).

Studije fotodegradacije montelukasta izvedene pod uticajem dnevne svetlosti, pokazale su da svetlost kao ispitivani faktor ima veći uticaj na integritet strukture montelukasta u poređenju sa temperaturom. Ispitivani rastvori i rastvori standarda pripremani su i čuvani u odmernim sudovima od bezbojnog stakla, na sobnoj temperaturi. Inicijalna koncentracija montelukasta poređena je sa koncentracijom montelukasta u istim rastvorima nakon 24 h. Dobijeni rezultati su ukazivali na degradaciju aktivne supstapstance više od 10 % tako da je izvedena nova studija u kojoj je degradacija praćena u toku 12 h. (Tabela V, Slika 6).

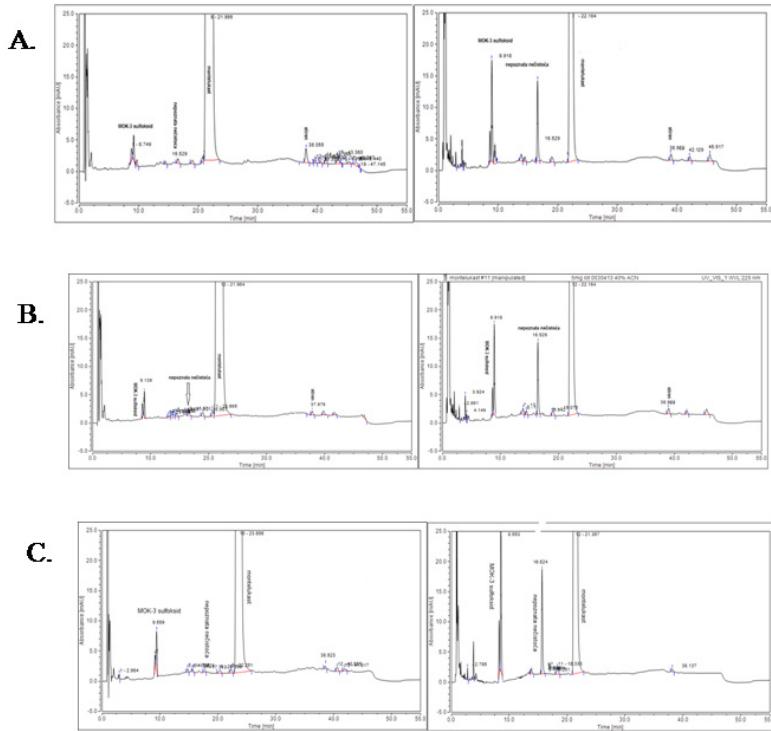
Tabela V Rezultati fotodegradacije montelukasta u ispitivanim uzorcima**Table V** Results of photodegradation studies of montelukast in the investigated solutions

Standardni rastvor montelukast natrijuma			
Vreme ispitivanja	Jedinjenje	Sadržaj (%)	Razlika u sadržaju (%)
0	montelukast	99,27	-
12		96,86	-2,41
0	MOK-3 sulfoksid	0,07	-
12		0,95	+0,88
0	Stiren nečistoća	0,02	-
12		0,08	+0,06
0	Nepoznata nečistoća (RRT~0,75)	0,05	-
12		0,61	+0,56
Rastvor Montelukast tablata za žvakanje			
Vreme ispitivanja	Jedinjenje	Sadržaj (%)	Razlika u sadržaju (%)
0	montelukast	99,36	
12		96,83	-2,53
0	MOK-3 sulfoksid	0,086	
12		1,01	+0,924
0	Stiren nečistoća	0,04	
12		0,06	+0,04
0	Nepoznata nečistoća (RRT~0,75)	0,02	
12		0,81	+0,61
Rastvor Montelukast filmom obloženih tableta			
Vreme ispitivanja	Jedinjenje	Sadržaj (%)	Razlika u sadržaju (%)
0	montelukast	99,39	
12		97,39	-2,0
0	MOK-3 sulfoksid	0,14	
12		1,12	+1,14
0	Stiren nečistoća	0,01	
12		0,02	+0,01
0	Nepoznata nečistoća (RRT~0,75)	0,09	
12		0,67	+0,58

Uticaj svetlosti dovodi do smanjenja sadržaja montelukasta i do porasta sadržaja MOK-3 sulfoksida i nečistoće čije je RRT oko 0,76. Sadržaj nečistoća već nakon 2 h prelazi granice koje su definisane farmakopejom (MOK-3 sulfoksid \leq 0,2 %, nepoznate nečistoće pojedinačno \leq 0,1 %) [9]. Stiren nečistoća nije pokazivala značajniju tendenciju porasta pod dejstvom svetlosti i njen sadržaj je bio u granicama farmakopejskih zahteva (\leq 0,3 %) [9].

U svim uzorcima tableta montelukasta koje su bile izložene dejству svetlosti detektovane su nečistoće koje se pojavljuju na retencionim vremenima poznatih nečistoća (MOK-3 i stiren nečistoće), ali i nepoznate od kojih je praćena nečistoća čije je prisustvo potvrđeno i u rastvoru standarda montelukasta (RRT oko 0,76). Pod dejstvom svetlosti količina aktivne supstance je opadala ali je i dalje ostajala u granicama definisanim specifikacijom gotovog proizvoda (95 % – 105 %). S druge strane, sadržaj nečistoća u ispitivanim rastvorima je u toku 12 h porastao od 8 do 40 puta u poređenju sa inicijalnom koncentracijom tako da je prelazio granice definisane specifikacijom (0,5 % za poznate tj. 0,2 % za nepoznate nečistoće).

Tablete koje sadrže farmaceutski aktivne supstance osetljive na fotohemiju degradaciju oblažu se polimernim filmom sa UV apsorberom koji generalno eliminiše efekat svetlosti na aktivnu supstancu tokom čuvanja i upotrebe proizvoda. U ovoj studiji ispitivana je i fotostabilnost rastvora filmom obloženih tableta Montelukasta. Rezultati prikazani u Tabeli VI i na Slici 6 ukazuju da je stepen fotodegradacije gotovo identičan u sva tri ispitivana uzorka iz jednostavnog razloga što se ispitivanje stabilnosti izvodi u rastvoru, a ne sa čvrstim uzorcima, pa prisustvo fotoprotективnog filma nema značajnu ulogu u stabilnosti pripremljenih rastvora. Rastvori ovih tableta pripremaju se i čuvaju pod istim uslovima kao i rastvori standarda i tableta za žvakanje.



Slika 6. Hromatogrami praćenja stabilnosti analiziranih rastvora: A. Hromatogrami rastvora standarda u 0h i 12h, B. Hromatogrami rastvora Montelukast tableta za žvakanje u 0h i 12h i C. Hromatogrami rastvora Montelukast filmom obloženih tableta u 0h i 12h

Figure 6. Chromatograms showing stability of tested solutions
A. standard solution after 0h and 12h; B. Solution of Montelukast chewing tablets after 0h and 12h;
C. Solution of Montelukast film coated tablets after 0h and 12h

Zaključak

U radu je prikazan uticaj temperature i svetlosti na stabilnost standardnog rastvora montelukasta kao i rastvora koji se pripremaju pri analizi nečistoća i srodnih supstanci u doziranim oblicima montelukasta: tabletama za žvakanje i filmom obloženih tableta. Zaključeno je da dnevna svetlost u većoj meri katalizuje hemijsku degradaciju montelukasta u poređenju sa temperaturom.

U cilju dobijanja pouzdanih rezultata analize u postupku ispitivanja i određivanja sadržaja srodnih supstanci u rastvorima montelukast tableta za žvakanje i filmom obloženih tableta potrebno je vršiti pripremu rastvora u odmernim sudovima od tamnog stakla i pripremljene ratvore analizirati u toku 48 h na sobnoj temperaturi.

Literatura

1. Carstensen JT. Drug stability. Principles and Practice, Second Edition, Marcel Dekker, New York, 1995.
2. Hovorka, SW, Schöneich C. Oxidative degradation of pharmaceuticals: theory, mechanisms and inhibition. *J Pharm. Sci.* 2001; 90: 253-69.
3. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Dynamic dissolution testing to establish *in vitro/in vivo*correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm Res.* 2008; 25(12):2778-85.
4. Patent WO 2009111998 A2
5. Kmar PP. Formulation development and evaluation of montelukast sodium chewable tablets. *J Chem PharmaceutSci.* 2013;6(1):35-40.
6. Mahesh E, Kumar GBK, Ahmed MG, Kumar PK. Formulation and evaluation of montelukast sodium fast dissolving tablets. *Asian J Biomed Pharmaceut Sci.* 2012; 2(14):75-82.
7. European Pharmacopoeia 8th edition, Council of Europe, Strasbourg 2014.
8. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Stability testing of new drug substance and products Q1A(R2),Switzerland,2003.
9. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Validation of analytical procedures: Text and MethodologyQ2(R1),Switzerland,2005.
10. Haque AM, Prashanth K, Manikanta A, Hasan S, Pradeep T, Nivedita G, Diwan PV. Stability indicating RP-HPLCmethod for the estimation of montelukast in pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;1(6):31-6.
11. Bapatu HR, Kumar MR, Garg LK, Venugopal D, Reddy AM. A Validated stability indicating UPLC method for montelukast impurities in montelukast sodium oral granules. *International J Pharm Biomed Anal.* 2012;3(1):345-55.
12. Al Omari MM, Zoubi RM, Hasan EI, Khader TZ, Badwan AA. Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and its solid state. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45:465-71.
13. Maafi M, Maafi W. Montelukast photodegradation: elucidation of Φ-order kinetics, determination of quantum yields and application to actinometry. *Int J Pharm..* 2014;471:544-52.
14. Roman J, Breier AR, Steppe M. Stability Indicating LC Method to determination of sodium montelukast in pharmaceutical dosage form and its photodegradation kinetics. *J Chromatogr Sci.* 2011;49:540-6.
15. Alsarra I, Al-Omar M, Gadkariem EA, Belal F. Voltammetric determination of montelukast sodium in dosage forms and human plasma. *Farmaco.* 2005;60(6-7):563-7.
16. Bankar RM, Patel DB. Spectrophotometric Determination of montelukast sodium and desloratadine incombined dosage form. *Chem Tech.* 2013;5(1):136-41.
17. Singh RM, Saini PK, Mathur SC, Singh GN, Lal B. Development and validation of a RP-HPLC method for estimation of montelukast sodium in bulk and in tablet dosage form. *Indian J Pharm Sci.* 2010;72(2):235-7.

18. Radhakrishna T, Narasaraju A, Ramakrishna M, Satyanarayana A. Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;31:359–68.
19. Rote AR, Niphade VS. Determination of montelukast sodium and levocetirizine dihydrochloride in combined tablet dosage form by HPTLC and first-derivative spectrophotometry. *J Liq Chromatogr R T.* 2011;34:155-67.
20. Rawls SM, Kunk L. An automated method for the determination of montelukast in human plasma using dual-column HPLC analysis and peak height summation of the parent compound and its photodegradation product. *Pharm Res.* 2004;21:1539–44.
21. Challa BR, Awen BZ, Chandu BR, Khagga M, Kotthapalli CB. Method development and validation of montelukast in human plasma by HPLC coupled with ESI-MS/MS: application to a bioequivalence study. *Scientia Pharmaceutica.* 2010;78(3):411-22.
22. Patel NK, Subbaiah G, Shah H, Kundlik M, Sanyal M, Shrivastav PS. Rapid determination of montelukast in human plasma by LC-ESI-MS/MS and its application to a bioequivalence study. *Anal Lett.* 2009;42(13):2041-59.

Chemical stability of drugs: influence of light and temperature on montelukast stability in solution

Branka Ivković*, Milkica Crevar-Sakač, Zorica Vujić

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

*corresponding author: Tel: +38111 391335; e-mail:blucic@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

In this paper, influence of temperature and light on stability of montelukast in solutions (standard substance, chewable tablets and film coated tablets) which were prepared during routine analysis of related substances was investigated. The content of montelukast and degradation products was determined by HPLC method at defined time intervals (influence of temperature was tested at the beginning, after 24 hours, and after 48 hours, and influence of light was tested at the beginning of the experiment and after 12 hours). Stability of montelukast in tested solutions under influence of temperature was acceptable. The content of montelukast ranged from 98 % to 100 %, which meets the pharmacopoeia requirements and specifications. Individual and total impurities were within acceptable limits. Presence of photosensitive functional groups in structure of montelukast led to significant photodegradation. Individual and total impurities in samples which were under influence of light were above acceptable limits. Photodegradation occurred during first 12 hours. Content of MOK-3 sulphoxide and unknown impurity on RRT 0.76 was above limits in all examined samples. Over a period of 12 h the content of those impurities grew 8-40 fold compared to time zero values.

Key words: montelukast, stability testing, impurities, reverse-phase liquid chromatography

Prilozi – Contributions

NACIONALNI SIMPOZIJUM O LEKOVIMA

pod motom „Lekovi u zdravlju: oblikujmo našu budućnost”

National Medicines Symposium 2014, 21-23 May 2014, Brisbane (QLD,AU)

Oganizator ovog simpozijuma (koji se održava svake druge godine) je *NPS MedicineWise* (www.nps.org.au), neprofitno udruženje koje identificuje i prikuplja dokaze iz prakse i rešava izazove u oblasti korišćenja lekova. Ono okuplja sve zainteresovane strane: lekare opšte prakse, farmaceute, specijaliste, druge zdravstvene radnike, državne organe, farmaceutsku industriju, korisnike i lokalnu zajednicu sa ciljem da omogući ljudima da donose najbolje moguće odluke o lekovima i srodnim tehnologijama, kreirajući bolje zdravlje i ekonomske ishode.

Pet plenarnih sesija u tri dana, sa izvanrednim predavačima koji su ne samo eksperti nego i lideri u oblastima i temama o kojima su govorili, dali su aktuelne prikaze, pečat i lični doprinos te inspirisali učesnike (i mene) u traženjima pravih odgovora na izazovne teme u kreiranju boljeg zdravlja i društva sa kvalitetnom (racionalnom) upotrebom lekova. U tom smislu je jasno ukazano na izazove novih tehnologija/farmakoterapije i ostalih procedura u budućnosti koja je prezpoznata kroz promene u demografiji, socio-ekonomiji, kulturološkim i zdravstvenim navikama, informatičkoj pismenosti i novim komunikacijama, a što je sledstveno naslovu druge plenarne sesije - Održivost (*Sustainability*). O ovome su govorili predstavnici Ministarstva zdravlja u smislu strategija da se održi zdravstveni sistem¹ koji je kompleksan i traži struktuirano donošenje odluka; prof. Ian Frazer (*CEO and Director of Research, Translational Research Institut*) je ukazao da su istraživanja i ulaganja u nove lekove veoma skupa, rizici za prihvatljiv nivo bezbednosti novog leka/vakcine veliki, te je donošenje odluke za prihvatanje za tržište (*marketing authorisation* -

¹ Održivi zdravstveni sistem - Australija ima najbolju zdravstvenu zaštitu i dobru organizaciju zdravstvenog sistema po ocenama WHO, OECD, 2011, 2012

dozvola za lek) uvek u rukama regulative koja ponekad „visoko rangira odnos risk/benefit” što je ponekad na štetu populacije kojoj je taj lek namenjen (kada je takav lek npr. jedina opcija). I još dalje, ovi novi lekovi su skupi i često predmet pregovaranja oko cene i uključivanja u regularne zdravene tehnologije u razvijenim zemljama, a srednjerasvijenim i niskorazvijenim zemljama su teško dostupni. Otuda je ugađao pacijenata slikovito i argumentovano prikazala dr Durhane Wong-Rieger (*Institute for optimizing Health Outcomes, Canada*) kroz dileme i neke od odgovora na pitanja pacijenata: Koja prava ja imam? Šta bi ja trebalo da očekujem? Kako će se moja očekivanja i vrednosti prepoznati? Treća sesija je ukazala na potrebu adekvatnih modela za prikupljanje dokaza koji iz faze podataka, treba da daju nova znanja i smernice za donošenje odluka. U tom smislu su prikazana praktična rešenja (*MedicineInsight*, softver na web platformi koji pomaže zdravstvenim radnicima da uče na iskustvima sopstvene prakse i umreženih članova), kao i uloga virtualnih socijalnih medija od kojih se očekuje da pomognu u dostizanju boljih ishoda. Na narednoj plenarnoj sednici koja je održana kao panel eksperata govorilo se o iskustvima u primeni (*Implementation*). Vodič za kvalitetnu upotrebu lekova, indikatorima za unapređenje kvaliteta upotrebe lekova, softveru za praćenje upotrebe sedativa, pokrivenosti zdravstvene zastite i politike lekova u regionu Azija-Pacifik. Poslednjeg dana osvetljena su pitanja etike i donošenja odluke, gde je data upečatljiva poruka (*personal story Prof Sarah Winch, UQ*) da pacijenti imaju podjednaka („a mozda i najveća”) prava da odlučuju o svom zdravlju tj. da primene ili ne, i prihvate rizik za lečenje/upotrebu lekova ili drugih procedura. Zajedničko donošenje odluka na primeru nekoliko softvera koji se koriste u zdravstvenim organizacijama, ekspertskim i savetodavnim komitetima u Australiji, pokazalo je da je moguće donošenje struktuiranih odluka na bazi dobrih dokaza u zdravstvenom sistemu, no predočeno je da je primena ograničena na ciljane grupe pacijenata (npr. hemofiličari) ili pak na lokalne /regionalne zajednice gde su uključene preference PBS² ili bolničkih terapijskih komiteta. O etici i medijima koji mogu da pomognu/ili odmognu boljem zdravlju za pojedinca, društvo, zdravstvo i industriju lekova, veoma upečatljivo, kritički, objektivno i etično govorio je Gary Schwitzer (*HealthNewsReview.org*, USA), publicista, aktivista i predsednik američkog udruženja novinara koji prate zdravstvo.

Usmene prezentacije su se odvijale sva tri dana u pet paralennih sekcija nakon plenarnih predavanja, a tematski su grupisane da bliže osvetle plenarne teme. Istraživači su prikazali značajne rezultate iz studija koje su sprovedene većim delom u bolnicama (opštim i specijalizovanim), u domovima za stare i kojim su osvetljeni problemi kvalitetne upotrebe lekova (antibiotici, lekovi za palijativnu negu), dostupnost lekova u vulnerabilnim grupama, a i prikazana su brojna praktična rešenja za ove probleme

² PBS (*Pharmaceutical Benefit Scheme*) - šema za refundaciju lekova u Australiji

(sprovodenje terapije, nadzor, konsultacije). Brojni deo usmenih prezentacija i postera bio je posvećen pacijentima, zdravstvenim radnicima (kliničarima) i njihovim pravima i modalitetima za zajedničko odlučivanje o primeni terapije, adherence, proceni rizika i sl. Uloga kliničkih farmaceuta u bolnicama u Australiji je jasna i regulisana, ali je iskazana potreba za boljom pozicijom u integrisanoj nezi u ambulantnoj praksi i podršci zdravstvenim kampanjama u lokalnoj zajednici. Metodologija svih saopštenja (usmenih i poster) je data na visokom naučnom nivou uz dominaciju kvalitativnih studija i interventnih postmarketinskih studija. Kuriozitet je da je Simpozijum virtualno pratilo preko 300 učesnika, *on site* je bilo preko 500 učesnika, a twitovanje je bilo posebno aktivno tokom plenarnih diskusija. Poster sekција je održana u e formi (pdf ili ppt dokument) u foajeu kongresnog centra na ekranima sa *tač skrinom* te je svaki učesnik mogao da pristupi svim posterima sve vreme konferencije (scan code data matrix omogućava dostupnost svih abstrakta i postera). Druželjubivost, prijatna atmosfera, dobra organizacija i profesionalnost bila je prisutna i tokom društvenih aktivnosti - koktela dobrodošlice i zajedničke večere gde su dodeljene nagrade za najbolji poster, najbolju akciju u lokalnoj zajednici, najinventivniji pristup u upotrebi lekova. Na večeri su se družili lekari, farmaceuti, sestre, novinari, pacijenti u zajedničkoj želji da kreiraju ambijent za kvalitetnu (racionalnu) upotrebu lekova koja će za ishod imati bolje zdravlje u bližoj (2025.) budućnosti koja već danas u Australiji izgleda prilično „virtualno”, no ipak sa prelepom prirodom koja je dovoljno realna i očuvana te obećava „zdravlje”.

24.05.2014. Brisbane

Prof. dr Ljiljana Tasić

Visiting professor

School of Pharmacy,
University of Queensland

**IZVEŠTAJ SA 62. SIMPOZIJUMA
SAVEZA FARMACEUTSKIH UDRUŽENJA SRBIJE**

Organizator: Savez farmaceutskih udruženja Srbije

Vreme i mesto: Kopaonik, 12.06.-15.06.2014.

12.06.2014.

17.30-18.00 Otvaranje 62. simpozijuma i najava VI kongresa farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, prof. dr Ivanka Miletić i prof. dr Vesna Matović

18.00-18.30 ELI LILY: Život bez erektilne disfunkcije, prof. dr Aleksandar Vuksanović, Klinika za urologiju, Klinički centar Srbije

18.30-19.00 RICHTER GEDEON: Gynofort®- inovativna tehnologija u lečenju vulvovaginalne kandidijaze, asist. dr sci. Marija Milić

13.06.2014.

Kurs 1.

Razvoj i kvalitet farmaceutskih usluga u zdravstvu Srbije

Rešenje broj: 153-02-535/2014-01 od 3.03.2014.

Oznaka kursa: 58/14

Broj bodova za učesnike: 6

Broj bodova za predavače: 11

Kurs je akreditovan za farmaceute, farmaceute specijaliste farmaceutske zdravstvene zaštite i farmaceute specijaliste farmakoinformatike

Ciljevi kursa:

1. razvoj farmaceutskih usluga kao deo savremenog poslovanja apoteke
2. nacionalni okvir za procenu kompetencija u farmaciji i načini procene
3. razvoj novih usluga u bolničkoj farmaciji
4. razvoj farmaceutske usluge u odabiru dijetetskih proizvoda
5. dijetetski proizvodi –promocija zdravlja i smanjenje rizika od hroničnih nezaraznih bolesti

PROGRAM KURSA 1.

Moderator: Svetlana Stojkov

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.00-9.45	Razvoj farmaceutskih usluga u apoteci-izazov za savremeno poslovanje	predavanje	Sanja Jović
9.45-10.30	Kompetentnost farmaceuta kao preduslov kvaliteta farmaceutske usluge	predavanje	Svetlana Stojkov
10.30-11.00	Pauza		
11.00-11.45	Uloga i kompetencije bolničkog farmaceuta – mogući pravci razvoja	predavanje	Mirjana Antunović
11.45-12.30	Dijetetski proizvodi u promociji zdravlja- uloga farmaceuta	predavanje	Brižita Đorđević
12.30-13.00	Diskusija		
13.00-14.00	Pauza za ručak		
14.00-16.30	Deklaracije dijetetskih proizvoda i moguće interakcije Procena i samoprocena kompetencija- primeri primene Nacionalnog okvira za procenu kompetencija	radionice	Brižita Đorđević Svetlana Stojkov Sanja Jović
16.30-17.00	test Evaluacija kursa		

Satelitski simpozijum

17.00-17.30 TAKEDA GMBH: Smernice za farmaceute: savremena terapija poremećaja gornjeg GIT-a prof. dr Miodrag Krstić, Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju, Klinički centar Srbije; prof. dr Branislava Miljković, Katedra za farmakokinetiku i kliničku farmaciju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

- 17-30-18.00 BERLIN-CHEMIE MANARINI:** Nobel (otmeni) organ,
prof. dr Miodrag Krstić, Klinika za gastroenterologiju i
hepatologiju, Klinički centar Srbije
- 18.00-18.30 BOEHRINGER INGELHEIM SERBIA:** Bisolvon u 21.veku,
prof. dr Branimir Nestorović, Univerzitetska dečija klinika
- 18.30-19.00 IVANČIĆ I SINOVI:** Funkcionalne bolesti digestivnog trakta –
kako savetovati pacijenta koji ima stomačne tegobe,
prof. dr Miodrag Krstić, Klinika za gastroenterologiju i
hepatologiju, Klinički centar Srbije
Probiotici Ivančić i sinovi – kako stomak kaže...,
mr ph. Nenad Milivojević, marketing menadžer Ivančić i sinovi
- 19.00-19.30 PHOENIX:** Višekanalne strategije u farmaceutskom biznisu,
dr Dragan Stojković, Ekonomski fakultet

14.06.2014.

Kurs 2.

Farmaceutske usluge – zdravstvena, društvena i ekomska odgovornost

Rešenje broj: 153-02-535/2014-01 od 3.03.2014.

Oznaka kursa: 30/14

Broj bodova za učesnike: 6

Broj bodova za predavače: 12

Kurs je akreditovan za farmaceute, farmaceute specijaliste farmaceutske zdravstvene zaštite i farmaceute specijaliste farmakoinformatike

Ciljevi kursa

1. upoznavanje sa pojmom i strukturom farmaceutskih usluga
2. upoznavanje sa pojmom kompetencije farmaceuta i načinima za razvoj kompetencija
3. upoznavanje sa ulogom farmaceuta u javnom zdravlju
4. upoznavanje sa pojmom socijalna farmacija i društvena odgovornost farmaceuta
5. analiza ekonomskog uticaja na savremeno poslovanje farmaceuta

PROGRAM KURSA 2.

Moderator: Dušanka Krajnović

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.00-9.45	Farmaceutske usluge: šta, kada i kako?	predavanje	Ljiljana Tasić, Valentina Marinković
09.45-10.30	Performanse i kompetencije farmaceuta za kvalitetne usluge	predavanje	Dušanka Krajnović, Ivana Tadić
10.30-11.00	Pauza		
11.00-11.45	Socijalna farmacijja, marketing javnog zdravlja i društvena odgovornost farmaceuta	predavanje	Ivana Tadić, Marina Odalović, Dušanka Krajnović
11.45-12.30	Ekonomski implikacije savremenog poslovanja u apoteci	predavanje	Dragana Lakić, Valentina Marinković
12.30-13.30	Pauza za ručak		
13.30-15.00	Radionica br. 1: Indikatori kvaliteta farmaceutskih usluga (primeri iz prakse)	vežbe	Sanja Jović, Ivana Popović
15.00-16.30	Radionica br. 2: Novi model marketinga proizvoda i usluga u apoteci	vežbe	Svetlana Vuksanović -Pintar, Dragana Jocić, Velibor Ilić

Satelitski simpozijumi

17.00-17.30 ASTRA ZENECA: Inhalatorna terapija – adekvatni saveti za pacijente, dr Dejan Žujović, Gradski zavod za plućne bolesti i tuberkulozu, Beograd

17.30-18.00 PHARMASWISS: : Sastojci i efekti masnih/ emolijentnih kremova za suvu i kožu sa ekcemom - savremeni stavovi, prof. dr Gordana Vuleta, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju

- 18.00-18.30 PHARMASWISS: Zineryt® – mesto u topikalnoj terapiji akni,
doc. dr Željko Mijušković, Vojnomedicinska akademija, Klinika
za kožne i polne bolesti**
- 18.30-19.00 NELT: Nurofen® u terapiji tenzione glavobolje,
doc. dr Maja Tomić, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u
Beogradu**
- 19.00-19.30 ABBOTT: Šta farmaceut treba da zna o nesteroidnim
antiinflamatornim lekovima?
prof. dr Radica Stepanović-Petrović, Farmaceutski fakultet,
Univerzitet u Beogradu**

Prezentacije predavanja su objavljene na CD-u.

Simpozijumu je prisustvovalo **659** registrovanih učesnika.

Tokom održavanja simpozijuma učesnici su posetili izlagače i razgovarali sa stručnim saradnicima o novim lekovima, medicinskim sredstvima i dijetetskim proizvodima.

Posebnu zahvalnost dugujemo mladim koleginicama: *Zorani Miladinović, Darki Petrović, Sonji Rankov i Bojani Tešić* za veliku pomoć u distribuciji štampanog materijala, registraciji učesnika, izdavanju uverenja.

Zahvaljujemo se svim kolegama koji su svojim prisustvom podržali ovaj skup i svim onima koji su popunili Anketu i na taj način nam omogućili da procenimo uspešnost skupa i da se upoznamo sa interesovanjima, primedbama i predlozima, kako bismo ubuduće organizovali još uspešnije simpozijume.

**ANALIZA ANKETE SPOROVEDENE NA 62. SIMPOZIJUMU
UKUPNO REGISTROVANIH UČESNIKA 659**

OBRADA ANKETNOG UPITNIKA - KURS 1

UKUPNO UPITNIKA 352 53,42 % registrovanih učesnika

1. Šta Vas je opredelilo da dođete na Simpozijum?

1. Tema	64
2. Bodovi	46
3. Mesto održavanja	10
4. Edukacija	53
5. Druženje	40
Ukupno	213
Nije odgovorilo	139

2. Opšta ocena Simpozijuma

1. Odličan	209
2. Vrlo dobar	107
3. Dobar	16
4. Zadovoljava	6
5. Ne zadovoljava	0
Ukupno:	338
Nije odgovorilo	14

3. Da li ste zadovoljni?

1. Organizacija

1. Veoma zadovoljan	233
2. Zadovoljan	108
3. Nisam zadovoljan	1
Ukupno:	342
Nije odgovorilo	10

2. Sala

1. Veoma zadovoljan	232
4. Zadovoljan	106
5. Nisam zadovoljan	10
Ukupno:	348
Nije odgovorilo	4

3. Oprema

1. Veoma zadovoljan	235
2. Zadovoljan	110
3. Nisam zadovoljan	3
Ukupno:	348
Nije odgovorilo	4

4. Šta Vam se najviše dopalo?

1. Tema i predavanja	67
2. Predavači	7
3. Radionica	20
4. Organizacija	19
5. Druženje	15
6. Satelitski simpozijumi	29
Ukupno:	157
Nije odgovorilo	195

5. Šta Vam se nije dopalo?

1. Sala	2
2. Predavanja	7
3. Mesto održavanja	1
Ukupno:	10
Nije odgovorilo	342

Opšta ocena Kursa 1: 4,53

OCENE PREDAVAČA - KURS 1

	PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	rang
1	SANJA JOVIĆ	262	60	18	4	1	4,68	2
2	SVETLANA STOJKOV	268	48	25	3	0	4,69	1
3	MIRJANA ANTUNOVIĆ	242	70	18	5	0	4,64	3
4	BRIŽITA ĐORĐEVIĆ	248	68	20	6	0	4,63	4
	RADIONICE							
1	BRIŽITA ĐORЂEVIĆ radionica	248	64	17	5	1	4,65	3
2	SVETLANA STOJKOV radionica	250	61	14	4	0	4,69	2
3	SANJA JOVIĆ radionica	250	60	15	3	0	4,70	1

OBRADA ANKETNOG UPITNIKA - KURS 2

Šta Vas je opredelilo da dođete na Simpozijum?

- | | | |
|----|-----------------|-----|
| 1. | Tema | 40 |
| 2. | Bodovi | 45 |
| 3. | Edukacija | 73 |
| 4. | Druženje | 24 |
| | Ukupno | 182 |
| | Nije odgovorilo | 162 |

1. Opšta ocena Simpozijuma

- | | | |
|----|-----------------|-----|
| 1. | Odličan | 199 |
| 2. | Vrlo dobar | 90 |
| 3. | Dobar | 26 |
| 4. | Zadovoljava | 10 |
| 5. | Ne zadovoljava | 0 |
| | Ukupno: | 286 |
| | Nije odgovorilo | 19 |

2. Da li ste zadovoljni?

1. Organizacija

1.	Veoma zadovoljan	231
2.	Zadovoljan	97
3.	Nisam zadovoljan	0
	Ukupno:	328
	Nije odgovorilo	16

2. Sala

1.	Veoma zadovoljan	227
2.	Zadovoljan	96
3.	Nisam zadovoljan	12
	Ukupno:	335
	Nije odgovorilo	9

3. Oprema

1.	Veoma zadovoljan	231
2.	Zadovoljan	101
3.	Nisam zadovoljan	1
	Ukupno:	333
	Nije odgovorilo	11

4. Šta Vam se najviše dopalo?

1.	Predavanja	59
2.	Teme	28
3.	Radionice	19
4.	Organizacija	37
5.	Druženje	20
6.	Satelitski simpozijumi	26
	Ukupno:	189
	Nije odgovorilo	155

5. Šta Vam se nije dopalo?

- | | |
|------------------------|------------|
| 1. Sala | 5 |
| 2. Mesto održavanja | 1 |
| 3. Predavanja | 4 |
| 4. Štandovi | 2 |
| Ukupno: | 12 |
| Nije odgovorilo | 332 |

Opšta ocena Kursa 2: **4,47**

OCENE PREDAVAČA - KURS 2

	PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	rang
1	VALENTINA MARINKOVIĆ	229	80	15	6	2	4,59	5
2	DUŠANKA KRAJNOVIĆ	238	72	13	7	0	4,64	3
3	IVANA TADIĆ	244	66	12	6	1	4,66	2
4	MARINA ODALOVIĆ	225	80	13	5	0	4,63	4
5	DRAGANA LAKIĆ	234	69	13	4	0	4,70	1
	RADIONICE							
1	SANJA JOVIĆ radionica	245	58	12	5	0	4,69	1
2	IVANA POPOVIĆ radionica	234	68	14	3	0	4,67	2
3	DRAGANA JOCIĆ radionica	226	67	14	5	0	4,66	3
4	SVETLANA VUKSANOVIC-PINTAR radionica	229	62	14	5	0	4,66	3

Stručni i Organizacioni odbor 62. simpozijuma SFUS
Beograd, 10.07.2014.

IZVEŠTAJ SA 16. RIJEČKIH DANA (BIO)ETIKE „ETIKA U NAUČNIM ISTRAŽIVANJIMA”

Rijeka, 9. maj 2014. godine

Ove godine, Riječki dani bioetike, šesnaesti po redu, održani su 9. maja 2014. godine u Velikoj dvorani Odseka za biotehnologiju u Rijeci (Republika Hrvatska). Organizatori skupa bili su Katedra za društvene i humanističke nauke u medicini i Katedra za socijalnu medicinu i epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Rijeci, Odsek za biotehnologiju, Ured za nauku Studentskog zbora i Dokumentaciono-istraživački centar za evropsku bioetiku „Fritz Jahr“ Univerziteta u Rijeci.

Glavna tema skupa bila je *Etika u naučnim istraživanjima*, a poziv za učešće, kao i svake godine, upućen je i Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odnosno nastavnicima Katedre za socijalnu farmaciju i farmaceutsko zakonodavstvo.

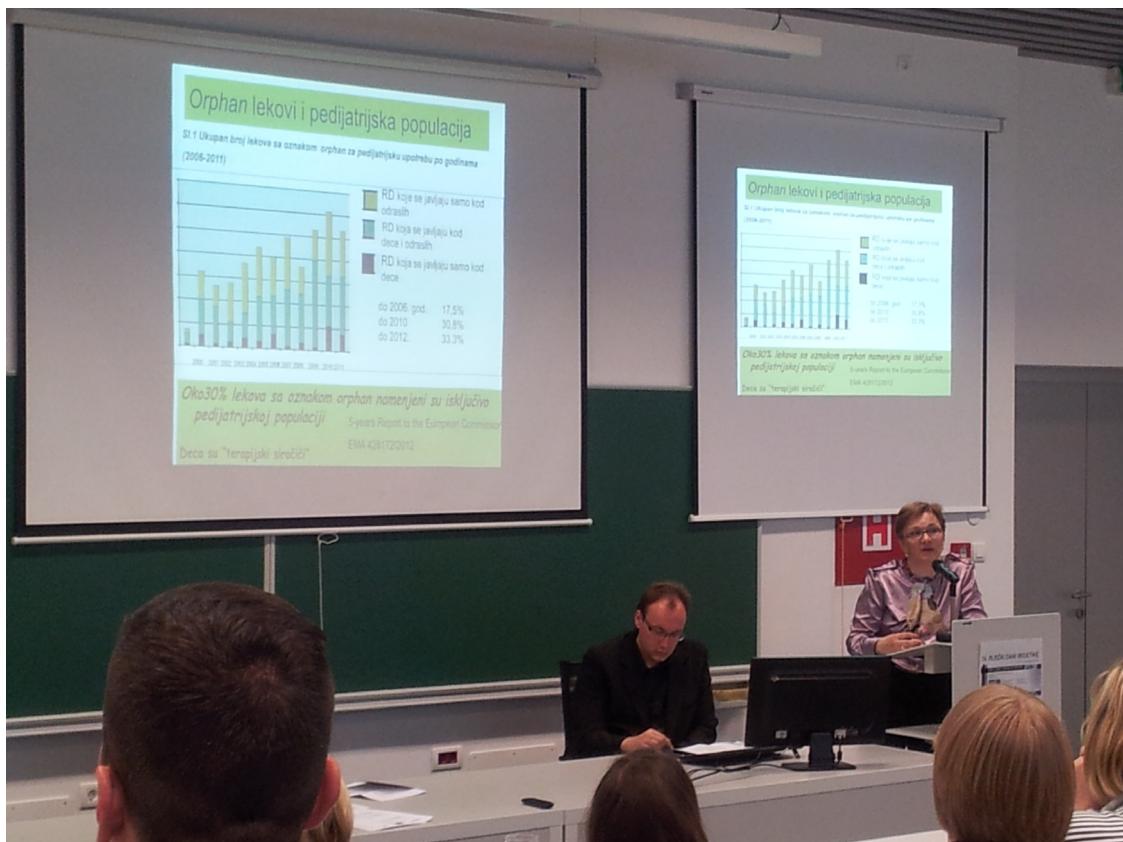
Učešće u radu uzeo je najveći broj istraživača iz univerzitetskih centara zemlje domaćina, ali i iz zemalja balkanske regije - Srbije, Makedonije i Bosne i Hercegovine. Održano je 5 sesija u okviru kojih su učesnici imali priliku da slušaju 5 uvodnih predavanja, 26 usmenih izlaganja i jedno poster saopštenje. Mali kuriozitet predstavlja činjenica da je upravo poster saopštenje bilo iz Srbije.

Prva sesija započela je pozivnim plenarnim predavanjem o akademskom integritetu vrednosti i moralnim načelima koja su bitna kod sprovođenja naučno-istraživačkog rada. U svojim izlaganjima mnogi autori predstavili su brojne etičke probleme u naučnim istraživanjima, počev od uticaja politike, ideologije i kapitala do savremenog doba, u kome se istraživanja selektivno publikuju i sponzorišu od strane proizvođača opreme i sredstava za dijagnostiku i lečenje. Raspravljalo se o pitanju moralnog integriteta sadašnjih istraživača koji svoja znanja, etičke principe i moralne vrednosti treba da primene na uspešnu edukaciju studenata, kao i o veštinama moralnog rasuđivanja, razvoju moralne osjetljivosti i o veštini kritičkog mišljenja.

Jedna od sesija otvorena je plenarnim predavanjem na temu upravljanja akademskim centrima, odnosno etičnosti podržavanja loših lidera. Porast broja roditelja koji odbijaju da vakcinišu svoju decu uprkos kaznama, tema je koja je bila razmatrana iz ugla ostvarenja javnog zdravlja i ljudskih prava.

Informisani pristanak u psihološkim istraživanjima u kojima je u svrhu zaštite prava, dostojanstva i dobrobiti učesnika potrebno osigurati pravo ispitanika da sami odluče da li žele da učestvuju u istraživanju, razmatran je u okviru principa informisanosti i autonomije. Posebno je bio razmatran plagijarizam u naučnim istraživanjima, a u svetlu nedavnih naučnih etičkih afera sa političkom konotacijom u Nemačkoj, Mađarskoj, Rumuniji i Hrvatskoj.

Tradicionalno, kao i prethodnih godina, skup je zatvorila studentska sesija sa kontroverznim pitanjem gubitka originalnosti ličnosti upotreboom 3D printinga kao procesa pomoću kojeg se stvara trodimenzionalni čvrsti objekt bilo kojeg oblika putem kompjuterskog modeliranja.



Ovom naučnom skupu prisustvovali su učesnici iz Srbije, a od farmaceuta aktivno učešće uzele su kolege sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Dušanka Krajnović i Jelena Manojlović) i iz Apoteke Vranje (Jasmina Arsić). Usmeno izlaganje rada pod nazivom „Etička pitanja u pedijatrijskim kliničkim studijama: izazovi i problemi kod pacijenata sa retkim bolestima“ imala je Dušanka Krajnović u koautorstvu sa Jasminom Arsić. Rezultate iz oblasti empirijske etike u domenu farmaceutske prakse

prezentovale su mlađe kolege Jelena Manojlović, Andrijana Milošević Georgiev, Jasmina Arsić i Nikolina Mihajlović pod mentorstvom Dušanke Krajnović, kroz poster saopštenje na temu: „Informisana saglasnost u istraživanjima farmaceutske prakse: iskustvo iz Srbije”.

U prijatnoj akademskoj atmosferi i ovi 16. dani bioetike ostaće upamćeni po zanimljivim i aktuelnim temama koje su se nametnule u dinamičnom vremenu napretka tehnologije, kada je regulativa bavljenja naučnim istraživanjima sve stroža. Predavači različitih profila, istraživačkog iskustva i sfera interesovanja (dominantno iz biomedicine), poneće, kao i autor ovog priloga, snažan utisak da su nam ovakvi skupovi potrebni da bismo se iznova podsećali da je pošten rad jedina zdrava osnova daljeg napretka nauke.

Dušanka Krajnović

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
Katedra za socijalnu farmaciju i farmaceutsko
zakonodavstvo

**IZVEŠTAJ SA 9TH WORLD MEETING ON PHARMACEUTICS,
BIOPHARMACEUTICS AND PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY**

Od 31. marta do 3. aprila 2014. godine u Lisabonu (Portugalija) održan je skup pod nazivom *9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology* (*9th PBP World Meeting*). Ovaj skup se održava periodično, na svake dve godine i svaki put okupi veliki broj učesnika iz celog sveta. Ove godine je skupu prisustvovalo oko 1200 učesnika, sa oko 1/3 predstavnika iz industrije, dok su ostatak činili zaposleni u akademskim institucijama i studenti doktorskih studija. Glavni organizatori ovogodišnjeg skupa bili su: *International Association for Pharmaceutical Technology* (APV), Nemačka; *International Society of Drug Delivery Sciences and Technology* (APGI), Francuska; *Italian Association for Pharmaceutical Technology and Legislation* (A.D.R.I.T.E.L.F.), Italija.

U toku četiri dana trajanja skupa održan je veliki broj predavanja (44 predavanja po pozivu i 66 kratkih predavanja o odabranim temama), raspoređenih u četiri paralelne sesije (u prepodnevnim i popodnevnim terminima): *Solid Dosage Forms, Coated Dosage Forms, Protein and Nucleotide Formulations, Pharmacokinetics and IVIV Correlations, Advanced Analytics, Protein Formulation and Aggregation, Dermal and Transdermal Delivery, Liposomes and other advanced DDS, Drug Nanoparticles and Vesicles, Tissue Engineering and ATMP, Continuous Manufacturing, Preformulation and Physical Pharmaceutics, Patient-centred Medicines, Green and Sustainable Pharma, Controlled Drug Delivery, Nanoparticles, Oral Drug Delivery, Site-specific drug delivery, Pharmaceutical Engineering and Green Manufacturing, Generics and Biosimilars, Skin, Nose and Lung Delivery, Pharmaceutical Engineering i Poorly Soluble Drugs*. Pored plenarnih predavanja, izloženo je i nekoliko usmenih predavanja od strane predstavnika iz akademskih i istraživačkih institucija, kao i iz farmaceutske industrije. Nakon svakog predavanja bilo je prostora za javnu diskusiju. Pored ovoga, izložen je i veliki broj poster prezentacija (preko 900). U okviru ove sesije svojim radovima su se predstavili i farmaceuti/istraživači iz naše zemlje.

Osnovne teme o kojima se diskutovalo na PBP skupu odnosile su se na razvoj biorelevantnih testova za *in vivo* određivanje i *in vitro* predviđanje biofarmaceutskih

svojstava lekovitih supstanci/farmaceutskih preparata, savremene tehnike za formulaciju i analizu farmaceutskih preparata/terapijskih sistema (uključujući i nanosisteme i biotehnološke lekove). Razmatrana su i pitanja vezana za personalizovani pristup terapiji, naročito za preparate koji se primenjuju u pedijatriji i gerijatriji. Na skupu je bilo reči i o procesu pripreme i mogućnostima za prijavu projekata u okviru programa *Horizon 2020*.

Simpozijum je otvoren uvodnim izlaganjem predstavnika organizatora skupa, nakon čega je ukratko predstavljen novi *Horizon 2020* projekat, a zatim je održano nekoliko predavanja vezanih za industrijski aspekt proizvodnje lekova i falsifikovanje lekova (u zemlji domaćina–Portugaliji, kao i u Francuskoj i Velikoj Britaniji). Veliku pažnju privuklo je predavanje *Drug Counterfeiting* u kome je Frédéric Bourgeois (Sanofi, Francuska) istakao da je falsifikovanje farmaceutskih supstanci i lekova samo vidljivi deo ledenog brega, navodeći da su najveći tokovi falsifikovanih lekova u Kini, Indiji, Rusiji, Meksiku i Kolumbiji. Bourgeois je prikazao strategiju koju ima Sanofi za borbu protiv falsifikovanja, a koja se sastoji u dobro definisanim, kontrolisanim i doslednim tokovima distribucije/transporta lekova, aktivnom nadzoru tržišta i zaštiti pakovanja. Predstavljena su tri nivoa zaštite pakovanja, kao i tehnologije za njihovo postizanje: integritet proizvoda – sklopljena kutija sa zasećenim kartonom i lepkom ili pečatom koji štiti od neovlašćenog otvaranja spoljnog pakovanja; autentičnost proizvoda – zaštita kao kod novčanica i pasoša stavljanjem bezbednosnih oznaka (primer je Plavix); identifikacija proizvoda – kodiranje/serijalizacija (danas: linearni barkod, u budućnosti: broj proizvoda, serijski broj i datum isteka roka upotrebe u jednom kodu). Sanofi ima laboratoriju protiv falsifikovanja (LCAC) u kojoj svaki sumnjivi lek podleže strogoj i sveobuhvatnoj kontroli.

U okviru naučnog programa skupa (1–3. april) održana su tri plenarna predavanja. Prvo predavanje pod nazivom *Nanomedicines* održao je profesor Alexander (Sasha) Kabanov sa Univerziteta u Severnoj Karolini, SAD. Prof. Kabanov je govorio o blok kopolimerima u razvoju lekova i nanomedicini, navodeći, na osnovu rezultata sprovedenih studija, potencijalne prednosti blok kopolimernih micela u pogledu povećanja rastvorljivosti, smanjenja toksičnosti i povećanja kapaciteta inkorporiranja antikancerskih lekova. Kao jedan od obećavajućih polimera u razvoju farmaceutskih formulacija predstavljeni su poli(2-oksazolin)-i (POx) koji se proizvode veoma preciznom „*ring-opening*“ polimerizacijom, a karakteriše ih niska toksičnost, slaba aktivacija komplementa i veoma veliki kapacitet za inkorporiranje brojnih hidrofobnih lekova. Prof. Kabanov je takođe govorio o primeni amfifilnih Pluronic® blok kopolimera kao funkcionalnih ekscipijenasa u lečenju karcinoma rezistentnih na lekove i protiv kancerskih stem ćelija, zahvaljujući njihovoj sposobnosti da povećaju osetljivost kancerskih ćelija na različite antikancerske lekove, naročito antraciklinske antibiotike. Poslednji deo ovog plenarnog predavanja bio je posvećen polimernim micelama sa

umreženim jonskim jezgrima (umrežene micle, nanogelovi) za isporuku antikancerskih lekova. Prikazan je primer tumor-specifične isporuke cisplatina i doksorubicina u tumorske ćelije *in vivo* upotreboom polielektrolitnih nanogelova obloženih folatom, čime je postavljena osnova za budući klinički razvoj ovakvih nanoformulacija.

Drugo plenarno predavanje *Pediatric medicines – Guidelines: How to formulate?* održala je Diana van Riet-Nahles (Nacionalni institut za javno zdravlje i životnu sredinu (RIVM), Holandija), pri čemu je u četiri koraka, kroz vremensku skalu od 2006. do 2015. godine, prikazan put razvoja smernica za pedijatrijske lekove. Trenutno je u toku pisanje smernica od strane multidisciplinarnе desetočlane grupe ljudi (kliničari, bolnički farmaceuti, naučnici...), a nacrt R1 otvoren je za javne konsultacije. Planirano je da 2015. godine stupi na snagu vodič koji će sadržati određene standarde za inovativne i generičke proizvode, a industrija će morati da preradi Direktivu 2001/83/EC Aneks 23. Drugim rečima, prilikom podnošenja zahteva za stavljanje leka u promet podnositac prijave će, na primer, morati da opravda, u skladu sa vodičem, izbor svake formulacije ili farmaceutskog oblika. Zajedničko pisanje smernica sa predstavnicima industrije, međutim, nije moguće. U nastavku predavanja Diana van Riet-Nahles je prikazala sadržaj i ključne aspekte Smernice za farmaceutski razvoj lekova za pedijatrijsku upotrebu (*Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use*), ističući da je smernačica zasnovana na dokazima, ne na percepciji. Tom prilikom se posebno osvrnula na izbor farmaceutskog oblika zavisno od puta primene i godina deteta, rukovanje peroralnim lekovima (primena sa jogurtom, mlekom, sokom; deljenja tableta), prihvatljivost od strane pacijenata (integralni deo razvoja formulacije; ispituje se kod dece kao deo kliničkih studija; industrija može da odabere sopstveni pristup), kao i na ekscipijense u pedijatrijskim lekovima. Studije su pokazale da nakon uvođenja ovog vodiča nije učinjen značajan pomak na tržištu, ali se očekuje napredak u budućnosti.

Treće plenarno predavanje *Overcoming drug biological barriers from the cell membrane to the mucosa* održala je profesor Maria Jose Alonso sa Univerzitetom Santiago de Compostela u Španiji, inače ovogodišnja dobitnica nagrade Maurice Marie Janot. Prof. Alonso se ovom prilikom osvrnula na svoj višegodišnji rad i profesionalni razvoj, počevši od najranijih studija sa mikro i nanočesticama, preko rada na mikrosferama i sistemima za isporuku vakcina, do razvoja savremenih terapijskih sistema koji sadrže proteine (npr. DNK). Pri tome je pomenula da, iako danas postoje brojni radovi na temu, na primer, nanočestica sa hitozanom, u većini tih radova se citiraju rezultati koje je sa svojim timom dobila prof. Alonso. U poslednjih nekoliko godina istraživanja prof. Alonso i timova širom sveta sa kojima sarađuje, fokusirana su na razvoj nanonosača za okularnu i nazalnu isporuku leka, za gensku terapiju i isporuku vakcina neinvazivnim metodama. Pored toga, bavi se razvojem novih nosača za antigene (npr. multifunkcionalni nanonosači, nanopakovani antigeni) i farmaceutskih

oblika za oralnu isporuku proteina (npr. insulin). U okviru ovih ispitivanja razvijen je i novi „*Zebra fish model*“, kao i 3D *in vitro* model ćelijske kulture, tzv. „veštački limfni čvor“ za procenu toksičnosti leka i njegove sposobnosti da prođe kroz biološke membrane.

Pored plenarnih predavanja, sa velikom pažnjom ispraćena su i predavanja po pozivu, kao i kratka predavanja. U okviru sesije *Advanced Analytics* koja je održana drugog i trećeg dana skupa predstavljene su nove metode, kao i nova polja, odnosno, mogućnosti za primenu konvencionalnih i/ili modifikovanih konvencionalnih metoda za analizu materijala, proizvoda i postupaka u razvoju, proizvodnji i kontroli farmaceutskih preparata. Prvo predavanje pod nazivom *Advanced synchrotron-based imaging techniques to support the formulation, manufacturing processes and evaluation of drug effects* održao je dr Jean Doucet. Dr Doucet je izložio prednosti metode zasnovane na sinhrotron radijaciji koja predstavlja vrstu elektromagnetskog zračenja koja produkuje čestice izuzetno velike energije. Difrakcija X-zraka zasnovana na sinhotron radijaciji omogućava pregled strukture tablete ili filma i pruža bolji uvid u promene u formulaciji u toku proizvodnje ili u toku čuvanja. Prikazan je primer kako se ovom metodom može detektovati promena u filmu tablete nakon tri meseca čuvanja tablete, pri čemu se jasno izdvajaju dve zone (spoljašnja i unutrašnja) unutar filma sa različitim koncentracijama sredstva za oblaganje. U okviru ove sesije može se istaći predavanje pod nazivom *In vivo imaging techniques* koji je održao renomirani profesor Clive Wilson sa Strathclyde Univerziteta u Škotskoj, u kome su opisane tehnike izvođenja, kao i mogućnosti primene različitih metoda za vizuelno praćenje prolaska leka kroz organizam. Profesor Wilson je, na izabranim primerima, prikazao rezultate ispitivanja apsorpcije uz pomoć Gama kamere, počevši od opisa prvih eksperimenata, koji su podrazumevali primenu prostih, improvizovanih metoda i rad sa eksperimentalnim životinjama, do novijih, sofisticiranih sistema koji podrazumevaju primenu posebno dizajniranih uređaja i farmaceutskih preparata prilagođenih za ovu vrstu analize (npr. Pulsincap kapsule) i koji su prilagođeni za ispitivanja na ljudima. Poslednje predavanje na ovoj sesiji drugog dana skupa pod nazivom *Scanning white light interferometry (SWLI)* održao je profesor Niklas Sandler sa Abo Akademi Univerziteta u Finskoj. U toku predavanja opisana je napredna metoda mikroskopije koja objedinjuje interferometriju i mikroskopiju pri čemu je omogućeno 3D beskontaktno snimanje površine materijala. Ova tehnika može da se koristi za karakterizaciju tankih filmova, strukture polimera kao i karakterizaciju mikro i nanočestica izrađenih od polimera.

U okviru sesije *Dermal and Transdermal Delivery* koja je održana drugog dana skupa u prepodnevnim časovima predstavljene su nove metode za dobijanje, kao i nova polja, odnosno, mogućnosti za primenu konvencionalnih i/ili novih nosača za isporuku lekova na/ kroz kožu, kao i različite analitičke metode koje se koriste u njihovoj karakterizaciji.

U okviru predavanja pod naslovom *New insight into establishments and analysis of an improved human in vitro wound model* koje je održala dr Maike Windbergs (Department of Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Saarland University, Saarbrücken, Nemačka) prikazan je *in vitro* model za simuliranje rana kod ljudi koji bi mogao biti od koristi u biofarmaceutskoj karakterizaciji sistema za isporuku lekova. U okviru ovog predavanja autorka je iznela najvažnije karakteristike ovog novog modela, koji između ostalog karakteriše linearna pravougaona geometrija rana sa definisanim ivicama, koje su u potpunosti okružene intaktnom kožom. Kao jednu od prednosti ovog *in vitro* modela, autori ističu konzistentan izgled rane celom dužinom, čime se približnije simuliraju realni *in vivo* uslovi. Takođe se navodi da je metod za pripremu ovog modela relativno jednostavan i reproduktivan, te se očekuje da će moći da nađe primenu u budućnosti. Pored toga, autori su predstavili i optičku profilometriju, kao neinvazivnu analitičku metodu za karakterizaciju rana, kojom se sa visokom preciznošću u tri dimenzije može sagledati površinska topografija i geometrija rana.

Na predavanju pod nazivom *Ex vivo and in vivo evaluation of the efficiency of calixarene formulations for the treatment of superficial wounds contaminated by uranium* koje je održala Sophie Grives, student doktorskih studija (Galen Institute Paris-Sud, School of Pharmacy, Francuska) prikazan je razvoj, *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* karakterizacija nanoemulzija koje sadrže helatni agens kaliksaren. Autorka je navela da kaliksaren koji je lokalizovan u međufazi u/v nanoemulzija može da veže jone uranijuma iz vodenog rastvora kontaminiranog uranijumom, čime se smanjuje mogućnost prolaska uranijuma kroz intaktnu kožu ili kožu zahvaćenu ranama. Ova formulacija bi mogla naći svoju primenu u situacijama u kojima je potrebno u kratkom vremenskom intervalu izvršiti dekontaminaciju kože od uranijuma. Rezultati *in vivo* studija koji su izvedeni na pacovima potvrdili su efikasnost razvijene formulacije, s obzirom da je transkutana penetracija uranijuma smanjena za oko 90 % nakon primene nanoemulzija sa kaliksarenom u poređenju sa prečišćenom vodom koja sadrži uranijum. Uz to, autori su razvili dva modela kojima se simuliraju površinske rane na koži, koji bi se mogli koristiti za dalju procenu efikasnosti nanoemulzija sa kaliksarenom.

Dr Lovisa Ringstad (Institute for Surface Chemistry, Stockholm, Švedska) održala je predavanje pod nazivom *Tactile perceptions of topical formulations*. Tokom ovog predavanja opisano je na koji način se senzorne osobine preparata za kožu mogu dovesti u vezu sa fizičkim (reološkim) osobinama formulacije.

Dr Sara Raposo (Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon, Portugalija) održala je predavanje pod naslovom *Mometasone Furoate - loaded cold processed oil-in-water emulsions: in vitro and in vivo studies* u okviru koga je iznela najznačajnije prednosti u/v emulzija koje se dobijaju na hladno kao nosača za mometazon-furoata. Dodatkom pentanediola u emulziju povećana je akumulacija mometazon-furoata u stratum corneumu, čime se, prema mišljenju autorke, mogu smanjiti neželjeni efekti

topikalnih kortikosteroida. Histološkom analizom nisu otkrivene morfološke promene u tkivu kože, kao ni znaci infiltracije ćelija kortikosteroidima nakon primene emulzija sa mometazon-furoatom, a takođe se navodi da je struktura stratum corneuma, epidermisa i dermsa ostala nepromenjena. Poredenjem razvijenih formulacija emulzija sa mometazon-furoatom sa komercijalnom formulacijom, potvrđen je isti trend u smanjenju edema, preciznije - uočeno je značajno smanjenje edematoznih lezija nakon primene ovih formulacija. Pored toga, autori ističu da su razvijene formulacije u/v emulzija sa pentanediolom potpomogle obnavljanju kožne barijere, usled povećanja količine lipida po cm² kože, što je potvrđeno merenjima na Sebumetru.

Prof. dr Cornelia Keck (University of Applied Sciences Kaiserslautern, Pirmasens, Nemačka i Free University of Berlin, Berlin, Nemačka) je na predavanju pod nazivom *Ultra small NLC – improved dermal delivery of coenzyme Q₁₀* iznela prednosti ultramalih nanolipidnih nosača, sa koenzimom Q₁₀, koji se mogu koristiti za povećanje penetracije koenzima Q₁₀ u/kroz kožu. Usled smanjenja u veličini čestica, oslobođanje koenzima Q₁₀ je povećano 15 tj. 1,5 puta kod ultramalih nanolipidnih nosača u odnosu na konvencionalne nano(strukturirane) lipidne nosače i nanoemulzije. U *ex vivo* studijama u kojima se pratila penetracija koenzima Q₁₀ pokazano je da je najveća penetracija postignuta sa ultramalim nanolipidnim nosačima. Autori su takođe predložili model kojim se može opisati struktura razvijenih ultramalih nanolipidnih nosača, tzv. “*flip-flop*“ model.

Na predavanju pod naslovom *Characterization and in vitro skin penetration study of nicotinamide microemulsion*, koje je održala prof. dr Prapaporn Boonme (Faculty of Pharmaceutical Sciences, [Prince of Songkla University](#), Tajland) dat je pregled tehnika koje su se koristile za fizičko-hemijsku karakterizaciju mikroemulzija sa nikotinamidom, kao i *in vitro* penetraciju ove hidrofilne supstance kroz kožu. Autorka je navela mogućnost pripreme mikroemulzija sa niskim koncentracijama surfaktanata, čime bi se mogućnost iritacije kože nakon primene ovih nosača mogla svesti na minimum.

U okviru sesije *Liposomes and other advanced drug delivery systems* koja je održana drugog dana skupa u poslepodnevnim časovima, predstavljene su nove metode za dobijanje, kao i nova polja, odnosno, mogućnosti za primenu naprednih sistema za isporuku lekova, kao i različite analitičke metode koje se koriste u njihovoj karakterizaciji.

Donato Cosco student doktorskih studija (Department of Health Sciences, University „Magna Græcia“ of Catanzaro, Catanzaro, Italija) održao je predavanje na temu *Liposomal post-insertion features of HA-DPPE conjugate* u okviru koga je opisao mogućnost insertovanja konjugata hijaluronska kiselina-fosfolipid u dvoslojeve liposoma. Autor je istakao da bi ova nova platforma mogla da omogući lakše vezivanje

dodatnih molekula za hijaluronsku kiselinu, čime bi se sprecila destabilizacija strukture liposoma tokom biohemijskih procesa *in vivo*.

Na predavanju pod naslovom *Microcontainers, an innovative oral drug delivery system for poorly soluble drugs*, koje je održala dr Line Hagner Nielsen (Department of Pharmacy, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Danska) opisana je mogućnost primene polimernih mikrokontejnera kao jednog od pristupa u povećanju oralne bioraspoloživosti slabo rastvornih lekova. Novina u okviru ovog pristupa u odnosu na ranije opisane pristupe je upotreba polimlečne kiseline, polimera koji je potvrđen od FDA, za upotrebu u razvoju sistema za isporuku lekova. Takođe, autori su opisali mogućnost punjenja šupljine mikrokontejnera lekovitom supstancom (natrijumova so furosemida) i oblaganje mikrokontejnera sa jedne strane pH osetljivim polimerom (Eudragit L100). Na taj način postignuta je zaštita lekovite supstance od degradacije i preuranjenog oslobođanja u GIT-u.

U okviru predavanja koje je održala dr Carla Caddeo (Department Scienze della Vita e dell'Ambiente, Sezione Scienze del Farmaco, University of Cagliari, Cagliari, Italija) pod naslovom *Cross-linked chitosan/liposome hybrid systems for colon-targeted delivery of quercetin* prikazana je mogućnost inkorporiranja kvercetina u liposome obložene tripolifosfat unakrsno vezanim hitozanom, koji bi se mogli koristiti u lečenju inflamatornih bolesti GIT-a. Preliminarni rezultati *in vitro* studija ukazuju na činjenicu da je zahvaljujući oblaganju liposoma hitozanom moguće postići odloženo oslobođanje kvercetina u tankom crevu. Autori takođe navode da je potrebno izvesti dodatne studije, kojima bi se procenila efikasnost ovih sistema u prisustvu enzima u želucu i tankom crevu.

Na predavanju pod naslovom *Polysaccharide Nanohydrogels as Drug Carriers*, koje je održao dr Pietro Matricardi (Department of Drug Chemistry and Technologies, „Sapienza“ University of Rome, Rome, Italija) prikazana je mogućnost pripreme nanočestičnih hidrogelova uz korišćenje biokompatibilnog polisaharida gelana i hijaluronske kiseline kao polaznih materijala. Takođe, autori su opisali postupak hemijske konjugacije prednizolona, kao slabo rastvorne model lekovite supstance za karboksilne grupe polisaharida gelana, koji je prethodno depolimerizovan, u cilju dobijanja pogodnijeg polimernog sistema. S obzirom da prethodno razvijeni nanohidrogelovi imaju strukturu rezervoar-membrana, autori su ispitivali i mogućnost inkorporiranja paklitaksela unutar hidrofobnog jezgra nanohidrogelova, i još jednom potvrdili literaturne nalaze koji govore u prilog činjenici da kombinacija antiinflamatora i antineoplastika može pružiti izvesne prednosti u lečenju malignih bolesti. Takođe pokazano je da je rastvorljivost paklitaksela u gelan-prednizolon nanohidrogel formulaciji oko 1000 puta veća u odnosu na slobodan paklitaksel. U nastavku studije razvijeni su nanočestični hidrogelovi sa hijaluronskom kiselinom. Lanci hijaluronske

kiseline su derivatizovani sa holesterolom, kako bi se povećao hidrofobni karakter polimera i indukovalo samoudruživanje lanaca u vodenom rastvoru i obrazovanje nanohidrogelova. Potom je goveđi serum-albumin oksidaza kovalentno vezan za hijaluronska kiselina nanohidrogelove i dobijeni kompleks je testiran na citotoksičnost na tumorskim ćelijama melanoma. Dobijeni rezultati su ukazali na povećani apoptotski efekat imobilizovanog enzima goveđi serum-albumin oksidaza u odnosu na slobodan enzim. Konačno, autori su razvili sistem za isporuku levofloksacina koji se sastojao od hijaluronska kiselina – hitozan nanohidrogelova. Rezultati preliminarnih studija potvrđili su mogućnost internalizacije ovog nosača od strane ćelija, kao i mogućnost isporuke antibiotika na ciljno mesto delovanja.

Na sesiji pod nazivom *Advanced Analytics*, trećeg dana skupa, održano je šest kratkih predavanja na temu analitičkih metoda koji se koriste u karakterizaciji farmaceutskih oblika. Na predavanju pod nazivom *Statistical process monitoring of a continuous pharmaceutical twin screw granulation*, koje je održala dr Ana Filipa Tavares da Silva prezentovano je kako se multifaktorski statistički monitoring može primeniti na kontinuirani sistem za granulaciju koji se sastoji iz granulatora velike brzine i uređaja tipa fluidizirajućeg sistema. Cilj korišćenja ovog statističkog pristupa je detekcija da li promena jednog parametra u nekoj fazi dovodi do promene u ostalim fazama procesa granulacije. Interesantno predavanje u oblasti analitičkih metoda *Correlation between in-line Raman spectroscopy and spatial filtering velocimetry for particle size evaluation in fluidized bed coating processes* održala je i Friederike Folttmann, kandidat na doktorskim studijama Heinrich Heine Univerziteta u Diseldorfu. U ovom izlaganju detaljno je opisana metoda *in-line* Raman spektroskopije za određivanje debljine sloja obloge čestica koje su obložene u uređaju tipa fluidizirajućeg sistema, kao i metoda za *in-line* određivanje veličine čestica, praćenjem brzine filtracije kroz uređaj koji je postavljen u određeni deo komore fluid-bed aparata. Ovim ispitivanjem je pokazano da je moguće dizajnirati efikasan sistem za *in-line* praćenje parametara procesa oblaganja, kao i da je, na osnovu utvrđene korelacije između posmatranih parametara, moguće predvideti karakteristike procesa uz primenu samo jedne od opisanih metoda karakterizacije. Kada su u pitanju predlozi novih metoda za ispitivanje, Kerstin Frank iz kompanije Boehringer Ingelheim Pharma GmbH&Co, Nemačka, na predavanju pod nazivom *Prediction of the influence of supersaturation and precipitation on in-vivo absorption of a weak base-application of a small scale biphasic dissolution model*, opisala je metodu za istovremeno ispitivanje predviđanja brzine rastvaranja i apsorpcije lekovitih supstanci nakon oralne primene preparata. Predloženo ispitivanje se sprovodi u uređaju malih dimenzija (što je pogodno za male količine uzorka), u dvofaznom sistemu koji čine voden medijum (puferovani rastvor) i oktanol kao lipofilni rastvarač, postavljenom na magnetnu mešalicu. U toku izvođenja ispitivanja, dodatkom NaOH menja se pH vrednost vodenog medijuma, čime se bliže

simuliraju uslovi u organizmu. Poređenjem rezultata ispitivanja na model supstanci tipa slabih baza sa rezultatima konvencionalnih ispitivanja brzine rastvaranja, u kombinaciji sa studijama apsorpcije na eksperimentalnim životinjama, pokazano je da bi predloženi uredaj mogao da se koristi za predviđanje *in vivo* uslova pod kojima dolazi do presičenja rastvora, odnosno, precipitacije supstance, što može da ukaže na ograničavajuće faktore za apsorpciju slabo rastvorljivih lekovitih supstanci tipa slabih baza.

Dr Karsten Mader je održala predavanje na temu *Noninvasive in vivo Monitoring of in situ implants by ESR, multispectral optical imaging and BT-NMR* u kome je opisala primenu ESR imaging metode i NMR spektroskopije u praćenju degradacije PLGA čestica obeleženih fluorescentnom bojom u implantu koji je nalazi u vratu miša. U interesantnom izlaganju dr Hajnalke Pataki pod nazivom *PAT application in formulation technologies* navedena je još jedna mogućnost korišćenja Raman spektroskopije u praćenju procesa kristalizacije i uočavanju morfoloških promena koje se dešavaju u čvrstoj fazi u toku kristalizacije. Preporučeno je da se Raman spektroskopija koristi u kontroli kvaliteta i kao PAT alatka za uspešnu karakterizaciju čvrstog stanja materijala. Primer još jedne uspešne primene analitičke metode Raman mikroskopije prezentovan je tokom predavanja pod nazivom *Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy providing in depth imaging of drug loaded mesoporous MCM-41 silica* koje je održao dr Andrew Fussell. Raman mikroskopija je relativno nova metoda i ispitivanja pokazuju da se primenom ove metode može uspešno pratiti distribucija lekovite supstance u mikročesticama.

Na sesiji koja se odnosila na čvrste farmaceutske oblike (*Solid Dosage Forms*) prezentovano je nekoliko interesantnih tema. Dr Christian von Corswant iz AstraZeneca održao je predavanje pod nazivom *Oral controlled drug delivery*. U toku predavanja dat je pregled mehanizama i navedene su prednosti korišćenja sistema sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance. Kao primer, opisano je oslobađanje lekovite supstance iz peleta obloženih filmom koji sadrži derivata celuloze različitih molekulske masa. Oslobađanje lekovite supstance iz obloženih peleta se odvija procesom difuzije kroz film, a oslobađanje lekovite supstance zavisi od molekulske mase derivata celuloze koji ulazi u sastav filma. Derivati celuloze, u zavisnosti od molekulske mase, prave različite mikrostrukture filma što dovodi do razlika u difuziji lekovite supstance iz peleta. Na predavanju pod nazivom *Advances in controlled drug delivery from an academic perspective* koje je održao profesor Ruggero Bettini sa Univerziteta u Parmi, Italija, izložene su prednosti dizajniranja formulacija i korišćenja novih sistema sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance u lečenju infektivnih bolesti i kancera. Korišćenje novih supstanci i novih pristupa u dizajniranju sistema sa kontrolisanim oslobađanjem lekovite supstance omogućava oslobađanje doze leka u određenom regionu GIT-a i u tačno određenim intervalima što predstavlja prednost korišćenja ovih

sistema u savremenoj terapiji. Jedno od zapaženih predavanja odnosilo se na biofarmaceutsku karakterizaciju farmaceutskih preparata (*Biopharmaceutical performance assessment of solid dosage forms*), a održao ga je Xavier Pepin iz kompanije Sanofi, Francuska. Pepin je, na primeru različitih studija, opisao način na koji je moguće kombinovati *in vivo*, *in vitro* i *in silico* ispitivanja kako bi se predvidela biofarmaceutska, odnosno, farmakokinetička svojstva lekovite supstance nakon oralne primene preparata na humanim subjektima. Opisani slučajevi su se odnosili na specifične ciljeve, kao što su izbor optimalne formulacije u postupku razvoja farmaceutskog preparata, utvrđivanje specifikacija za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz datog preparata, ispitivanje biološke ekvivalencije između ispitivanog i referentnog preparata, kao i izbor odgovarajuće doze i režima doziranja, kako bi se postigao željeni terapijski efekat. U zaključku je istaknuto da prihvatanje koncepta *in vitro-in vivo korelacije* (IVIVK) u velikoj meri može da doprinese bržem razvoju novih farmaceutskih preparata. Pri tome je prepoznat i značaj korišćenja savremenih *in silico*, odnosno, računarskih metoda za predviđanje biofarmaceutskih svojstava lekovitih supstance/farmaceutskih preparata, kao što su brzina i obim apsorpcije, *in vivo* brzina rastvaranja, uticaj interindividualnih varijacija, predviđanje efekta u zavisnosti od doze itd.

Jedno od predavanja koje je izazvalo žustru diskusiju među auditorijumom, pod naslovom *Delivering crushed tablets using thickened fluids: salivary paracetamol concentrations indicate an effect on absorption*, autora C. Radhakrishnan sa Univerziteta u Brizbejnu, Australija, odnosilo se na ispitivanje praktično zastupljenih metoda za oralnu primenu tableta u slučajevima kada pacijenti imaju problema sa gutanjem, kao i na procenu faktora koji mogu da utiču na biološku raspoloživost lekova nakon „alternativnih“ načina primene. Pri tome su razmatrani samo slučajevi kada pacijenti, iz nekog razloga, svesno odbijaju da popiju cele tablete, pri čemu nemaju fizioloških problema sa gutanjem. U anketi koja je sprovedena među stanovnicima Australije, pokazano je da oko 30 % populacije ima problema sa gutanjem celih tableta, te najčešće pribegavaju konzumiranju smravljenih tableta sa vodom, džemom ili viskoznom tečnošću specijalno formulisanom za ove svrhe. Autor predavanja je prikazao i ilustracije patentiranih mini-uređaja za mrvljenje tableta koji se mogu nabaviti u apotekama ili na drugi način. Ispitivanjem uticaja pomenutih „vehikuluma“ na brzinu oslobađanja i biološku raspoloživost paracetamola kao model supstance, određenoj na osnovu koncentracije leka u salivu, pokazano je da vrsta „vehikuluma“ može da ima značajan uticaj na brzinu i obim apsorpcije oralno primenjene lekovite supstance. Prepostavlja se da je ovaj efekat još više izražen kod supstanci koje imaju nisku biološku raspoloživost i/ili usku terapijsku širinu. Ono što su prisutni kasnije najviše komentarisali je da mogućnost usitnjavanja tableta, koje su inicijalno dizajnirane da se progutaju intaktne, ne treba ni popularisati među pacijentima, niti treba vršiti

ispitivanja vezana za „alternativne“ načine primene leka. Naime, sam koncept savetovanja pacijenta ukazuje na davanje uputstava o pravilnoj upotrebi preparata, a ne o isticanju posledica nepravilnog ili, još gore, propagiranog „alternativnog“ načina primene. Na istoj sesiji *Pharmacokinetics & IVIV Correlation* održano je i predavanje Mirka Kozioleka, kandidata na doktorskim studijama Univerziteta u Greifswald-u, Nemačka, pod nazivom *Intragastric volume and fat content changes after intake of high-caloric, high-fat breakfast in healthy human subjects investigated by MRI*. Tim sa Univerziteta u Greifswald-u je poznat po tome što već dugo godina radi na ispitivanju i identifikaciji fizioloških faktora koji utiču na oslobođanje i apsorpciju leka nakon oralne primene, kao i na razvoju alternativnih aparatura za *in vitro* ispitivanje brzine rastvaranja, koje će na adekvatan način simulirati dešavanja *in vivo*. Na predavanju koje je ovom prilikom izloženo, prikazani su rezultati primene metode za vizuelno praćenje prolaska unetog sadržaja kroz gastrointestinalni trakt uz pomoć magnetne rezonance. Dobijeni rezultati su ukazali da dinamika promene volumena želudačnog sadržaja nakon unosa hrane, kao i mehanizam apsorpcije vode u stanju sitosti, nisu u skladu sa dosadašnjom hipotezom o načinu pražnjenja želuca (tzv. „Magenstrasse“). Takođe, smatra se da će nova saznanja u ovoj oblasti pomoći kod dizajniranja novih ili modifikacija postojećih uređaja za ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance u stanju sitosti, po pitanju simulacije hidrodinamičkih uslova i, posledično, tranzita leka.

U okviru sesije posvećene formulaciji proteina i nukleotida (*Protein & Nucleotide Formulation*), doktori nauka i kandidati na doktorskim studijama održali su interesantna kratka predavanja u kojima su prikazali deo svojih istraživanja. Fernanda Bruxel (UNIPAMPA, Brazil) predstavila je najvažnije rezultate fizičkohemijskih i bioloških ispitivanja katjonskih nanoemulzija kao sistema za isporuku antimalaričnih oligonukleotida (*Physicochemical and biological studies of cationic nanoemulsions as delivery systems for antimalarial oligonucleotides*). Tom prilikom, parenteralne katjonske nanoemulzije opisane su kao obećavajući sistemi za isporuku oligonukleotida, pri čemu dodatak katjonskih lipida predstavlja ključno pitanje za asocijaciju oligonukleotida preko elektrostatickih interakcija. Rezultati istraživanja su pokazali da između ispitivanih antimalaričnih oligonukleotida i nanoemulzije postoje određene interakcije – oligonukleotidi mogu da se efikasno adsorbuju na katjonske nanoemulzije i verovatno se lociraju na međupovršini kapi, umetajući se u lamelarni lipidni sloj nanoemulzije. Nizak hemolitički i visok inhibitorni efekat nanoemulzija/oligonukleotid-kompleksa ukazali su na potencijal ovih sistema u borbi protiv izazivača malarije *Plasmodium falciparum*.

Mónica Rosa sa Instituta Superior Técnico, Univerzitet u Lisabonu, Portugalija, pričala je o ubrzanim formulacionim studijama za čuvanje proteina u zamrznutom stanju (*Accelerated Formulation Studies for Frozen Storage of Proteins*), ističući da agregacija terapijskih proteina do koje može doći tokom prečišćavanja, čuvanja i

primene, predstavlja kritični atribut kvaliteta usled potencijalne imunogenosti nastalih agregata, te predstavlja važno pitanje tokom proizvodnje i rukovanja rekombinantnim terapijskim proteinima. Ona je ovom prilikom prikazala deo svojih istraživanja vezanih za nedavno razvijen izohorni metod zamrzavanja (fiksiranje zapremine umesto pritiska), koji sprečava zamrzavanje vode i omogućava praćenje uticaja koncentracije šećera na stabilnost proteina na niskoj temperaturi. Dobijeno je da mehanizam agregacije proteina/hemoglobina koji se javlja pod izohornim uslovima tokom 50 h reprezentativno ilustruje mehanizam agregacije do koje dolazi tokom mesec dana čuvanja, čime je pokazan potencijal izohornog metoda za primenu u ubrzanim formulacionim studijama. Prema tome, izohorni metod predstavlja relativno jednostavan pristup za dobijanje fundamentalnih termodinamičkih informacija o proteinima i mehanizmu agregacije, i može se koristiti u ubrzanim formulacionim studijama ispod temperature zamrzavanja.

Ilona Konrad (Ludwig-Maximilians-Univerzitet u Minhenu; Coriolis Pharma Research GmbH, Nemačka) predstavila je rezultate svog istraživanja na temu kontrolisane nukleacije kombinovane sa agresivnim sušenjem zamrzavanjem visokokoncentrovanih formulacija proteina (*Controlled nucleation combined with aggressive freeze-drying of highly concentrated protein formulations*). Cilj je bio da se ispita da li se primenom kontrolisane nukleacije u kombinaciji sa agresivnim primarnim sušenjem skraćuje vreme trajanja primarnog sušenja i vreme rekonstitucije proizvoda, kao i da se proceni stepen uštede vremena u poređenju sa procesom randomizovane nukleacije kombinovanim sa agresivnim primarnim sušenjem. Pokazano je da *Millrock Freeze Booster®* metod može da se primeni za indukciju kontrolisane nukleacije leda u visokokoncentrovanim formulacijama proteina. Interesantno je da su i kontrolisana i randomizovana nukleacija u kombinaciji sa agresivnim primarnim sušenjem dovele do značajnog, gotovo istog, skraćenja vremena primarnog sušenja. Međutim, kontrolisana nukleacija je dovela do mnogo brže rekonstitucije proizvoda. U zaključku je istaknuto da kontrolisana nukleacija može imati značajan potencijal kod sušenja zamrzavanjem visokokoncentrovanih formulacija proteina, ne samo zbog ekonomske koristi, već i zbog skraćenja vremena rekonstitucije.

Herve Hillaireau sa Instituta Galien Paris-Sud, Univerzitet Paris-Sud – CNRS, Francuska govorio je o nanogelovima na bazi hitozana kao nosačima za ćelijsku isporuku nukleotida i analoga nukleotida (*Chitosan-based nanogels for the cellular delivery of nucleotides and nucleotide analogues*). Naime, klinička primena nukleotida i njihovih analoga ograničena je usled prisustva trifosfatne grupe koja je osetljiva na hidrolizu u *in vivo* uslovima i odgovorna je za visoku hidrofilnost ovih molekula, što jako ograničava njihovo preuzimanje u ciljne ćelije. S tim u vezi, H. Hillaireau je predstavio originalan, višenamenski i jednostavan metod za dizajn nanonosača na bazi hitozana za isporuku nukleotida i analoga nukleotida. Hitozan je biokompatibilan i

biorazgradiv polisaharid koji ima sposobnost da kompleksiranjem sa trifosfatom, procesom „jonotropskog geliranja“, obrazuje nanočestice. Pošto je obrazovanje nanonosača pokrenuto samim nukleotidom, postignuta je veća efikasnost inkorporiranja leka. Takođe, smanjena je količina ekscipijenasa u formulaciji, a time i toksičnost za potencijalnu kliničku primenu. *In vitro* ispitivanja razvijenih nanosistema – hitozan/ATP i hitozan/azidotimidin-TP nanogelovi – pokazala su ograničenu citotoksičnost i efikasnu intracelularnu isporuku nukleotida. Svakako, neophodne su dalje *in vivo* studije kako bi se potvrdio očekivani potencijal ovako dobijenih nanogelova.

Na sesiji posvećenoj obloženim čvrstim farmaceutskim oblicima (*Coated Dosage Forms*) prezentovana su tri predavanja po pozivu, svako u trajanju po 40 minuta. Prvo predavanje pod nazivom *QbD and PAT tools for film coating* održao je dr Adrian Funke iz Bayer Pharma, Nemačka. Dr Funke je predstavio kako se primenom QbD i PAT-a u toku procesa oblaganja tableta može izbeći varijabilnost unutar šarže. Pravilan dizajn eksperimenta, definisanje kritičnih parametara procesa (brzina okretanja bubenja za oblaganje, brzina i dužina nanošenja sredstva za oblaganje, pritisak, temperatura, protok vazduha) kao i primena Raman spektroskopije u toku procesa oblaganja omogućavaju brzo i uspešno izvođenje procesa oblaganja tableta. Drugo predavanje pod nazivom *GIT delivery* održao je profesor Abdul Basit sa University College of London iz Engleske, koji u svojim istraživanjima objedinjuje farmaceutsku tehnologiju i gastroenterologiju sa akcentom na ciljano oslobađanje lekovitih supstanci u tačno određenim delovima GIT-a. U toku predavanja ukazano je na potencijal korišćenja makromolekula u čvrstim farmaceutskim oblicima sa odloženim oslobađanjem lekovite supstance u kolonu u kome bi se lekovita supstanca oslobađala i apsorbovala. Oblaganje kao proces iz perspektive osobe koja radi u industriji prezentovao je dr Christoph Riedel iz Bosch Huttlin-a na predavanju pod nazivom *Coating of solid dosage forms* tokom koga je prezentovao studije slučaja i različite načine izvođenja i dizajna procesa oblaganja u industriji.

U okviru sesije pod nazivom *Protein Formulation and Aggregation* održana su tri predavanja po pozivu. Na vrlo interesantnom predavanju pod nazivom *Freeze-drying of proteins: Quality by Design (QbD) in formulation and process design* koje je održao profesor Michael Pikal sa University of Connecticut, USA, prezentovani su principi takozvane *Dobre prakse u smrzavanju proteina* pri čemu se mora voditi računa o količini upotrebljenog pufera, dodatku odgovarajućih stabilizatora kao i optimizaciji temperature smrzavanja. Predloženo je da se, ako je protein stabilan i u niskoj koncentraciji u preparatu, kao sredstvo za dopunjavanje koristi manitol u kristalnoj formi dok bi stabilizator (saharoza ili trehaloza) trebalo da bude amorf. Bitno je da se u toku procesa identifikuju kritični parametri i da se pravilnim dizajnom eksperimenta omogući brzo smrzavanje proteina bez narušavanja stabilnosti proteinske molekule. Na

predavanju pod nazivom *Formulation development of new anti-body scaffolds* koje je održao dr Sylvain Huille predstavljene su metode izolacije, karakterizacije antitela kao i pravilan odabir pravog kandidata koji se dalje može koristiti kao aktivna supstanca ili nosač aktivne supstance. Još jedno zanimljivo predavanje u okviru ove sesije održao je dr Jean-Pierre Amorij pod nazivom *Vaccine Design: Lyophilisation and delivery* na kome je dao pregled dostupnih vakcina protiv virusa influenze, njihovih formulacija i načina proizvodnje i zatim je predstavio način proizvodnje liofilizovane vakcine protiv virusa influenze pri čemu vakcina postaje stabilnija, a zadržava kompletну imunogenost.

Trećeg dana skupa održan je simpozijum na temu *Nanoparticles & Vesicles* pri čemu su održana tri predavanja po pozivu posvećena liposomima, nanosuspenzijama i nanočesticama. Profesor Yvonne Perrie sa Aston Univerziteta u Birmingemu, UK, govorila je o liposomima kao terapijskim sistemima – od koncepta do kliničke primene (*Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications*). Tom prilikom posebno su istaknuti katjonski liposomi kao obećavajući efikasni adjuvansi u vakcinama. Rezultati studija su pokazali da katjonski liposomi na bazi dimetildioktadecilamonijum bromida (nosač) i trehaloza 6,6'-dibehenata (imunostimulator) formiraju depo na mestu injektovanja što privlači monocite i podstiče snažan imunski odgovor. Prof. Perrie je naglasila da fizičkohemijska svojstva katjonskih liposoma kao adjuvanasa (maskiranje nanelektrisanja PEGilovanjem; inkorporiranje holesterola) igraju ključnu ulogu u modulaciji imunskog odgovora. Takođe je navela faktore koje je potrebno razmotriti prilikom razvoja formulacije liposomskih adjuvanasa – nanelektrisanje (prirodni ili katjonski lipid, pegilovanje), inkorporiranje antiga, rigidnost dvosloja, veličina liposoma, dodatak imunostimulatora; ističući da eksperimentalni dizajn može biti koristan alat u razvoju ovih sistema.

Dr Roberta Cavalli sa Univerziteta u Torinu, Italija, održala je predavanje pod nazivom *Nanosuspension technology: A versatile drug delivery platform*, na kome je govorila o najvažnijim svojstvima i najviše korišćenim metodama za izradu nanosuspenzija. Ne iznenađuje da nanosuspenzije – tečne koloidne disperzije čistih nanokristala leka čija je veličina obično manja od 1 µm – privlače sve veću pažnju, jer mogu da povećaju rastvorljivost i biološku raspoloživost slabo rastvorljivih lekova, ali i da utiču na farmakokinetički profil leka čime se može poboljšati bezbednost i efikasnost. Mogu se primeniti različitim putevima primene (lokalna, peroralna, parenteralna, pulmonalna, primena u oko), a sa tehnološke strane pružaju razne mogućnosti jer se mogu inkorporirati u kapsule, tablete, pelete, hidrogelove i supozitorije. Dr Cavalli je ukratko opisala tri grupe metoda za izradu nanosuspenzija: 1) „top-down“ (usitnjavanje u mlinovima – *NanoCrystal* tehnologija, homogenizacija pod visokim pritiskom – *Dissocubes®*, *Nanopure*); 2) „bottom-up“ (metode precipitacije,

emulzije kao templati, tehnologija superkriticnog fluida); 3) kombinacija „*top-down*“ i „*bottom-up*“ metoda (precipitacija praćena homogenizacijom pod visokim pritiskom). Takođe je bilo reči o stabilnosti nanosuspenzija i načinima stabilizacije dodatkom surfaktanata i/ili polimera. Na kraju su prikazane studije slučajeva: hesperitin nanosuspenzija za dermalnu primenu, budesonid nanosuspenzija za pulmonalnu primenu, nanokristali rutina i nanokristali rezveratrola.

Profesor Paula Hammond sa MIT Masačusets Instituta za tehnologiju, Kembridž, SAD, je na svom predavanju (*Nanoparticle design and drug delivery*) govorila o „*layer-by-layer*“ (LbL) nanočesticama i njihovoj primeni, pri čemu je objasnila LbL koncept (naizmenična adsorpcija na supstrat dva ili više suprotno nanelektrisana polimera u vodenom medijumu), ističući prednosti i potencijal ovako dobijenih sistema kao nosača za različite lekove, od malih molekula do peptida, proteina i nukleinskih kiselina. Posebno je razmatrana sposobnost višeslojnih, multifunkcionalnih LbL nanočestica da kontrolisano, stupnjevito i nezavisno oslobode različite lekove inkorporirane u pojedinačne nanofilmove na određenom mestu u organizmu. U laboratorijama prof. Hammond se intenzivno istražuje oslobođanje agenasa koji smanjuju rezistenciju tumora, praćeno sinergističkim oslobođanjem potentnih hemoterapijskih agenasa. Prof. Hammond je sa svojim timom uspela da spreči nespecifično preuzimanje u ćelije pozitivno nanelektrisanih LbL nanočestica pomoću sloja poli(etilenglikola) (PEG) koji se selektivno uklanja u kiseloj sredini hipoksičnog tumora, i pokazala (*in vitro* i *in vivo*) da ova strategija oblaganja i de-oblaganja nanelektrisanja na LbL nanočesticama pruža mogućnost za ciljnu isporuku u tumorsko tkivo. Prikazan je primer LbL nanočestica za terapiju tumora: jezgro nanočestice (PLGA, liposom, polistiren, zlato, gvožđe-oksid) sadrži doksurubicin ili drugi hemoterapeutik; sledi unutrašnji sloj sa inkorporiranom siRNK sastavljen od polikatjona (polietilenamin, poli-L-lizin, poli-L-histidin, poli-L-arginin, hitozan) i polianjona (siRNK); i na kraju površinski „*stealth*“ sloj osetljiv na pH, prisustvo enzima ili sa ciljnim molekulima za određeni receptor (PEG, hijaluronska kiselina). Razvojem LbL nanočestica koje sadrže film sa siRNK preko jezgra sa lekom, razvijena je nova strategija za isporuku lekova koja se može modifikovati tako da se postigne veliki kapacitet inkorporiranja terapijskih agenasa, intracelularna isporuka, produženo vreme cirkulacije u krvi i ciljno lečenje tumora.

Na sesiji posvećenoj kontinuiranom procesu proizvodnje (*Continuous Manufacturing*) održana su tri predavanja po pozivu, svako u trajanju od po 40 minuta. Dr Martin Wunderlich je održao prvo predavanje pod nazivom *Continuous wet granulation process including QbD and PAT* u kome je predstavljena primena QbD i PAT-a u toku procesa vlažne granulacije u industriji. Ukazano je na značaj definisanja svakog koraka procesa i kritičnih parametara kao i pravilan izbor analitičkih metoda koji bi omogućili uspešno praćenje procesa u industriji. Dr Reinhardt K. Murb je održao predavanje pod nazivom *Comminutive Granulation – Continuous Manufacturing of*

Hot-Melt-Extruded Pellets tokom koga je izneo sličnosti i razlike između *hot-melt* ekstruzije i konvencionalnih metoda ekstruzije (suva i vlažna ekstruzija). Posebno je naglašeno da je primena *hot-melt* ekstruzije pogodna za razvoj novih formulacija peleta sa supstancama koje spadaju u II ili III grupu prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije.

U okviru simpozijuma *Tissue Engineering & ATMP* održana su sledeća predavanja: *Development and manufacturing of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP)* (Maria Luisa Noll, Areta International, Gerenzano, Italy), *Recent advances in tissue engineering* (Rui Reis, University of Minho, Braga, Portugal) i *Biomaterials as therapeutic cancer vaccines* (David Mooney, Harvard School of Engineering and Applied Sciences, Wyss Institute, Cambridge, USA). Prof. Mooney je na svom predavanju govorio o novoj klasi vakcina za terapiju karcinoma koje se zasnivaju na upotrebi biomaterijala, pri čemu se posebno osvrnuo na dva tipa ovih sistema – nanočestice i trodimenzionalne (3D) biomaterijale makro veličine. Zapravo, trenutno dostupne vakcine za terapiju karcinoma koje se zasnivaju na izolovanju dendritičnih ćelija iz pacijenta, njihovoj *ex vivo* manipulaciji u cilju povećanja broja i aktivacije sa tumorskim antigenima, i sledstvenom injektovanju u organizam pacijenta, imaju brojna ograničenja u praksi. S druge strane, najnoviji napredak u nauci o materijalima omogućio je dizajniranje i izradu fizički i hemijski funkcionalnih biomaterijala koji mogu specifično da se usmere ka dendritičnim ćelijama u organizmu i pokazuju potencijal za indukovanje antigen-specifičnog T-ćelijskog odgovora relevantnog za terapiju karcinoma. Zbog svoje male veličine i jednostavne modifikacije površine, nanočestice, uključujući one na bazi liposoma, PLGA [poli(laktična-ko-glikolna kiselina)], PGA (poliglikolna kiselina), polistirenske, želatinske i druge polimerne nanočestice, magnetne i nanočestice zlata, intenzivno se ispituju kao nosači za aktivnu ili pasivnu ciljnu isporuku antiga u dendritične ćelije. 3D biomaterijali (npr. etilen vinil-acetatni polimer milimetarske veličine, alginat, makroporozni PLG skafoldi) takođe se nalaze u fokusu istraživanja usled njihove sposobnosti da stvore takvo mikrookruženje koje omogućava efikasno preusmeravanje/regrutovanje i programiranje dendritičnih ćelija, kao i smanjenje tolerancije na isporučeni antigen. Pokazano je da se upotrebom ovih biomaterijala obezbeđuje produžena, lokalizovana isporuka imunomodulatornih faktora, kontroliše kretanje i aktivacija imunskih ćelija, indukuje potentan odgovor na kancerske antigene i uzrokuje regresija tumora u prekliničkim animalnim modelima. Imajući u vidu navedene činjenice, prof. Mooney je istakao da isporuka antiga pomoću biomaterijala predstavlja obećavajući pristup za vakcine koje se koriste u terapiji karcinoma.

Na sesiji pod nazivom *Preformulation and Physical Pharmaceutics* održano je 6 kratkih predavanja na odabranu temu. U okviru ove sesije mlađi naučnici ili profesori sa različitih univerziteta širom Evrope i iz Japana predstavili su delove svojih istraživačkih

radova ili projekata na kojima rade. Vrlo interesantno predavanje pod nazivom *Prediction of physical stability of amorphous drugs from molecular mobility studies* održao je profesor Marian Paluch sa University of Silesia iz Poljske, koji je u predvidenom vremenu u uvodnom delu objasnio da se prevodenje iz kristalnog oblika supstance u amorfni oblik prvenstveno radi s ciljem promene rastvorljivosti lekovite supstance što doprinosi njenoj boljoj bioraspoloživosti. Ipak, amorfni oblik supstance je i nestabilniji, pa je u toku predavanja izloženo kako dialektrična spektroskopija, metoda koja omogućava praćenje kretanja molekula unutar materijala, može da bude izuzetno korisna kao alatka za predviđanje vremena tokom koga amorfni oblik supstance ostaje stabilan. Predavanje pod nazivom *Nanoformulated itraconazole prepared by various spinning methods* održao je dr Zsombor Nagy sa Budapest University of Technology and Economics, Mađarska, koji je ukratko izložio primenu metode elektrostatičkog spinning-a ili upredanja u proizvodnji nanovlakana izrađenih od različitih vrsta polimera (PVP, Eudragit™, HPMC) i itraconazola prilagođenu industrijskoj proizvodnji. Stabilnost ovako izrađenih nanovlakana je praćena Raman spektroskopijom i DSC metodom, a ispitivanja su pokazala da je stabilnost i brzina rastvaranja itraconazola u nanovlaknima sa PVP-om i HPMC-om značajno poboljšana. Treće predavanje pod nazivom *ToF-SIMS analysis of hydrolysed acetyl salicylic acid printed as a microarray using ink-jet printing* održao je dr Mohammed Algahtani koji je predstavio analitičku tehniku ToF-SIMS koja daje podatke o hemijskoj strukturi materijala i stoga se može koristiti kao metoda za detekciju hemijskih degradacionih procesa unutar materijala. Predavanje pod nazivom *General understanding of physical stability of pharmaceutical glasses* održao je dr Kohsaku Kawakami iz Japana koji je u toku 20 minuta izložio analizu izotermalnog ponašanja sedam kristalnih supstanci i klasifikovao te supstance u zavisnosti od uslova pod kojima dolazi do kristalizacije, da li u toku hlađenja ili zagrevanja materijala. Dr Sandra Wiedemann održala je predavanje pod nazivom *Highly tortuous scaffolds produced using vacuum-induced directional freezing* tokom kog je izložila metod primene keramičkih premaza upotrebom smrzavanja pod pritiskom. Poslednje predavanje u okviru ove sesije pod nazivom *The truncated sphere model with Voronoi extension enables simulations of confined powder compression at large strains* održala je dr Ann-Sofie Persson koja je izložila analitičku metodu za praćenje promena u mehaničkim svojstvima granula u toku procesa kompresije.

Četvrtog dana skupa na sesiji posvećenoj generičkim lekovima i biofarmaceuticima (*Generics and Biosimilars*) prezentovana su tri izuzetna predavanja po pozivu koja su održali predavači koji rade u farmaceutskim industrijama. Dr Joaquim Figueiredo iz Abott-a je u toku predavanja pod nazivom *Branded generics in emerging markets* predstavio deo takozvanog biznis plana Abott-a da svoje generičke lekove plasira na tržišta koja su u razvoju (Indija, Brazil, Indonezija, Meksiko). S obzirom da se 50 % od ukupne prodaje lekova odvija u ovim područjima, Abott planira da izvrši

promene u postojećim formulacijama farmaceutskih oblika i da kombinacijom lekovitih supstanci ili dizajnom ambalaže stvori proizvod koji će biti pogodniji za primenu u ovim područjima u odnosu na generičke lekove drugih proizvođača. Drugo predavanje pod nazivom *Biosimilars, an opportunity and a challenge for the generic's industry* održao je dr Julio Maset iz Laboratories Cinfa iz Španije koji je izneo činjenice o biosimilarama, novim verzijama postojećih biofarmaceutskih lekova čiji su patenti istekli. Biosimilari se proizvode upotrebom genetskog materijala identične osnove, a njihova primena je zasnovana na podjednakoj sigurnosti i efikasnosti kao kod poznatijih lekova, na osnovu kojih su nastali. Biosimilari su krupni, složeni molekuli, proizvedeni od strane živih organizama, čija stabilnost zahteva posebne uslove; dok su generički lekovi mali molekuli, proizvedeni hemijskom sintezom i obično su veoma stabilni. Pored pregleda regulatornih propisa u toku predavanja predstavljeni su načini modifikacije već postojećih bioloških lekova (glikozilacija, posttranslaciona modifikacija) kao i metode karakterizacije dobijenih proteina. Dr Herrmann Allgaier iz Merckle Biotec iz Nemačke održao je predavanje pod nazivom *Biosimilars or Biobetters? Lessons learned from filgrastim portfolio* u kome je naveo razlike između biosimilara i biobetter lekova koji predstavljaju modifikovane originalne biološke molekule. Biobetters lekovi su dobijeni hemijskim ili molekulskim modifikacijama biološkog proteina s ciljem da se poveća bioraspoloživost i smanji imunogenost što predstavlja i prednosti u odnosu na biosimilare.

U okviru simpozijuma *Pharmaceutical Engineering* predavači iz industrije izneli su svoja zapažanja i iskustva vezana za razvoj lekova i proizvodnju biofarmaceutika. Dr Jean-René Authelin iz kompanije Sanofi, Francuska, u svom predavanju *The role of pharmaceutical engineering in product development* govorio je o primeni farmaceutskog inženjeringu kako bi se razvio robustan industrijski proces zasnovan na znanju i mehaničkim modelima. Predavač je na primerima roller kompakcije i oblaganja tableta ilustrovaо ovu metodologiju zasnovanu na razvoju procesa na opremi manjeg kapaciteta (*down scaled* oprema), koji bi trebalo da reprezentativno odslikava budući industrijsku proizvodnju. Na kraju je prikazao buduće izazove u oblasti farmaceutskog inženjeringu npr. u procesima punjenja i zatvaranja prilikom proizvodnje bioloških lekova. Dr Andreas Graser iz kompanije F. Hoffmann-La Roche, Švajcarska, tokom svog predavanja *Planning and construction of a new plant for parenterals* upoznao je publiku sa šestogodišnjim projektom kompanije Roche vezanim za planiranje i izgradnju novog postrojenja za sterilnu proizvodnju i pakovanje parenteralnih preparata u Kaiseraugst-u. U periodu od 2006. do 2012. godine, zahvaljujući integrisanom timskom radu menadžera, inženjera i mehaničara, kao i učešću samih korisnika, napravljen je plan dizajna, izgrađena fabrika i dobijene su dozvole za puštanje u rad. U okviru proizvodnog pogona fabrike smeštene su odvojene linije za punjenje tečnosti u špriceve, punjenje tečnosti u boćice i za punjenje liofilizata u boćice. Dr Graser je

tokom izlaganja dao pregled osnovnih zahteva za izgradnju u pogledu prostora, osvetljenja, uštede energije, kao i opreme (izolatori, elektronski sistemi za praćenje i dokumentovanje, optimizovani dizajn linija za punjenje). Takođe je naveo principe planiranja i izgradnje kojih su se pridržavali – procesne mape za vizualizaciju, analiza rizika, simulacija procesa pomoću lego kockica u cilju validacije procesnih mapa, optimizacije prostora za skladištenje, međuprostora i protoka materijala, kao i identifikacije eventualnih gepova. Na kraju predavanja istaknut je značaj ciklusa dekontaminacije (test oštećenja izolatora pod pritiskom, smanjenje vlažnosti, VHP ciklus tj. kondicioniranje, dekontaminacija, ventilacija), pri čemu su navedena pitanja koja treba razmotriti, kao što su izbor materijala za izolatore, pozicija izolatora, maksimalna koncentracija H₂O₂ nakon ventilacije i razvoj i validacija ciklusa primenom bioizolatora.

Na sesiji pod nazivom *Oral Drug Delivery* čiji je predsedavajući bila profesor Svetlana Ibrić sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, mladi naučnici su prezentovali rezultate svojih istraživanja. U okviru ove sesije održano je 6 kratkih predavanja, a teme su bile vezane za izradu peleta, minitableta ili mikročestica primenom hot-melt ekstruzije, istiskivanjem iz kalupa i dr. Prvo predavanje pod nazivom *Taste-masked ibuprofen micropellets using an innovative spouted bed continuous pelletizing technology* održala je Marie Guhmann iz Glatt-a. Ona je predstavila kontinuirani proces izrade obloženih mikropeleta u fluid-bed uređaju u kome su prvo izrađene pelete, pa potom obložene Eudragit-om da bi se maskirao ukus. Bart Claeys je tokom predavanja pod nazivom *A new class of polymers to produce high-dosed sustained-release oral drug formulations via hot melt extrusion: Polyurethanes* izložio mogućnost korišćenja poliuretana kao matriksa za izradu tableta sa modifikovanim oslobođanjem lekovite supstance metodama ekstruzije i istiskivanja iz kalupa. Alice Melocchi je održala predavanje pod nazivom *Evaluation of injection molding for the manufacturing of immediate release (IR) tablets* tokom koga je ukazala na mogućnost primene metoda ekstruzije i istiskivanja iz kalupa za izradu čvrstih doziranih oblika u industrijskim uslovima, a takođe je ukazala i na mogućnost korišćenja različitih polimera kao matriksa u toku izrade tableta ovim metodama. Anouk Veraeck je održala predavanje pod nazivom *Prilling as manufacturing technique for lipid/PEG multiparticulates for fixed-dose combinations* tokom koga je opisala postupak izrade prill čestica raspršivanjem otopljene smeše PEG-a i lekovite supstance. Na ovaj način dobijene su sferne čestice metoprolol-tartarata sa produženim oslobođanjem lekovite supstance i čestice hidrohlortiazida sa trenutnim oslobođanjem lekovite supstance. Ovim česticama su zatim punjene kapsule i rezultati ukazuju da se ova metoda može uspešno koristiti za formulaciju farmaceutskih oblika sa dve lekovite supstance sa različitim oslobođanjem leka. Carolin Eckert je na predavanju pod nazivom *Hard fat as binder for child-*

appropriate, taste improved minitablets iznela prednosti korišćenja lipidnih ekscipijenasa (Witocan®) u izradi granulata granulacijom topljenjem. Dobijene granule su zatim komprimovane u mini tablete. Primena veštačkog jezika je ukazala da se ukus efikasno može maskirati primenom ovih ekscipijenasa. Hannah Batchelor je u svom predavanju pod nazivom *Childrens' preferences for tablets based on size, shape and colour* dala opis ispitivanja na 2D i 3D modelima tableta s ciljem da se vidi za koju veličinu, boju i oblik tableta je najbolja komplijansa kod dece. Utvrđeno je da deca iznad 6 godina i mlađi adolescenti preferiraju tablete prečnika 10 mm, da im se oblik kapleta više sviđa, kao i da je bolja komplijansa kod tableta svetle boje.

U okviru simpozijuma *Skin, Nose & Lung Delivery* koji je bio posvećen najnovijim dostignućima u isporuci lekova u/kroz kožu, intranasalnoj i pulmonalnoj isporuci lekova, posebnu pažnju publike privuklo je predavanje *Drug delivery into and through the skin*, koje je održao profesor Richard Guy sa University of Bath, UK. Prof. Guy je tom prilikom istakao da isporuka lekova u i kroz kožu, bilo u cilju lokalnog ili sistemskog lečenja bolesti, predstavlja veliki izazov, a pouzdano predviđanje permeabilnosti leka kroz kožu nastavlja da bude predmet interesovanja. Kao ključna pitanja razmatrana su pravila za izbor najboljih lekova za primenu na koži, i određivanje biološke raspoloživosti lokalno primenjenih lekova namenjenih za lokalnu ili sistemsku terapiju. Prof. Guy smatra da, kao što lekovi za peroralnu primenu treba da zadovolje određene fizičkohemijske kriterijume (pet pravila Lipinskog), slična pravila treba da se primene i za dermalni/transdermalni put primene. On je u svom predavanju prikazao određene matematičke modele za predviđanje permeacije leka kroz kožu i kao ključne parametre za preuzimanje u kožu naveo molekulsku masu, logP i rastvorljivost leka u vodi. Imajući u vidu da je frakcija leka primjenjenog na koži koja penetrira/permeira do mesta dejstva obično veoma mala, prof. Guy je istakao značaj upotrebe pogodne metodologije za procenu isporuke leka u/kroz kožu. Predstavljena je nedavno razvijena nedestruktivna tehnika vizuelizacije, *stimulated Raman scattering* (SRS) mikroskopija, koja omogućava uvid u tzv. „metamorfozu“ lokalno primenjene formulacije leka i daje mehanističke informacije o lokalnoj dispoziciji leka na i u barijeri. Ovom tehnikom se mogu videti neke karakteristike (trans)dermalne isporuke koje se ne mogu uočiti drugim tehnikama, npr. različite brzine penetracije leka kroz folikule dlaka u poređenju sa intracelularnim transportom kroz *stratum corneum*, ili precipitacija kristala leka na površini kože nakon perkutane penetracije korastvarača iz formulacije. Prof. Guy je takođe prikazao primer primene *coherent/stimulated Raman scattering* mikroskopije, u kombinaciji sa konfokalnom fluorescentnom mikroskopijom, za karakterizaciju novih transportnih puteva kroz kožu nakon obrazovanja kanala/pora termalnom ablacijom, kao i praćenje dispozicije lokalno primenjenih mikro- i nanočestica u ovako tretiranoj koži. Imajući u vidu potrebu za širenjem spektra lekova za koje je moguća i opravdana transdermalna primena, prof. Guy je na kraju svog izlaganja skrenuo pažnju na upotrebu

različitih tehnika za formiranje pora u koži („poration“), kao što su termalne tehnike, laser, mikroigle. U kom stepenu ove nove tehnike mogu doprineti poboljšanju isporuke leka u/kroz kožu u odnosu na konvencionalne pristupe, ostaje otvoreno pitanje.

U okviru sesije *Nanoparticles* četvrtog dana skupa u prepodnevnim časovima održan je veliki broj interesantnih predavanja.

U okviru predavanja pod naslovom *Tumor delivery performance study of lipid nanocapsules through FRET imaging*, koje je održala dr Anne-Laure Lainé (INSERM U1066, Angers, Francuska) prikazani su najnoviji rezultati istraživanja vezani za lipidne nanokapsule i *stealth* lipidne nanokapsule obložene PEG-ilovanim fosfolipidima. Dobijeni rezultati su ukazali na činjenicu da umetanje PEG-ilovanih fosfolipida u lipidne nanokapsule povećava njihovu stabilnost u odnosu na konvencionalne lipidne nanokapsule koje nisu PEG-ilovane. Što se tiče biodistribucije lipidnih nanokapsula nakon subkutane primene kod pacova, uočeno je produženo vreme cirkulacije kod *stealth* lipidnih nanokapsula u poređenju sa konvencionalnim lipidnim nanokapsulama, što je konačno rezultovalo u povećanju permeabilnosti i retenciji *stealth* lipidnih nanokapsula u ćelijama tumora. Pored toga, autori su prikazali i mogućnost primene FRET (Forster resonance energy transfer) tehnike kao neinvazivne metode za praćenje integriteta lipidnih nanokapsula.

Na predavanju pod naslovom *PEGylation of non-spherical particles and its influence of phagocytosis*, koje je održao Roman Mathaes, student doktorskih studija (Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Ludwig-Maximilians-University München, Nemačka) ukazano je na činjenicu da pored oblaganja površine čestica polietileglikolom (PEG), promenom u geometriji čestica se u velikoj meri može uticati na biološku distribuciju i poluvreme eliminacije čestica u organizmu. U radu su autori poredili interakciju sa imunim sistemom izduženih nesferičnih mikro- i nanočestica i sferičnih mikro- i nanočestice sa i bez PEG uz primenu tehnika konfokalne skenirajuće mikroskopije i *flow* citometrije. Rezultati dobijenih studija ukazali su na činjenicu da čestice koje imaju izduženu geometriju u manjoj meri bivaju prepoznate i fagocitovane od strane makrofaga retikuloendotelnog sistema. Takođe, pokazano je da sličan efekat na internalizaciju čestica od strane makrofaga retikuloendotelnog sistema imaju PEG-ilovane čestice i čestica sa izuženom geometrijom.

Na predavanju pod naslovom *Dapivirine-loaded polymeric nanoparticles for the prevention of vaginal HIV transmission* koje je održao dr José das Neves (University of Porto, Porto, Portugalija) prikazani su najnoviji rezultati vezani za razvoj nanotehnološki-baziranih sistema za isporuku dapivirina, antiretroviralnog leka koji se trenutno nalazi u kliničkoj fazi ispitivanja kao formulacija gela i vaginalnog prstena. Predavač je u okviru svoga rada prikazao razvoj pozitivno i negativno nanelektrisanih polimernih nanočestica sa dapivirinom, kao i opsežnu *in vitro i in vivo* karakterizaciju

ovih sistema. U okviru *in vitro* karakterizacije prikazano je određivanje veličine nanočestica, zeta potencijala, efikasnosti asocijacija/inkapsulacije leka, kapaciteta opterećenja, ispitivanje površinske morfologije nanočestica, praćenje fizičke stabilnosti, određivanje interakcije čestica sa simuliranim vaginalnim fluidom koji sadrži mucin, procena citotoksičnosti nanočestica (MTS, LDH testovima i testovima kojima se prati profil oslobađanje citokina/hemokina) kao i određivanje *in vitro* antiviralne aktivnosti. Takođe u okviru studije autori su pratili uticaj nanočestica na permeabilnost leka i akumulaciju u tkivima u *in vitro* i *ex vivo* uslovima. U *in vivo* testovima se pratila distribucija leka preko genitalnog trakta, kao i uticaj na lokalnu i sistemsku farmakokinetiku posle vaginalne primene kod ženki miševa. Interesantno je da su pozitivno nanelektrisane polimerne nanočestice i pored potentne antivirusne aktivnosti pokazale veću citotoksičnost od negativno nanelektrisanih čestica.

U okviru predavanja pod naslovom *Anti Abeta antibody decorated nanoparticles correct memory deffect in Alzheimer's disease animal model* koje je održala prof. dr Karine Andrieux (Institute Paris Sud, University Paris Sud, Francuska) opisana je sinteza nanočestica koje mogu da interaguju sa A β peptidom 1-42 (A β_{1-42}) monomerom u cilju povećanja njegove eliminacije i ublažavanja simptoma Alzheimer-ove bolesti. Afinitet nanočestica za A β peptid je evaluiran *in vitro* metodom Surface Plasmon resonance (SPR), dok je biodistribucija radioaktivno obeleženih nanonosača procenjivana *in vivo* nakon i.v. primene nanonosača kod zdravih miševa i miševa sa Alzheimer-ovom bolesti. Dobijeni rezultati SPR metodom su ukazali na visok afinitet razvijenih nanonosača za monomer A β peptida 1-42 (A β_{1-42}), dok su rezultati *in vivo* studije ukazivali na popravljanje simptoma Alzheimer-ove bolesti.

U okviru sesije posvećene slabo rastvornim lekovima, koja je održana četvrtog dana skupa u poslepodnevним časovima održana su tri predavanja, od kojih je svako trajalo 40 minuta. Predavanje pod naslovom Ciklodekstrini održao je prof. dr Thorsteinn Loftsson (Faculty of Pharmacy, University of Iceland, Reykjavik, Iceland) u kome je ukratko dat pregled fizičko-hemijskih i bioloških osobina ciklodekstina, uključujući njihovu tendenciju da obrazuju aggregate. Takođe u okviru svog predavanja prof. Loftsson se osvrnuo na metode koje se koriste za povećanje solubilizirajućih osobina ciklodekstrina, a takođe su opisani i načini na koje ciklodekstrini mogu da povećaju ili smanje biološku raspoloživost lekova u vodenim formulacijama. Na samom kraju, dato je nekoliko primera o upotrebi ciklodekstrina u farmaceutskim formulacijama.

Poslednje predavanje u okviru ove sesije održao je dr Jan Möschwitzer (NextPharma, Berlin, Nemačka i Free University of Berlin, Berlin, Nemačka). U okviru ovog predavanja autor se osvrnuo na *bottom-up* pristupe u pripremi nanokristala, uključujući razvoj različitih formulacija nanokristala ovom metodom i faktore koji utiču na veličinu čestica. Bottom-up pristup za dobijanje nanokristala je tehnologija za dobijanje nanokristala koja još uvek nije dovoljno razvijena i komercijalizovana, ali ima

veliki potencijal u pripremi nanokristala lekovitih supstanci. Autor je kao jednu od prednosti bottom-up pristupa izneo činjenicu da je u odnosu na konvencionalni top-down postupak utrošak energije u pripremi nanokristala manji.

U okviru izložbenog dela, predstavio se veliki broj proizvođača opreme za proizvodnju i analizu lekovitih/pomoćnih supstanci i farmaceutskih preparata, kao i veliki broj proizvođača farmaceutskih sirovina. Na izložbenom štandu su se predstavili i najznačajniji izdavači u oblasti farmaceutskih nauka.

Najveći značaj prisustovanja ovakvom skupu bili su: prilika da se učesnici upoznaju sa najnovijim dostignućima u oblasti farmaceutskih nauka (izrada/proizvodnja, analiza i regulativa), mogućnost sklapanja novih kontakata u cilju uspostavljanja saradnje sa srodnim institucijama u inostranstvu, kao i dobijanje detaljnijih informacija o mogućnosti nabavke farmaceutskih sirovina i opreme.

Izveštaj pripremili:

Dr sc. Sandra Cvijić

Dr sc. Aleksandra Stojković

Dipl. farm. Anđelka Kovačević

Mag. farm. Sanela Đorđević

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju

U Beogradu, 11.07.2014.

PRIKAZ NAUČNE MONOGRAFIJE
„NANOINKAPSULACIJA – PRIMENA I ZNAČAJ U ISPORUCI AKTIVNIH
SUPSTANCI”

Iz štampe je izašla naučna monografija pod naslovom „Nanoinkapsulacija – primena i značaj u isporuci aktivnih supstanci“ autora dr Ljiljane Đekić, docenta na Katedri za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Nanotehnološki pristup u inkapsulaciji aktivnih supstanci (*nanoinkapsulacija*) se razvija izuzetno dinamično tokom poslednje dve decenije i predstavlja važnu strategiju u razvoju novih lekova i kozmetičkih proizvoda poboljšanog kvaliteta, efikasnosti i/ili bezbednosti. Autorka u okviru monografije razmatra karakteristike nanomaterijala koji imaju najveći značaj kao nosači (*nanonosači*) lekovitih supstanci i kozmetički aktivnih supstanci (KAS), postupke nanoinkapsulacije i uticaj nosača na mehanizam isporuke inkapsuliranih supstanci. Navedena problematika je izložena sistematično i pregledno. U uvodnom delu monografije su date osnovne informacije o primeni i značaju nanoinkapsulacije kao savremenom pristupu u tehnološkoj obradi aktivnih supstanci lekova i kozmetičkih proizvoda. U drugom poglavlju su opisani sastav, struktura i fizičko-hemijske osobine vezikularnih nosača, nanoemulzija, mikroemulzija, polimernih nanočestica, čvrstih lipidnih nanočestica i polimernih micela. Treće poglavlje monografije posvećeno je glavnim savremenim pristupima za dobijanje nanonosača, uključujući smanjenje veličine materijala (*top-down* pristup) i formiranje supramolekulskih asocijata (*bottom-up* pristup), kao i postupcima dobijanja nanonosača, aktivne i pasivne inkapsulacije aktivnih supstanci i tehnološke obrade do finalnih formulacija. U četvrtom poglavlju su istaknute specifičnosti u parenteralnoj, peroralnoj i transdermalnoj isporuci nanoinkapsuliranih lekovitih supstanci, pri čemu su ilustrovane mogućnosti za povećanje rastvorljivosti i/ili postizanja ciljne isporuke i povećanja terapijskog indeksa, u poređenju sa konvencionalnim farmaceutskim preparatima, na primerima antineoplastika i antibiotika visoke citotoksičnosti i/ili niske terapijske efikasnosti. Peto

poglavlje monografije obrađuje upotrebu nanoinkapsuliranih KAS u kozmetičkim proizvodima sa ciljem da se postigne odgovarajuća funkcija, izgled i/ili poboljša njihova stabilnost, u odnosu na tradicionalne kozmetičke formulacije. Takođe, u ovom delu je komentarisan aktuelni regulatorni aspekt kozmetičkih proizvoda sa nanonosačima.

Autorka je koristila najnoviju relevantnu stručnu literaturu, što je uz sopstveno teorijsko i praktično iskustvo u ovoj oblasti, omogućilo sveobuhvatno i jasno prezentovanje glavnih aspekata nanoinkapsulacije lekovitih supstanci i KAS. Monografija sadrži i brojne primere registrovanih lekova i kozmetičkih proizvoda sa tržišta, kao i grafikone i tabele, kojima su ilustrovane mogućnosti primene i značaj ove strategije.

Ova monografija predstavlja prvu domaću publikaciju koja sadrži sveobuhvatan i detaljan prikaz primene nanotehnoloških principa u dizajnu lekova i kozmetičkih proizvoda. Njen kvalitet karakteriše i činjenica da je napisana naučnostručnim i razumljivim jezikom, pa predstavlja korisno delo koje bogati stručnu literaturu iz oblasti farmaceutske tehnologije i kozmetologije. Monografija je dobro štivo za studente dodiplomskih studija farmacije kojim mogu da se upotpune znanja iz oblasti savremenih farmaceutskih oblika i kozmetologije, a doprinosi i podsticaju na naučna istraživanja u ovoj aktuelnoj oblasti. Brojni stručni podaci preporučuju ovu monografiju i kao svojevrstan priručnik za sve stručnjake kojima su potrebne informacije o specifičnostima u pogledu rukovanja i primene lekova koji se baziraju na principima nanoinkapsulacije, kao i za šиру stručnu javnost koja je zainteresovana za ovu problematiku.

Prvo izdanje monografije objavljeno je maja 2014. godine u okviru biblioteke *Specialis* izdavačke kuće „Zadužbina Andrejević“ iz Beograda.

Prof. dr Marija Primorac

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju