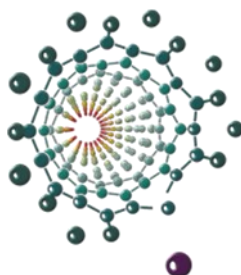


УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ



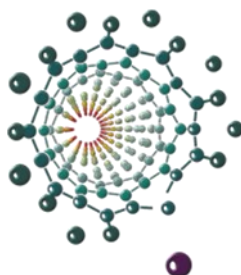
Небојша Ж. Мандић-Ковачевић

**ХЕМОМЕТРИЈСКИ ПРИСТУП РАЗВОЈУ
ЕКОЛОШКИ ПРИХВАТЉИВЕ
ХРОМАТОГРАФСКЕ МЕТОДЕ ЗА АНАЛИЗУ И
ИСПИТИВАЊЕ КИНЕТИКЕ И
ТЕРМОДИНАМИКЕ ДЕГРАДАЦИЈЕ
ПЕРИНДОПРИЛА, АМЛОДИПИНА И
ИНДАПАМИДА**

Докторска дисертација

Београд, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY



Nebojša Ž. Mandić-Kovačević

**CHEMOMETRIC APPROACH TO THE
DEVELOPMENT OF AN ENVIRONMENTALLY
FRIENDLY CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR
THE ANALYSIS AND INVESTIGATION OF THE
DEGRADATION KINETICS AND
THERMODYNAMICS OF
PERINDOPRIL, AMLODIPINE, AND INDAPAMIDE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026.

Ментори:

др Маја Милојевић – Ракић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Ирена Касагић – Вујановић, ванредни професор
Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет

Чланови комисије:

др Ана Поповић Бијелић, редовни професор
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Мирослав Ристић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

др Весна Антуновић, доцент
Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет

др Анка Јевремовић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

Датум одбране: _____

Захвалница

Најискренију захвалност дугујем својим менторима, др Маји Милојевић Ракић и др Ирени Касагић Вујановић, на несебичној подршци, стручном вођењу, корисним саветима и разумевању током израде ове докторске дисертације. Њихово знање, искуство и посвећеност били су од изузетног значаја у свим фазама истраживачког рада, од обликовања научне идеје до коначне израде дисертације.

Посебну и искрену захвалност упућујем др Ани Поповић Бијелић, редовном професору Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду, на изузетној подршци, разумевању и спремности да у сваком тренутку помогне у превазилажењу свих изазова који су се појављивали током израде ове докторске дисертације. Њена стручност, посвећеност, драгоцени савети и људска подршка били су од великог значаја за успешно уобличавање и завршетак овог рада.

Захвалност упућујем и осталим члановима комисије, др Мирославу Ристићу, др Весни Антуновић и др Анки Јевремовић, на пажљивом разматрању дисертације, конструктивним сугестијама и доприносу унапређењу квалитета овог рада.

Посебну захвалност упућујем декану Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, проф. др Ранку Шкрбићу, на указаном поверењу, подршци и прилици коју ми је пружио када ме је запослио на Медицинском факултету. Његова вера у мој потенцијал омогућила ми је да закорачим у свет науке, академског рада и истраживања, што је представљало један од кључних тренутака у мом професионалном развоју и на путу израде ове докторске дисертације. Захвалност дугујем и свим колегама и сарадницима који су својом помоћи, саветима и подршком допринели реализацији експерименталног и истраживачког дела овог рада.

Захваљујем се својој породици, а посебно својој мами на безусловној љубави, стрпљењу, разумевању и подршци током свих година школовања и научног усавршавања. Њена вера у мене, охрабрење и присуство били су мој највећи ослонац у тренуцима изазова и подстицај да истрајем до краја. Неизмерну захвалност дугујем својој баки и тетци, које су ме при сваком доласку у Београд дочекивале са осмехом, а при сваком одласку испраћале са сузама. Њихова љубав, топлина и осећај дома били су један од најлепших и најважнијих ослонаца на овом путу.

Ову дисертацију посвећујем својој супрузи Биљани, без чије љубави, подршке, стрпљења и разумевања овај рад не би био могућ. Посвећујем је и својој кћерки Алини, мом највећем извору радости, снаге и мотивације, уз жељу да јој овај рад једног дана буде подсетник да се истрајношћу, трудом и вером могу остварити и највећи циљеви, а посебно да зна да је, када има такву маму на својој страни, све могуће - и да тата сада може купити још више поклона.

Хеометријски приступ развоју еколошки прихватљиве хроматографске методе за анализу и испитивање кинетике и термодинамике деградације периндоприла, амлодипина и индапамида

Сажетак

Ова докторска дисертација бави се развојем, оптимизацијом и применом еколошки прихватљиве реверзно-фазне високоефикасне течне хроматографске (RP-HPLC) методе за истовремено одређивање периндоприл терц-бутиламина, амлодипин-бесилата и индапамида у фиксној комбинацији доза. Истраживање је засновано на интеграцији принципа аналитичког квалитета по дизајну, зелене аналитичке хемије и кинетичко-термодинамичког испитивања стабилности. Применом експерименталног дизајна систематски су испитани критични параметри методе, дефинисан је простор дизајна и изабрани су оптимални хроматографски услови који обезбеђују добро раздвајање испитиваних анализа, кратко време анализе и поуздане аналитичке перформансе.

Развијена метода је валидирана кроз испитивање специфичности, линеарности, тачности, прецизности, осетљивости и робусности. Добијени резултати потврдили су да је метода погодна за рутинску контролу квалитета испитиване фиксне комбинације доза. Еколошка прихватљивост методе процењена је применом NEMI (енг. National Environmental Methods Index), Analytical Eco-Scale, GAPI (енг. Green Analytical Procedure Index) и AGP (енг. Assessment of Green Profile) приступа, при чему је показано да оптимизована метода има повољан зелени профил, смањену потрошњу органског растварача и мање оптерећење животне средине у односу на конвенционалне HPLC поступке.

У другом делу дисертације испитана је стабилност периндоприла, амлодипина и индапамида појединачно, у бинарним и тернарним смешама, под киселим, базним, неутралним, оксидативним, термичким и фотолитичким условима. Кинетичком анализом одређени су редови реакција, константе брзине разградње, времена полураспада, рокови трајања, енергије активације и привидне термодинамичке функције активације. Резултати су показали да стабилност испитиваних лекова зависи од природе примењеног деградационог фактора и састава смеше. Периндоприл је био најосетљивији на базно катализовану хидролизу, амлодипин на базне и оксидативне услове, док је индапамид показао изражену фотосензитивност. Утврђено је да присуство других активних супстанци може имати стабилизујући или дестабилизујући ефекат, што је од значаја за рационалан развој стабилних фиксних комбинација лекова.

Кључне речи: RP-HPLC, QbD, зелена аналитичка хемија, периндоприл, амлодипин, индапамид, кинетика разградње, стабилност.

Научна област: Физичка хемија

Ужа научна област: Физичка хемија – контрола и заштита животне средине, Физичка хемија – термодинамика, материјали и Физичка хемија – хемијска кинетика.

Chemometric approach to the development of an environmentally friendly chromatographic method for the analysis and investigation of the degradation kinetics and thermodynamics of perindopril, amlodipine, and indapamide

Abstract

This doctoral dissertation focuses on the development, optimization, and application of an environmentally friendly reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the simultaneous determination of perindopril tert-butylamine, amlodipine besylate, and indapamide in a fixed-dose combination. The research is based on the integration of the principles of Analytical Quality by Design, Green Analytical Chemistry, and kinetic-thermodynamic stability studies. Using an experimental design approach, critical method parameters were systematically investigated, the design space was defined, and optimal chromatographic conditions were selected to ensure good separation of the analytes, a short analysis time, and reliable analytical performance.

The developed method was validated by evaluating specificity, linearity, accuracy, precision, sensitivity, and robustness. The obtained results confirmed that the method is suitable for the routine quality control of the fixed-dose combination under investigation. The environmental friendliness of the method was assessed using the NEMI (National Environmental Methods Index), Analytical Eco-Scale, GAPI (Green Analytical Procedure Index), and AGP (Assessment of Green Profile) approaches; the results demonstrated that the optimized method possesses a favorable green profile, reduced organic solvent consumption, and a lower environmental impact compared to conventional HPLC procedures.

The second part of the dissertation investigated the stability of perindopril, amlodipine, and indapamide—individually and in binary and ternary mixtures—under acidic, alkaline, neutral, oxidative, thermal, and photolytic conditions. Kinetic analysis was used to determine reaction orders, degradation rate constants, half-lives, shelf-lives, activation energies, and apparent thermodynamic activation functions. The results demonstrated that the stability of the investigated drugs depends on the nature of the applied degradation factor and the composition of the mixture. Perindopril was most susceptible to base-catalyzed hydrolysis, and amlodipine to both basic and oxidative conditions, whereas indapamide exhibited marked photosensitivity. It was found that the presence of other active substances can exert a stabilizing or destabilizing effect, a finding of significance for the rational development of stable fixed-dose drug combinations.

Keywords: RP-HPLC, QbD, green analytical chemistry, perindopril, amlodipine, indapamide, degradation kinetics, stability.

Scientific field: Physical chemistry

Scientific discipline: Physical chemistry – environmental control and protection, Physical chemistry – thermodynamics, materials and Physical chemistry – chemical kinetics.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1 Лечење хипертензије: Изазови и могућности у терапији комбинованим фиксним дозама	1
1.1.1 Глобални терет хипертензије и потреба за ефикасним лечењем	1
1.1.2 Предности комбинација фиксних доза (КФД) у лечењу хипертензије	1
1.2 Изазови у развоју и контроли квалитета КФД	2
1.3 Високоефикасна течна хроматографија (HPLC): камен темељац фармацеутске анализе	3
1.3.1 Принципи течне хроматографије	3
1.3.2 Компоненте система за течну хроматографију високих перформанси (HPLC)	4
1.3.3 Мобилна и стационарна фаза у RP-HPLC	5
1.4 Фармацеутски квалитет по дизајну (QbD): Промена парадигме у развоју лекова	6
1.4.1 Еволуција контроле фармацеутског квалитета: од квалитета тестирањем до квалитета дизајном	6
1.4.2 Кључни елементи QbD-а у фармацеутском развоју	6
1.4.3 Аналитички квалитет по дизајну (AQbD): Обезбеђивање робусних и поузданих аналитичких метода.....	7
1.5 Зелена аналитичка хемија (GAC): Ка одрживој фармацеутској анализи	8
1.5.1 Утицај традиционалних аналитичких метода на животну средину.....	8
1.5.2 Принципи и стубови зелене аналитичке хемије	9
1.5.3 Интеграција GAC у фармацеутску анализу.....	10
1.6 Физичко-хемијска својства и структуре кључних антихипертензивних лекова.....	10
1.6.1 Периндоприл терц-бутиламин (ПЕР).....	11
1.6.2 Амлодипин бесилат (АМЛ).....	12
1.6.3 Индапамид (ИНД)	13
1.6.4 Резиме физичко-хемијских својстава.....	14
1.7 Систематски развој аналитичких метода за комбинације фиксне дозе: приступ квалитета по дизајну	14
1.7.1 Образложење за развој нове HPLC методе за троструку комбинацију	15
1.8 Испитивање стабилности и кинетике разградње антихипертензивних лекова у фиксним комбинацијама лекова	16
1.8.1 Значај студија стабилности у фармацеутском развоју	16
1.8.2 Пuteви разградње и кинетика активних фармацеутских састојака	17
1.8.3 Понашање разградње периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида (појединачно и комбиновано)	18
2. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА	19
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ	20

3.1	Преглед експерименталног дизајна и приступа	20
3.2	Хемикалије и реагенси.....	20
3.2.1	Активне фармацеутске супстанце (АПИ).....	21
3.2.2	Растварачи и компоненте мобилне фазе.....	21
3.2.3	Стрес реагенси за студије деградације	21
3.2.4	Помоћне супстанце и плацебо смеша	22
3.3	Апарати и опрема	22
3.3.1	Систем високоефикасне течне хроматографије.....	22
3.4	Припрема раствора.....	23
3.4.1	Основни раствори стандарда	23
3.4.2	Радни раствори стандарда за развој методе и валидацију	24
3.4.3	Припрема узорака за анализу таблета.....	24
3.4.4	Припрема узорака за студије кинетике разградње.....	24
3.5	Хроматографски услови и развој методе	25
3.5.1	Дизајн експеримента за оптимизацију метода	26
3.6	Валидација методе.....	26
3.6.1	Специфичност/Селективност.....	26
3.6.2	Линеарност	27
3.6.3	Тачност.....	27
3.6.4	Прецизност	27
3.6.5	Осетљивост методе: Граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ) 27	
3.6.6	Робусност.....	28
3.7	Процена утицаја аналитичке методе на животну средину.....	28
3.7.1	Процењени параметри	29
3.8	Кинетичке студије разградње.....	29
3.8.1	Узорковање и анализа.....	30
3.8.2	Кинетички прорачуни.....	30
3.9	Анализа података и статистичке методе.....	31
3.9.1	Софтвер за анализу података	32
3.9.2	Статистички тестови.....	32
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	34
4.1	Резултати развоја и оптимизације методе.....	35
4.1.1	Прелиминарне студије и процена ризика	35
4.1.2	Оптимизација методе коришћењем Централног композитног дизајна	36
4.2	Резултати и дискусија валидације аналитичке методе	44
4.2.1	Специфичност	44

4.2.2	Линеарност	46
4.2.3	Тачност.....	47
4.2.4	Прецизност	47
4.2.5	Граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ)	48
4.2.6	Робусност.....	48
4.2.7	Предности и иновације у анализи КФД.....	50
4.3	Резултати и дискусија процене утицаја методе на животну средину	50
4.3.1	Евалуација Националног индекса метода заштите животне средине (NEMI).....	51
4.3.2	Аналитичка еко-скала.....	52
4.3.3	Процена индекса зелене аналитичке процедуре (GAPI)	53
4.3.4	Процена зеленог профила (AGP).....	54
4.3.5	Компаративна анализа еколошке прихватљивости методе	55
4.3.6	Допринос одрживој фармацеутској анализи	56
4.4	Резултати и дискусија студије кинетике деградације.....	57
4.4.1	Испитивање стабилности лека под различитим стресним условима	57
4.4.2	Профил стабилности периндоприл терц-бутиламина	62
4.4.3	Профил стабилности амлодипин бесилата	63
4.4.4	Профил стабилности индапамида	64
4.4.5	Утицај интеракције између лекова на стабилност	65
4.4.5.1	ПЕР-АМЛ бинарне интеракције	65
4.4.5.2	ПЕР-ИНД бинарне интеракције.....	66
4.4.5.3	АМЛ-ИНД бинарне интеракције	67
4.4.5.4	ПЕР-АМЛ-ИНД тернарне интеракције	68
4.4.6	Кинетички параметри, моделовање деградације и механистички увиди.....	69
4.4.6.1	Периндоприл - нестабилност изазвана хидролизом естра	74
4.4.6.2	Амлодипин - Оксидативно-осетљив дихидропиридински систем.....	75
4.4.6.3	Индапамид - Претежна фотохемијска деградација.....	75
4.4.6.4	Аренијус/Ејринг моделовање и импликације на интегрисану стабилност.....	75
4.5	Регулаторне и практичне импликације	78
4.6	Интеграција QbD, GAC и студија стабилности.....	79
4.7	Утицај на развој лекова са комбинацијом фиксних доза	79
5.	ЗАКЉУЧЦИ.....	81
6.	ЛИТЕРАТУРА	83
7.	ПРИЛОЗИ.....	90

1. УВОД

1.1 Лечење хипертензије: Изазови и могућности у терапији комбинованим фиксним дозама

1.1.1 Глобални терет хипертензије и потреба за ефикасним лечењем

Хипертензија, познат висок крвни притисак, једна је од најраспрострањенијих хроничних незаразних болести широм света, погађајући процењених 1,28 милијарди одраслих особа старости 30–79 година (1). Њена подмукла природа, која се често јавља без очигледних симптома, донела јој је надимак „тихи убица“. Неконтролисана хипертензија је главни фактор ризика за кардиоваскуларне болести који се може променити, укључујући срчани удар, мождани удар, срчану инсуфицијенцију и болести бубрега, значајно доприносећи глобалном морбидитету и морталитету (2,3). Економски терет повезан са хипертензијом, који обухвата трошкове здравствене заштите, губитак продуктивности и превремену смрт, је велики, што представља значајан изазов за системе јавног здравља широм света (1,3).

Ефикасно лечење хипертензије је од највеће важности за ублажавање њених разарајућих последица. Иако промене начина живота чине темељ превенције и контроле хипертензије, фармаколошке интервенције су често неопходне, посебно за особе са умереном до тешком хипертензијом или оне са високим кардиоваскуларним ризиком. Терапеутски пејзаж за хипертензију је разнолик, нудећи низ класа антихипертензивних лекова, укључујући инхибиторе ензима који конвертује ангиотензин (АЦЕ инхибитори), блокаторе рецептора ангиотензина (АРБ), блокаторе калцијумових канала (БКК), диуретике и бета-блокаторе.

Историјски гледано, монотерапија је била почетни приступ, са повећањем дозе или секвенцијалним додавањем других лекова док се циљни крвни притисак не постигне. Међутим, постизање оптималне контроле крвног притиска често захтева употребу више антихипертензивних агенаса (4).

1.1.2 Предности комбинација фиксних доза (КФД) у лечењу хипертензије

У последњим деценијама, комбинације фиксних доза, познате и као комбинације појединачних таблета, појавиле су се као кључна стратегија у лечењу хипертензије, нудећи поједностављен и често ефикаснији приступ у поређењу са применом појединачних лекова одвојено (5). КФД интегришу два или више антихипертензивних лекова из различитих класа у једну таблету, чиме се поједностављује режим лечења. Ово поједностављење се директно преводи у неколико значајних предности:

Прво, и можда најкритичније, фиксне комбинације лекова побољшавају адхеренцу пацијената, односно њихово придржавање прописаном терапијском режиму (6). Сложеност режима са више лекова, који често укључује различите распореде дозирања и већи број дозираних фармацеутских облика може бити значајна препрека за доследан унос лекова. Смањењем броја дозних облика које пацијент треба да узима дневно, КФД ублажавају овај терет, што доводи до бољег придржавања и, последично, одрживије контроле крвног притиска. Боље придржавање је кључни фактор успеха лечења и главни фактор у смањењу кардиоваскуларних догађаја (7).

Друго, КФД често доводе до побољшане контроле крвног притиска и могу потенцијално смањити нежељене ефекте. Синергијско дејство лекова из различитих група, од којих сваки циља посебан физиолошки пут укључен у регулацију крвног притиска, може постићи већи

антихипертензивни ефекат него повећање дозе једног лека (8). Штавише, комбиновање лекова са комплементарним механизмима деловања често може неутралисати нежељене ефекте повезане са појединачним лековима. На пример, диуретик може ублажити едем скочног зглоба изазван блокатором калцијумових канала, или АЦЕ инхибитор може уравнотежити ефекат диуретика који доводи до појачане елиминације калијума из организма. Овај уравнотежени фармаколошки профил може побољшати подношљивост и квалитет живота пацијената, додатно доприносећи придржавању терапије.

Треће, улога фиксних комбинација лекова у клиничким смерницама и њихово укључивање на листе есенцијалних лекова подвлачи њихову препознату вредност. Главне међународне и националне смернице за хипертензију све више препоручују започињање лечења режимом са два лека, пожељно у фиксним комбинацијама (ФК), за значајан део пацијената, посебно оних са вишим почетним крвним притиском (9,10). Светска здравствена организација (СЗО) је такође препознала важност антихипертензивних лекова у ФК тако што их је уврстила на своју Листу есенцијалних лекова, истичући њихову кључну улогу у глобалним здравственим стратегијама за управљање незаразним болестима (11). Ова глобална подршка одражава растући консензус о клиничкој ефикасности и користима ФК за јавно здравље.

Међутим, са становишта фармацеутског развоја, комбинације фиксних доза представљају посебан изазов за стабилност. Присуство више активних фармацеутских састојака у једном дозном облику може променити појединачне путеве разградње, модификовати брзину разградње или промовисати нове механизме разградње изазване интеракцијама. Стога, поред својих клиничких предности, фиксне комбинације доза захтевају ригорозну научну процену физичко-хемијске компатибилности и стабилности током целог животног циклуса готовог производа (ГП). Посебно је важно нагласити да интеракције између активних супстанци могу довести до промена у кинетици разградње, што захтева детаљну механистичку и термодинамичку анализу стабилности сваке компоненте унутар КФД лекова (12).

1.2 Изазови у развоју и контроли квалитета КФД

Упркос неоспорним предностима, развој и контрола квалитета КФД-а представљају јединствене и често сложене изазове. Примарна тешкоћа произилази из инхерентне сложености комбиновања више активних фармацеутских супстанци (енг. *active pharmaceutical ingredient* - АПИ) унутар једног фармацеутског дозирањог облика. Сваки АПИ поседује различита физичко-хемијска својства, укључујући растворљивост, стабилност и компатибилност са другим једињењима у готовом производу, што може значајно утицати на целокупну формулацију и њене перформансе. Обезбеђивање хемијске стабилности свих АПИ, како појединачно, тако и у комбинацијама, током рока трајања производа је изузетно тежак задатак. Интеракције између АПИ у готовом производу или између АПИ и помоћних супстанци, могу довести до смањене биорасположивости или стварања потенцијално штетних производа услед њихове разградње (13).

Штавише, аналитичке методе потребне за истовремену квалитативну и квантитативну анализу већег броја АПИ у фиксној комбинацији доза морају бити специфичне, тачне, прецизне и осетљиве за сваку АПИ испитиваног готовог производа, као и потенцијалне производе њихове деградације (нечистоће).

Традиционални развој аналитичких метода (испитивање утицаја само једног фактора на одабране одговоре система) често укључује приступ великог броја покушаја и поновљених грешака, што може бити дуготрајан процес у проналажењу оптималних услова анализе. То захтева много ресурса, економски и временски је неисплативо и не мора увек дати оптималне услове анализе. Потреба за ефикасним и поузданим аналитичким техникама је од највеће

важности за обезбеђивање квалитета, безбедности и ефикасности КФД-а током њиховог животног циклуса, од производње до примене код пацијената. Ови изазови захтевају систематски и научно утемељен приступ развоју КФД и контроли квалитета, отварајући пут напредним методологијама, као што су уградња квалитета у току креирања методе (енг. *Quality by Design - QbD*) и зелена аналитичка хемија (енг. *Green Analytical Chemistry - GAC*) (14). Оба приступа заједно омогућавају да се развије већ робусна метода, која је усмерена да буде еколошки најприхватљивија под испитиваним условима. Поред тога, интеграција студија стабилности и испитивање кинетике разградње у оквиру овог систематског оквира омогућава квантитативно и механистичко разумевање понашања разградње, пружајући научну основу за оптимизацију формулације и предвиђање рока трајања лека.

1.3 Високоефикасна течна хроматографија (HPLC): камен темељац фармацеутске анализе

1.3.1 Принципи течне хроматографије

Хроматографија је, у својој суштини, моћна аналитичка метода која се користи за раздвајање, идентификацију и одређивање садржаја једињења у испитivanoј смеши. Она функционише на принципу прерасподеле испитиваних анализата између две немешљиве фазе: стационарне фазе и мобилне фазе. Стационарна фаза је фиксни слој материјала, обично упакован у колону, док је мобилна фаза флуид (течност или гас) који преноси испитивану смешу/узорак кроз стационарну фазу. Компоненте смеше различито интерагују са ове две фазе на основу њихових физичко-хемијских својстава (нпр. поларност, величина, наелектрисање), што доводи до различитих времена њиховог задржавања и самим тим раздвајања једињења из испитиване смеше. Аналити који имају јачи афинитет за стационарну фазу биће задржани дуже, док ће се они са јачим афинитетом за мобилну фазу брже елуирати (15).

Високоефикасна течна хроматографија (ТХ) посебно користи течну мобилну фазу (смеша поларних и неполарних растварача). То је широко примењива техника, посебно погодна за анализу неиспарљивих и термички лабилних једињења, која се не могу анализирати гасном хроматографијом. ТХ обухвата различите режиме, сваки прилагођен специфичним изазовима раздвајања. Ови режими се првенствено разликују по природи њихове стационарне и мобилне фазе и основном механизму раздвајања:

- Адсорпциона хроматографија: Користи поларну стационарну фазу (нпр. силицијум-диоксид и њене модификације) и неполарну мобилну фазу. Раздвајање се одвија на основу адсорпције и десорпције анализата на површини стационарне фазе. Овај режим се често користи за раздвајање једињења са различитим функционалним групама.
- Партициона хроматографија: Укључује течну стационарну фазу нанесену на чврсти носач. Аналити се деле између мобилне фазе и стационарне течне фазе по принципу течно-течне расподеле. Ово је основа и за нормално-фазну (поларна стационарна фаза, неполарна мобилна фаза) и за реверзно-фазну (неполарна стационарна фаза, поларна мобилна фаза) хроматографију.
- Јоноизмењивачка хроматографија: Користи стационарну фазу са наелектрисаним функционалним групама које могу да интерагују са наелектрисаним анализитима у мобилној фази по принципу катјон-анјон интеракције. Широко се користи за раздвајање јона и наелектрисаних молекула, попут протеина и аминокиселина.
- Хроматографија молекуларног просејавања/Гел пермеациона хроматографија: Раздваја молекуле на основу њихове величине. Стационарна фаза се састоји од порозних честица, већи молекули елуирају брже јер су искључени из пора, док мањи молекули продиру у поре и дуже се задржавају.

- Афинитетна хроматографија: Високо специфична техника раздвајања где стационарна фаза садржи лиганд који се специфично везује за циљни аналит (нпр. интеракција антители-антиген). Обично се користи за пречишћавање биомолекула или за испитивање специфичних лекова по принципу интеракције лек-рецептор.

Међу њима, течна хроматографија са обрнутом фазом (RP-LC) је далеко најчешће коришћени метод у фармацеутској анализи због своје широке примене, репродуктивности и способности раздвајања широког спектра једињења. У RP-LC, стационарна фаза је неполарна (нпр. C18, C8 алкил ланци везани за силицијум-диоксид), а мобилна фаза је поларна (смеша воде или воденог раствора пуфера и органског растварача попут ацетонитрила, пропанола, етанола или метанола). Аналити се раздвајају на основу разлике у степену хидрофобности; једињења са већим степеном хидрофобности се задржавају дуже на неполарној стационарној фази (16).

1.3.2 Компоненте система за течну хроматографију високих перформанси (HPLC)

Течна хроматографија високих перформанси (HPLC) је напредни облик течне хроматографије који користи висок притисак како би се мобилна фаза пропустила кроз колону испуњену јако ситним честицама, што доводи до високо ефикасних и брзих раздвајања. Типичан HPLC систем се састоји од неколико компоненти, од којих свака игра кључну улогу у аналитичком процесу (17):

- Резервоар растварача (мобилна фаза): Садржи мобилну фазу, која је обично смеша два или више растварача (нпр. вода и ацетонитрил). Ови растварачи морају бити високе чистоће (HPLC квалитета) и често се дегасирају како би се спречило стварање мехурића у систему.
- Пумпа: Доводи мобилну фазу из резервоара кроз колону прецизном и константном брзином протока и високим притиском (до 600 бара или више). Различити модови пумпе (нпр. изократски, градијентни) омогућавају константан или променљив састав мобилне фазе током времена анализе по тачно дефинисаном распореду.
- Инјектор (аутоматски узоркивач): Уводи прецизну запремину узорка у ток мобилне фазе. Модерни HPLC системи обично користе аутоматске семплере за аутоматизоване, репродуктивне инјекције, који могу да поднесу велики број узорака.
- Аналитичка колона: Срце HPLC система, где се одвија раздвајање. То је цев од нерђајућег челика напуњена честицама стационарне фазе (нпр. силицијум диоксидом модификованим са C18 алкилним ланцима). Димензије колоне (дужина, унутрашњи пречник и величина честица са којима је колона напуњена) су кључне за ефикасност раздвајања.
- Детектор: Смештен на крају колоне, детектује одвојене анализе док се елуирају из колоне. Постоје различити типови детектора, који се бирају на основу својстава анализата. Уобичајени HPLC детектори су:
 - УВ/ВИС детектор: Мери апсорпцију ултраљубичасте или видљиве светлости анализата. Диодни детектори низа (енг. *diode array detector-DAD*) су врста УВ/ВИС детектора помоћу којих се истовремено могу детектовати комплетни УВ спектри у низу таласних дужина са размаком од по 2 nm, пружајући вредне информације за идентификацију максимума апсорпције и процену чистоће пикова.
 - Детектор индекса преламања: Мери промене индекса преламања мобилне фазе током елуирања анализата из колоне. То је универзални детектор, али је мање осетљив и не може се користити приликом градијентног елуирања.

- Детектор флуоресценције: Детектује једињења која природно флуоресцирају или се могу функционализовати да флуоресцирају. Високо је осетљив и селективан.
- Детектор масене спектрометрије: Пружа информације о молекулској маси и структури анализата, нудећи високу осетљивост и специфичност. Течна хроматографија-масена спектрометрија (ТХ-МС) је моћна техника која се широко користи за анализу сложених смеша и прецизну идентификацију деградационих производа АПИ.
- Систем за аквизицију података: Рачунарска радна станица опремљена специјализованим софтвером (нпр. Agilent ChemStation) који контролише HPLC систем, прикупља податке са детектора, обрађује хроматографске сигнале и омогућава статистичку подршку за анализу сваког хроматографског пика (прорачун фактора симетрије, висина и ширина пика, површина пика значајна за квантитативну анализу и др.).

1.3.3 Мобилна и стационарна фаза у RP-HPLC

Како је преко 80% лекова на тржишту неполарног карактера, RP-HPLC је најчешће примењивана метода за испитивање лекова и њихову контролу квалитета (18).

Мобилна фаза у RP-HPLC је типично смеша воде (или воденог раствора пуфера) и органског растварача који се меша са водом, најчешће ацетонитрила или метанола. Водена фаза често садржи одређене пуфере (нпр. фосфатни или ацетатни) за одржавање рН вредности на жељеним вредностима, што је кључно за контролу стања јонизације јонизабилних анализата и самим тим њихових карактеристика задржавања. Модификатори мобилне фазе, попут реагенса за јонско упаривање, такође се могу додати како би се побољшало раздвајање наелектрисаних једињења. Однос органског растварача и водене фазе је кључни параметар који диктира јачину мобилне фазе. Повећање садржаја органског растварача (нпр. ацетонитрила) генерално смањује време задржавања анализата на стационарној фази – мобилној фази се повећава афинитет за преузимање испитиваних једињења са површине стационарне фазе, чини је мање поларном, са чиме се повећава њена јачина елуирања. Градијентно елуирање, где се састав мобилне фазе мења током времена, по јасно дефинисаној шеми, често се користи за раздвајање сложених смеша са широким спектром поларности (19).

Стационарна фаза у RP-HPLC се састоји од неполарних лиганда хемијски везаних за носач као што је порозни силицијум-диоксид. Најчешће модификације стационарне фазе су са C18 (октадецилсилан) и C8 (октилсилан) ланцима, што директно утиче на степен неполарности која се жели постићи на њеној површини. Ови неполарни ланци пружају хидрофобну површину која интерагује са анализитима. Честице силицијум-диоксида су типично сферне и порозне, са контролисаном величином пора и површином како би се максимизовала интеракција са једињењима. Величина честица стационарне фазе (нпр. 5 μm , 3,5 μm , 1,8 μm) директно утиче на ефикасност колоне и повратни притисак; мање честице доводе до веће ефикасности и боље резолуције хроматографских пикова, али захтевају веће радне притиске. Избор стационарне фазе зависи од хидрофобности (партиционог коефицијента, $\log P$) и хемијске природе анализата који се раздвајају (20).

Интеракција између мобилне фазе и стационарне фазе је фундаментална за механизам раздвајања у RP-HPLC. Анализити се деле између хидрофобне стационарне фазе и релативно поларне мобилне фазе. Хидрофобнији анализити ће проводити више времена у интеракцији са стационарном фазом, што ће довести до дужег времена задржавања, док ће поларнији анализити бити растворљивији у мобилној фази и брже елуирати – имају краће време задржавања на

стационарној фази. Пажљивим контролисањем састава мобилне фазе (нпр. процента органског растварача, рН вредности воденог дела мобилне фазе, концентрације пуфера) и одабиром одговарајуће стационарне фазе, могу се постићи високо ефикасна и селективна раздвајања за широк спектар АПИ (15).

1.4 Фармацеутски квалитет по дизајну (QbD): Промена парадигме у развоју лекова

1.4.1 Еволуција контроле фармацеутског квалитета: од квалитета тестирањем до квалитета дизајном

Фармацеутска индустрија се историјски ослањала на приступ „Квалитет тестирањем“ (QbT), где је квалитет производа првенствено осигураван кроз опсежно тестирање готовог производа. Ова традиционална парадигма је укључивала тестирање узорака из сваке серије како би се осигурало да испуњавају унапред дефинисане спецификације. Иако наизглед једноставан, овај приступ је имао инхерентна ограничења. Био је реактиван, а не проактиван. Често је идентификовао проблеме са квалитетом тек након што је производња завршена, што је довело до скупих одбијања серија, преправки и кашњења. Штавише, QbT је пружио ограничено разумевање самог производног процеса, што је отежало идентификацију основних узрока варијабилности или спровођење континуираних побољшања (21). Фокус је био на откривању дефеката, а не на њиховом спречавању.

Препознајући ова ограничења, регулаторна тела широм света, посебно Међународни савет за хармонизацију техничких захтева за регистрацију лекова за хуману употребу (енг. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH*), покренула су промену парадигме ка проактивнијем, научно и ризично заснованом приступу фармацеутском развоју: Квалитет по дизајну (QbD). QbD се дефинише као систематски приступ развоју који почиње са унапред дефинисаним циљевима и наглашава разумевање производа и процеса, као и контролу процеса, засновано на поузданој науци и управљању ризицима квалитета (22). Ова промена је садржана у смерницама ICH Q8 (R2) Фармацеутски развој, ICH Q9 Управљање ризицима квалитета и ICH Q10 Систем фармацеутског квалитета, које се заједно залажу за свеобухватни систем управљања квалитетом током животног циклуса производа (23–25). Основна начела QbD-а је да се квалитет не може тестирати у производима; он мора бити уграђен већ у дизајну.

1.4.2 Кључни елементи QbD-а у фармацеутском развоју

Имплементација QbD-а обухвата неколико међусобно повезаних елемената који воде процес развоја од идеје до комерцијализације:

Профил циљаног квалитета производа (енг. *Quality Target Product Profile - QTPP*) представља почетну тачку сваке QbD иницијативе. QTPP је проспективни резиме карактеристика квалитета лека које ће идеално бити постигнуте како би се осигурао жељени квалитет, узимајући у обзир безбедност и ефикасност (26). Он дефинише жељене перформансе лека, укључујући његове критичне атрибуте квалитета (енг. *Critical Quality Attribute - CQA*), облик дозирања, јачину, начин примене и карактеристике стабилности. QTPP служи као водич, осигуравајући да су све развојне активности усклађене са крајњим циљем производње висококвалитетног производа који задовољава потребе пацијената.

Критични атрибути квалитета (CQA) представљају физичка, хемијска, биолошка или микробиолошка својства унутар одговарајуће границе, опсега или дистрибуције како би се осигурао жељени квалитет производа (27). CQA се изводе из QTPP и обично су повезани са лековитом супстанцом, помоћним супстанцама, међупроизводима и леком. Идентификација CQA је кључна, јер усмерава фокус развојних напора ка разумевању и контроли оних аспеката који су најкритичнији за квалитет производа.

Управљање ризиком квалитета (ICH Q9) представља саставни део QbD-а. Оно обухвата систематске процесе за процену, контролу, комуникацију и преглед ризика по квалитет лека током његовог животног циклуса (23). Процена ризика помаже у идентификовању потенцијалних извора варијабилности и њиховог утицаја на CQA. Алати као што су Анализа начина отказа и ефеката (FMEA) или Анализа опасности и критичних контролних тачака (НАССР) се често користе за процену ризика и одређивање приоритета експерименталног рада, осигуравајући да се ресурси ефикасно распоређују за решавање најзначајнијих ризика.

Простор дизајна (енг. *Design Space – DS*) је дефинисан као вишедимензионална комбинација и интеракција улазних варијабли (нпр. атрибути материјала) и параметара процеса за које је доказано да пружају гаранцију квалитета (24). Он представља робусни регион – регион (3Д простор) у којем је дефинисан распон дозвољених вредности свих значајних варијабли (критичних фактора) које ће гарантовати добијање тачних података за праћење одговора система. Рад у оквиру простора дизајна се не сматра променом и не захтева подношење захтева за измене након одобрења од стране регулаторних органа. Простор дизајна се обично успоставља кроз свеобухватно разумевање процеса, често стечено кроз експериментални дизајн (енг. *Design of Experiments - DoE*) и технологију анализе процеса (енг. *Process Analytical Technology - PAT*). Он пружа флексибилност произвођачима, омогућавајући им да врше прилагођавања у оквиру дефинисаног простора без претходног одобрења регулаторних органа, све док се одржава квалитет производа.

Стратегија контроле (енг. *Control strategy*) је планирани скуп контрола, изведен из тренутног разумевања производа и процеса, који осигурава перформансе процеса и квалитет производа (23). Укључује контроле полазних сировина, материјала у току производног процеса и финалног лека, као и контролу и праћење комплетног процеса. Стратегија контроле осигурава да производни процес доследно функционише у оквиру простора дизајна и да се критички атрибути квалитета доследно испуњавају. То је динамичан документ који се развија са повећаним разумевањем производа и процеса.

QbD негује културу сталног унапређења током целог животног циклуса производа. То подразумева континуирано праћење перформанси процеса и квалитета производа, идентификовање могућности за оптимизацију и имплементацију промена на основу нових знања и разумевања. Овај интерактивни приступ осигурава да производни процес остане робустан и способан да константно испоручује висококвалитетне производе.

1.4.3 Аналитички квалитет по дизајну (AQbD): Обезбеђивање робусних и поузданих аналитичких метода

Баш као што је QbD донео прекретницу у развој фармацеутских производа, његови принципи су проширени на развој аналитичких метода, што је довело до концепта AQbD. AQbD је систематски приступ развоју аналитичких метода који има за циљ да угради квалитет у методу од самог почетка њеног развоја кроз процес оптимизације и валидације, уместо да се ослања искључиво на завршну проверу и тестирање поузданости и репродуктивности методе (27). Циљ AQbD-а је развој робусних, поузданих и наменски прикладних аналитичких метода које доследно пружају тачне, прецизне и репродуктивне резултате током примене.

Примена QbD принципа на аналитичке методе подразумева дефинисање Аналитичког циљног профила (енг. *Analytical Target Profile - ATP*), који је аналоган QTPP-у за лекове. ATP дефинише жељене карактеристике перформанси аналитичке методе, као што су: специфичност, линеарност, тачност, прецизност и осетљивост (граница детекције и граница квантификације). Затим се идентификују критични атрибути (параметри) методе (енг. *Critical Method Attributes - CMA*), који су параметри аналитичке методе (критични фактори) који могу значајно утицати на њене перформансе (одговоре система). У хроматографској методи то може укључивати састав мобилне фазе, врсту стационарне фазе, температуру колоне, брзину протока мобилне фазе, концентрацију испитиваног узорка и волумен инјектовања, или подешавања детектора (нпр. подешавање таласне дужине за детекцију, или одабир више таласних дужина за анализу).

DoE игра кључну улогу у AQbD. Уместо традиционалног приступа „*One factor at the time*“ (испитивање једног по једног фактора), DoE омогућава истовремено истраживање више фактора и њихових интеракција (нпр. двофакторске интеракције), пружајући свеобухватно разумевање критичних параметара методе и њиховог утицаја на перформансе методе (28). Систематским варирањем експерименталних услова, DoE помаже у идентификовању оптималних оперативних опсега за сваки параметар и успостављању DS методе, у оквиру којег метода остаје робусна и поуздана. Ово систематско истраживање значајно смањује број потребних експеримената до проналажења DS-а, штеди време и ресурсе и минимизира стварање отпада, што је у складу са принципима зелене хемије.

Предности AQbD су вишеструке. Доводи до развоја робуснијих, поузданијих и репродуктивних аналитичких метода, а овакве методе обезбеђују сигуран квалитет података, спречавају могућност добијања резултата који нису у складу са спецификацијама и повећавају поверење у аналитичка мерења током анализе. Штавише, AQbD олакшава трансфер метода између лабораторија, јер су DS и критични параметри методе јасно идентификовани, дефинисани и документовани. Овај систематски приступ такође промовише дубље разумевање аналитичког процеса, омогућавајући ефикасније решавање проблема и континуирано побољшање током животног циклуса методе. У крајњој линији, AQbD значајно доприноси обезбеђивању сигурних и тачних података током провере квалитета и безбедности фармацеутских производа (29).

1.5 Зелена аналитичка хемија (GAC): Ка одрживој фармацеутској анализи

1.5.1 Утицај традиционалних аналитичких метода на животну средину

Аналитичка хемија, иако неопходна за контролу квалитета, истраживање и развој у различитим индустријама, историјски је значајно доприносила загађењу животне средине. Традиционалне аналитичке методе често се у великој мери ослањају на употребу по околину штетних хемикалија, укључујући испарљиве органске раствараче, јаке киселине и базе и токсичне реагенсе. Ове хемикалије могу да представљају и значајан ризик по људско здравље и безбедност (30). Стварање значајних количина хемијског отпада, што често захтева специјализоване и скупе поступке одлагања, још је једна велика еколошка брига повезана са конвенционалним аналитичким праксама. На пример, хроматографске технике, посебно HPLC која се широко користи у фармацеутској анализи, обично троше велике количине органских растварача, што доводи до стварања значајних количина отпада (31).

Поред хемијског отпада, потрошња енергије повезана са аналитичком инструментацијом и лабораторијским радом такође доприноси укупном еколошком отisku. Многи аналитички поступци су енергетски интензивни, захтевају грејање, хлађење или континуирани рад

софистициране опреме. Кумулативни утицај ових пракси укључује загађење ваздуха и воде, исцрпљивање природних ресурса и повећање емисије угљен диоксида и угљен монооксида. Како глобална еколошка свест расте и регулаторни притисци се интензивирају, постоји хитна потреба да се аналитичка хемија развија као одрживији и еколошки одговорнији праксама. Овај императив је довео до концепта GAC.

1.5.2 Принципи и стубови зелене аналитичке хемије

GAC је филозофија и скуп принципа усмерених на минимизирање утицаја аналитичких поступака на животну средину, уз одржавање или побољшање њихових перформанси у погледу што боље еколошке прихватљивости. Инспирирана са дванаест принципа зелене хемије, GAC настоји да редизајнира аналитичке методологије како би биле еколошки безбедније и одрживије (32). Основна начела GAC су сажета у скуп од дванаест принципа, који воде развој и имплементацију еколошки прихватљивијих аналитичких метода:

1. Спречавање отпада: Осмислити аналитичку методу с циљем да се спречи стварање отпада, уместо да буде третиран или да се чисти накнадно.
2. Минимизација потрошње реагенса и узорка: Методу треба развијати тако да се користе што мање количине узорка, растварача и реагенса, чиме се смањује укупна количина насталог отпада.
3. Мање опасне хемијске синтезе: Где год је то могуће, аналитички реагенси треба да буду нетоксични и да представљају минималан ризик по људско здравље и животну средину.
4. Осмислити безбедније хемикалије: Аналитички реагенси треба да буду дизајнирани да буду ефикасни, а да притом минимизирају своју токсичност.
5. Безбеднији растварачи и помоћна средства: Избежавати употребу опасних растварача и средстава за раздвајање. Ако су растварачи неопходни, користити безбедније, мање токсичне и обновљиве алтернативе.
6. Осмислити енергетску ефикасност: Минимизирати енергетске потребе аналитичких метода. Спровести анализе на собној температури и притиску кад год је то могуће.
7. Употреба обновљивих сировина: Користити обновљиве сировине уместо исцрпљивих за аналитичке реагенсе.
8. Смањити деривате: Избежавати непотребне кораке дериватизације, који захтевају додатне реагенсе и стварају отпад.
9. Катализа: Користити каталитичке реагенсе, који су високо селективни и ефикасни, како би се минимизирао отпад.
10. Дизајн за разградњу: Дизајнирати аналитичке методе тако да се, на крају своје функције, коришћене хемикалије разграде у безопасне производе и не остају у животној средини.
11. Анализа у реалном времену за спречавање загађења: Развити аналитичке методологије које омогућавају праћење у реалном времену током процеса како би се спречило стварање опасних супстанци.
12. Инхерентно безбеднија хемија за спречавање незгода: Изабрати супстанце и облик супстанце која се користи у аналитичкој методи како би се минимизирао потенцијал за хемијске незгоде, укључујући испуштања, експлозије и пожаре.

Да би се проценила еколошка прихватљивост аналитичке методе, развијено је неколико метрика и алата. То укључује Национални индекс метода заштите животне средине (енг. *National Environmental Methods Index - NEMI*), који користи једноставан систем заснован на пиктограмима за означавање присуства опасних хемикалија; Аналитичку еко-скалу (енг. *Analytical Eco-Scale*), која додељује казнене поене за различите утицаје на животну средину; Индекс зелених аналитичких процедура (енг. *Green Analytical Procedure Index - GAPI*), свеобухватнији алат који процењује цео аналитички процес, од прикупљања узорака до третмана отпада; и Процену зеленог профила (енг. *Assessment of Green Profile - AGP*), која пружа визуелни приказ еколошке прихватљивости методе по више параметара (33–35). Ови алати омогућавају истраживачима да квантитативно и квалитативно упореде еколошке перформансе различитих аналитичких метода и воде развој зеленијих алтернатива.

1.5.3 Интеграција GAC у фармацеутску анализу

Интеграција GAC принципа у фармацеутску анализу није само еколошки императив, већ нуди и значајне практичне и економске користи. Смањењем потрошње опасних растварача и реагенса, GAC методе доприносе нижим оперативним трошковима, смањеним трошковима одлагања отпада и побољшаној безбедности лабораторије. Развој еколошки прихватљивијих метода често укључује употребу мањих запремина узорака, мање енергетски интензивне процедуре и усвајање минијатурисаних или аутоматизованих система, што све повећава ефикасност и смањује укупни аналитички отисак (30).

У контексту фармацеутског развоја и контроле квалитета, усвајање GAC је посебно важно. Фармацеутска индустрија је високо регулисана, а утицај њених процеса на животну средину је под све већим надзором. Прихватањем GAC, фармацеутске компаније могу показати своју посвећеност одрживости, побољшати своју корпоративну друштвену одговорност и потенцијално стећи конкурентску предност. Штавише, еколошки прихватљивије аналитичке методе могу олакшати процесе регулаторног одобравања, јер се усклађују са глобалним напорима за промоцију одрживих производних пракси.

Упркос јасним предностима, имплементација GAC у фармацеутској анализи суочава се са одређеним изазовима. То укључује потребу за развојем и валидацијом нових метода, што може бити дуготрајно и захтевати много ресурса. Такође може постојати перцепција да еколошки прихватљивије методе угрожавају аналитичке перформансе, иако то често није случај са пажљивим одабиром дизајна и оптимизацијом. Међутим, континуирана истраживања и технолошки напредак интензивно се баве овим изазовима, што доводи до развоја иновативних GAC приступа који су и еколошки прихватљиви и аналитички робусни. Синергија између GAC и AQbD, где се систематски развој метода комбинује са еколошким разматрањима, представља моћан приступ стварању одрживих и висококвалитетних аналитичких метода за фармацеутску индустрију (31).

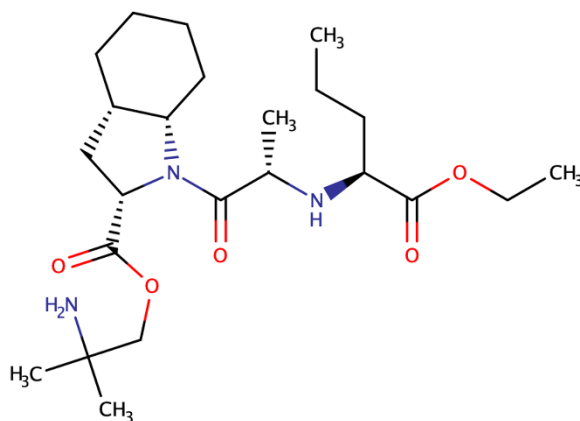
1.6 Физичко-хемијска својства и структуре кључних антихипертензивних лекова

Овај одељак пружа детаљан преглед физичко-хемијских својстава и хемијских структура три АПИ-ја који су кључни за ову тезу: периндоприл терц-бутиламин, амлодипин бесилат и индапамид. Разумевање ових својстава је фундаментално за схватање њихових фармаколошких дејстава, изазова формулације и профила стабилности, посебно у контексту развоја фиксних дозних комбинација и аналитичких метода.

1.6.1 Периндоприл терц-бутиламин (ПЕР)

Периндоприл терц-бутиламин је инхибитор ангиотензин конвертујућег ензима (АЦЕ инхибитор), који се широко користи у лечењу хипертензије, срчане инсуфицијенције и стабилне коронарне артеријске болести. То је пролек (енг. *prodrug*) који се *in vivo* хидролизује у свој активни метаболит периндоприлат, који је одговоран за његову фармаколошку активност (36–38).

- Хемијска структура: Периндоприл терц-бутиламин је хемијски означен као (2S,3aS,7aS)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-1-(етоксикарбонил)бутил]амино]пропаноил]октахидро-1H-индол-2-карбоксилна киселина, терц-бутиламинска со (Слика 1). Његова структура садржи индолски прстенасти систем и естарску групу, што је кључно за његову природу пролека. Облик терц-бутиламинске соли повећава његову стабилност и биорасположивост.



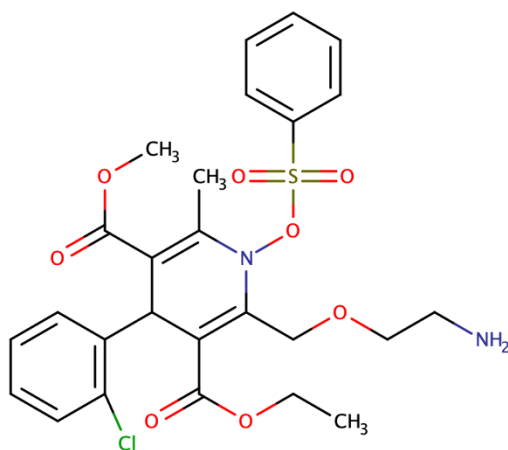
Слика 1. Структурна формула периндоприл терц-бутиламина

- Молекуларна формула: $C_{19}H_{32}N_2O_5 \times C_4H_{11}N$
- Молекулска маса: 368,47 g/mol (периндоприл) + 73,14 g/mol (терц-бутиламин) = 441,6 g/mol (облик соли)
- Физичко-хемијска својства:
 - Периндоприл има неколико јонизабилних група. Карбоксилна киселина има рКа вредност 3,79, док је та вредност за amino групу 8,85. Ове вредности указују на то да периндоприл може постојати у различитим јонизованим облицима у зависности од рН вредности средине у којој се налази, што утиче на његову растворљивост и хроматографско понашање.
 - Log P вредност за периндоприл је 0,63, што указује на његову високу хидрофилност. Ово својство утиче на његову дистрибуцију у биолошким системима и његову интеракцију са хроматографским стационарним фазама.
 - Веома је растворљив у води, што је повољно за његову апсорпцију, али га такође може учинити подложним хидролизи у воденим растворима, посебно при екстремним рН вредностима.
 - Познато је да је периндоприл подложен хидролизи, посебно у присуству влаге и при базном рН. Естарска веза је примарно место разградње. Ова подложност захтева пажљиву формулацију и услове складиштења како би се одржала његова задовољавајућа стабилност у предвиђеном року трајања.

1.6.2 Амлодипин бесилат (АМЛ)

Амлодипин бесилат је дугоделујући блокатор калцијумових канала из класе дихидропиридина, који се широко користи за лечење хипертензије и ангине пекторис. Његов антихипертензивни ефекат се остварује опуштањем васкуларних глатких мишића, што доводи до вазодилатације и смањења периферног васкуларног отпора (36–38).

- Хемијска структура: Амлодипин бесилат је хемијски описан као 3-етил 5-метил (4RS)-2 - [(2-аминоетокси)метил]- 4 - (2-хлорофенил) - 6 - метил - 1,4 - дихидропиридин - 3,5 дикарбоксилат, бензенсулфонат (Слика 2). Његова структура садржи дихидропиридински прстен, који је карактеристичан за ову класу БКК, и естарску групу. Облик соли бесилата побољшава његову растворљивост и стабилност.



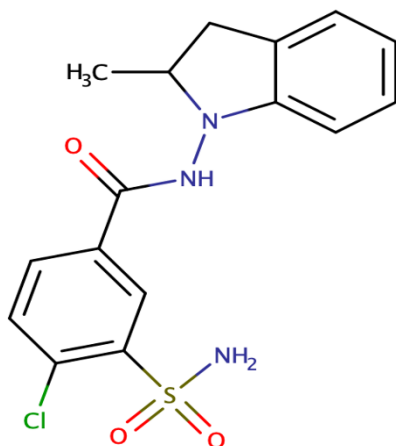
Слика 2. Структурна формула амлодипин бесилата

- Молекуларна формула: $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \times C_6H_6O_3S$
- Молекуларна маса: 408,88 g/mol (амлодипин) + 158,17 g/mol (бензенсулфонска киселина) = 567,06 g/mol (облик соли)
- Физичко-хемијска својства:
 - Амлодипин је слаба база са рКа вредности 8,60. То значи да је претежно јонизован при физиолошком рН, што утиче на његову апсорпцију и дистрибуцију. Његово стање јонизације је такође критично за његово хроматографско понашање и стабилност у раствору.
 - Вредност log P за амлодипин је 0,65, што указује да је релативно хидрофилан, слично периндоприлу. Ово својство је важно за његову интеракцију са биолошким мембранама и његову партиципу у хроматографским системима.
 - Амлодипин бесилат је слабо растворљив у води. Његова растворљивост се може побољшати променом рН вредности средине у којој се налази (нпр. кисели водени раствор пуфера). Повећана растворљивост у киселој средини настаје због протонације базног азота.
 - Познато је да је амлодипин подложен оксидативној разградњи, посебно дихидропиридинског прстена, који може оксидовати у дериват пиридина. Такође може подлећи хидролизи својих естарских група, посебно у базним условима.

1.6.3 Индапамид (ИНД)

Индапамид је диуретик сличан тиазидима, који се првенствено користи у лечењу хипертензије и едема. Делује тако што инхибира реапсорпцију натријума у кортикалном дилуционом сегменту бубрега, што доводи до повећаног излучивања натријума, хлорида и воде (36–38).

- Хемијска структура: Индапамид је хемијски идентификован као 4-хлоро-N-(2-метил-2,3-дихидро-1H-индол-1-ил)-3-сулфамоилбензамид (Слика 3). Његова структура садржи сулфамоил групу и индолски прстен, који доприносе његовој диуретичкој активности.



Слика 3. Структурна формула индапамида

- Молекуларна формула: $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$
- Молекуларна маса: 365,84 g/mol
- Физичко-хемијска својства:
 - Индапамид има рКа вредност 8,85, што указује да је слаба киселина због сулфамоил групе. Његово стање јонизације зависи од рН вредности, што утиче на његову растворљивост и хроматографско задржавање.
 - Вредност $\log P$ за индапамид је 2,60, што га чини најхидрофобнијим (најлипофилнијим) од сва три наведена лека.
 - Ова већа липофилност доприноси његовом дужем трајању деловања и дистрибуцији у ткивима.
 - Индапамид је практично нерастворљив у води, што може представљати изазов за формулацију. Његова растворљивост је благо повећана у органским растварачима.
 - Индапамид је посебно подложен фотодеградацији, што чини заштиту од светлости кључном током његовог руковања и складиштења. Због стабилности његове амидне везе отпорнији је на хидролизу у киселим условима.

Присуство хидролитички лабилне естарске функционалне групе у периндоприлу, дихидропиридинског прстена склоног оксидацији у амлодипину и фотолабилне структуре која садржи сулфонамид у индапамиду указује на фундаментално различите доминантне механизме разградње за свако једињење. Ова структурна разноликост чини комбинацију ПЕР/АМЛ/ИНД одговарајућим модел системом за испитивање механистичке стабилности под условима хидролитичког, оксидативног и фотолитичког стреса, посебно у оквиру развоја комбинација фиксних доза.

1.6.4 Резиме физичко-хемијских својстава

Разумевање различитих физичко-хемијских својстава ПЕР, АМЛ и ИНД је од највеће важности за рационално дизајнирање њихове комбинације фиксних доза. Њихове различите рКа вредности диктирају њихова стања јонизације на различитим рН вредностима, што директно утиче на њихову растворљивост, стабилност и хроматографско понашање. Разлике у $\log P$ вредностима утичу на њихову расподелу између мобилне и стационарне фазе у HPLC систему, што захтева пажљиву оптимизацију хроматографских услова за њихово истовремено раздвајање. Штавише, њихова јединствена подложност разградњи (хидролиза за ПЕР и АМЛ, оксидација за АМЛ и фотолиза за ИНД) истиче сложене изазове стабилности који се морају јасно дефинисати и решити током развоја формулације, како би се осигурао дугорочни квалитет и ефикасност КФД производа. Међусобно дејство ових својстава чини основу за аналитичка истраживања стабилности представљена у овој тези.

1.7 Систематски развој аналитичких метода за комбинације фиксне дозе: приступ квалитета по дизајну

Ова дисертација се заснива на хипотези да физичко-хемијске интеракције између АПИ унутар комбинације фиксних доза могу модификовати појединачне путеве разградње и кинетичко понашање, што доводи до специфичног профила стабилности који се разликују од оних код једнокомпонентних формулација. У оквиру ове докторске дисертације испитивана је фиксна комбинација доза три широко коришћена антихипертензивна лека: периндоприл терц-бутиламин (ПЕР), амлодипин бесилат (АМЛ) и индапамид (ИНД). Ови лекови припадају различитим фармаколошким класама и остварују своје антихипертензивне ефекте путем различитих механизма, што њихову комбинацију чини посебно ефикасном у постизању свеобухватне контроле крвног притиска (39).

Периндоприл терц-бутиламин је АЦЕ инхибитор. АЦЕ инхибитори блокирају конверзију ангиотензина I у ангиотензин II, који је снажан вазоконстриктор, што доводи до вазодилатације и смањења крвног притиска. Они такође смањују лучење алдостерона, што смањује задржавање натријума и воде у организму пацијента. ПЕР се често прописује за хипертензију, срчану инсуфицијенцију и за смањење ризика од кардиоваскуларних догађаја код пацијената са стабилном коронарном артеријском болешћу (40).

Амлодипин бесилат је дихидропиридински блокатор калцијумових канала. БКК инхибирају прилив калцијумових јона у ћелије глатких мишића крвних судова и миокарда, што доводи до вазодилатације и смањења периферног васкуларног отпора. АМЛ се широко користи за лечење хипертензије и ангине пекторис због дугог дејства и повољног профила подношљивости (40).

Индапамид је диуретик сличан тиазидима. Диуретици повећавају излучивање натријума и воде из организма, што доводи до смањења волумена крви и, последично, до снижавања крвног притиска. Индапамид је посебно ефикасан у лечењу хипертензије и показало се да има додатна вазодилататорна својства независно од свог диуретичког дејства (40).

Иако комбинација ова три лека нуди значајне терапеутске предности, њихова различита физичко-хемијска својства представљају значајне изазове за стабилну фармацеутску формулацију и квалитативну и квантитативну анализу. ПЕР је високо растворљив у води, осетљив на топлоту, док је АМЛ једињење базног карактера са умереном растворљивошћу, а ИНД је слабо кисело једињење са ниском растворљивошћу. Ове разлике захтевају пажљиво разматрање током формулације како би се осигурала стабилност, биорасположивост и

конзистентно ослобађање лека из таблете као фиксне комбинације ова три лека. Штавише, развој јединствене аналитичке методе која може истовремено идентификовати и одредити све три једињења, често присутна у веома различитим концентрацијама, је значајна аналитичка препрека у сложеној матрици.

1.7.1 Образложење за развој нове HPLC методе за троструку комбинацију

У литератури је описано неколико метода за истовремено одређивање периндоприла, амлодипина и индапамида, али њиховим критичким разматрањем може се уочити да ниједна од њих у потпуности не обједињује систематски развој методе, процену робусности у фази оптимизације, зелену аналитичку процену и могућност примене у испитивањима стабилности комбинације фиксних доза. El-Bagary и сарадници (41) су развили валидирану HPLC методу за одређивање периндоприл-аргинина, амлодипина и индапамида у сировинама и фармацеутским облицима, користећи C18 колону, мобилну фазу фосфатни пуфер pH 2,6–метанол (50:50, v/v), температуру колоне од 50 °C и UV детекцију на 215 nm. Иако је метода једноставна, прецизна и погодна за контролу квалитета, њен развој је заснован на класичној оптимизацији хроматографских услова, без примене AQbD приступа, дефинисања дизајн-простора и систематске процене утицаја критичних параметара методе. Такође, еколошки профил методе није процењен применом савремених алата зелене аналитичке хемије (41).

Patel и сарадници (42) су предложили високо ефикасну танкослојну хроматографску методу (енг. *High-Performance Thin-Layer Chromatography* - HPTLC) за истовремено одређивање периндоприл-ербумина, индапамида и амлодипин-бесилата у Triplixam таблетама. Ова метода има предност у погледу могућности анализе већег броја узорака истовремено и мање потрошње мобилне фазе у односу на класичне HPLC поступке. Међутим, као мобилна фаза коришћена је смеша дихлорметана, метанола, толуена и глацијалне сирћетне киселине, што представља значајно ограничење са аспекта зелене аналитичке хемије због употребе токсичних и еколошки неповољних органских растварача. Поред тога, HPTLC приступ, иако користан за рутинску анализу, има ограничења у погледу хроматографске резолуције, репродуктивности и директне упоредивости са HPLC методама које се чешће користе у фармацеутској контроли квалитета (42).

У другом раду, Patel и сарадници (43) су развили RP-HPLC методу за истовремено одређивање периндоприл-ербумина, индапамида и амлодипин-бесилата у сировинама и таблетама, користећи C18 колону и мобилну фазу ацетонитрил:метанол:вода (30:20:50, v/v/v, pH=3,0). Метода је валидирана у складу са ICH Q2(R1) смерницама и показала је задовољавајућу тачност, прецизност и робусност. Ипак, робусност је у овом раду испитивана као део завршне валидације, а не као резултат претходно дефинисаног експерименталног дизајна. Због тога није омогућена потпуна процена појединачног и интеракционог утицаја критичних параметара, као што су састав мобилне фазе, pH, проток и температура колоне. Такође, метода није праћена систематском проценом зеленог профила, нити је развој методе постављен у оквир аналитичког квалитета по дизајну (43).

Saleh и сарадници (44) су направили значајан искорак у односу на претходне методе јер су развили брзу RP-HPLC методу за одређивање индапамида, периндоприла и амлодипина и истовремено проценили њен зелени профил применом више алата, укључујући NEMI, Eco-Scale, AGP и GAPI. Овај рад је посебно значајан јер показује да се ефикасност хроматографског раздвајања може разматрати заједно са потрошњом растварача, количином отпада и еколошким оптерећењем методе. Међутим, и у овом случају зелена процена је примарно коришћена за вредновање развијене методе, док систематски AQbD приступ, са

дефинисањем критичних метода параметара, критичних аналитичких одговора и дизајн-простора, није био централни дио развоја методе (44).

На основу наведеног, развој нове RP-HPLC методе за истовремено одређивање ПЕР, АМЛ и ИНД у комбинацији фиксних доза је оправдан јер омогућава превазилажење уочених ограничења постојећих приступа. За разлику од раније описаних метода, у овој дисертацији развој методе није заснован само на класичној промени једног параметра у једном тренутку, већ на систематској примени AQbD принципа, што омогућава боље разумевање утицаја критичних хроматографских фактора на квалитет раздвајања. Истовремено, укључивање принципа зелене аналитичке хемије омогућава процену и смањење еколошког утицаја методе, док испитивање стабилности и кинетике разградње појединачних супстанци и њихових комбинација проширује примену методе са рутинске контроле квалитета на методу погодну за испитивање стабилности КФД.

1.8 Испитивање стабилности и кинетике разградње антихипертензивних лекова у фиксним комбинацијама лекова

1.8.1 Значај студија стабилности у фармацеутском развоју

Испитивање стабилности је основ фармацеутског развоја, пружајући кључне информације о томе како се квалитет лека или производа мења током времена под утицајем различитих фактора околине као што су температура, влажност и светлост (45). Ове студије нису само регулаторна формалност, већ су фундаменталне за обезбеђивање безбедности, ефикасности и квалитета фармацеутских производа током њиховог предвиђеног рока трајања. Регулаторна тела широм света, укључујући Међународну конференцију о хармонизацији (ICH), успоставила су свеобухватне смернице (нпр. ICH Q1A(R2)) за тестирање стабилности нових лековитих супстанци и производа) које налажу спровођење ригорозних аналитичких процедура за испитивање стабилности (46).

Док регулаторне студије стабилности првенствено имају за циљ да дефинишу рок трајања и услове складиштења, детаљна кинетичка истраживања и одређивање параметара активације пружају детаљнији увид у путеве разградње и њихове зависности од промене температуре. Такво механистичко разумевање нуди јачу научну основу за предвиђање дугорочне стабилности и оптимизацију формулације.

Испитивање стабилности представља један од кључних сегмената развоја и контроле квалитета фармацеутских производа, јер омогућава процену промена које могу настати током времена под утицајем различитих услова чувања. На основу резултата ових испитивања дефинишу се одговарајућа формулација, избор амбалаже, услови складиштења и рок трајања лека, како би производ током целог периода употребе остао у складу са прописаним захтевима у погледу идентитета, јачине, квалитета и чистоће. Посебан значај стабилности огледа се у очувању терапијске ефикасности и безбедности лека, јер разградња активних фармацеутских састојака може довести до смањења садржаја активне компоненте, али и до настанка потенцијално штетних производа разградње. Поред тога, подаци о стабилности имају важну улогу у развоју формулације, избору помоћних супстанци и материјала за паковање, као и у испуњавању регулаторних захтева неопходних за стављање и одржавање фармацеутског производа у промету.

У контексту комбинација фиксних доза, испитивање стабилности постаје још критичније и сложеније. Присуство више активних фармацеутских састојака унутар једног дозног облика уводи потенцијал за интеракције између лекова, што може убрзати разградњу или довести до

нових путева разградње који се не примећују када су лекови присутни појединачно. Стога је разумевање понашања разградње и/или интеракције сваког састојка (АПИ и помоћних супстанци), како самостално тако и у комбинацији у ГП, од највеће важности за успешан развој и комерцијализацију КФД.

1.8.2 Пuteви разградње и кинетика активних фармацеутских састојака

Деградација лека је хемијски процес који мења хемијску структуру АПИ, што доводи до губитка потенције и стварања нечистоћа. Разумевање специфичних путева деградације и кинетике која управља овим процесима је неопходно за предвиђање стабилности лека и дизајнирање одговарајућих стратегија стабилизације. Уобичајени механизми деградације могу бити:

- Хидролиза: Ово је један од најчешћих путева деградације АПИ, који укључује реакцију лека са водом. Функционалне групе подложне хидролизи укључују естре, амиде, лактаме и нитриле. Фактори који утичу на хидролизу укључују утицај рН вредности средине у којој се АПИ налази, температуру и присуство катализатора.
- Оксидација: Оксидација укључује губитак електрона из молекула, често кроз реакцију са кисеоником или другим оксидационим средствима. Функционалне групе склоне оксидацији укључују феноле, аминe, тиоле и незасићене везе. Фактори попут лаких и тешких металних јона и концентрације кисеоника могу убрзати оксидацију.
- Фотолиза: Ово се односи на разградњу изазвану светлошћу, посебно ултраљубичастом (UV) или видљивом светлошћу. Многи молекули лекова садрже хромофоре који апсорбују светлосну енергију, што доводи до побуђених стања и накнадних хемијских реакција. Фотолиза може резултовати различитим производима разградње, укључујући изомере, полимере или производе разлагања.
- Изомеризација: Ово је конверзија лека у изомерни облик, који може имати различиту фармаколошку активност или стабилност. Примери укључују рацемизацију (конверзију енантиомера у рацемску смешу) или геометријску изомеризацију (цис-транс интерконверзија).
- Полимеризација: Ово укључује формирање већих молекула из мањих молекула лекова стварањем полимерних једињења, што често доводи до губитка растворљивости или биорасположивости.

Кинетика разградње односи се на проучавање брзине којом се лек разграђује. Праћењем концентрације лека током времена под различитим експерименталним условима, кинетички модели се могу применити за одређивање реда реакције (нултог реда, првог реда или другог реда) и константе брзине реакције. Ове информације су кључне за предвиђање рока трајања и разумевање основних механизма разградње лека (47).

- Кинетика нултог реда: Брзина разградње је независна од концентрације лека. Ово се обично дешава када је лек у засићеном раствору или када је укључен корак који ограничава брзину (нпр. растварање).
- Кинетика првог реда: Брзина разградње је директно пропорционална концентрацији лека. Ово је најчешћи кинетички ред који се примећује за разградњу лека у раствору.
- Кинетика другог реда: Брзина разградње зависи од концентрације два реактаната или квадрата концентрације једног реактанта. Иако су многи процеси разградње лекова инхерентно другог реда, они се често јављају као псеудо-првог реда, ако је један реактант у великом вишку (нпр. вода у воденом раствору пуфера).

Анализе убрзане предиктивне стабилности се све више користе за брзу процену стабилности кандидата за лекове и формулација. За разлику од традиционалних студија убрзане стабилности, које се ослањају на повишене температуре за предвиђање рока трајања, предиктивне студије користе агресивније услове стреса (нпр. екстремна рН вредност, висока влажност, интензивна светлост) и софистицирано кинетичко моделирање за предвиђање дугорочне стабилности на основу добијених података. Овај приступ значајно смањује време и ресурсе потребне за процену стабилности, омогућавајући брже доношење одлука током раног развоја лекова (47).

1.8.3 Понашање разградње периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида (појединачно и комбиновано)

У овој докторској дисертацији биће представљено свеобухватно истраживање кинетике разградње периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида, како појединачно, тако и у њиховој комбинацији фиксних доза.

Ово истраживање је кључно за разумевање својствених изазова стабилности повезаних са овим широко коришћеним антихипертензивним лековима и њиховим комбинацијама.

Биће систематски изложен сваки лек, појединачно и у различитим комбинацијама, различитим факторима стреса, укључујући киселе, базне и неутралне рН услове, повишене температуре, утицај светлости и оксидативног окружења. Процеси разградње су праћени коришћењем претходно развијене RP-HPLC методе, што омогућава одређивање интактних лекова и идентификацију њихових производа разградње. Кључни налази ове студије указују на различита понашања разградње за сваки лек и на постојање значајних интеракција између њихових комбинација.

Ови налази наглашавају сложену природу стабилности у вишекомпонентним фиксним комбинацијама лекова. Разградња једног АПИ може бити значајно под утицајем присуства другог, било путем директних хемијских реакција, каталитичких ефеката или променом микроокружења (нпр. промене рН вредности унутар дозног облика). Ова детаљна кинетичка анализа пружа непроцењиве увиде у специфичне рањивости сваког лека и КФД-а у целини.

2. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Циљ ове докторске дисертације је развој интегрисаног, научно заснованог оквира за испитивање хроматографског понашања и стабилности периндоприл терц-бутиламина, амлодипин-бесилата и индапамида појединачно и у смешама. Студија је осмишљена да обухвати развој и оптимизацију RP-HPLC методе засноване на испитивању утицаја састава и рН вредности мобилне фазе, температуре колоне и брзине протока на ретенционе параметре, селективност, резолуцију и ефикасност хроматографског система. Посебан део истраживања је усмерен на квантитативно описивање процеса деградације применом формалне хемијске кинетике, одређивање реда реакције и константи брзине, као и анализу температурне зависности брзине деградације применом Аренијусове и Ејрингове једначине, одређивањем енергије активације и привидне термодинамичке функције активiranог комплекса — енталпије, ентропије и Гибсове енергије активације — чиме је омогућено физичкохемијско тумачење механизма и енергетских захтева процеса деградације. Принципи квалитета по дизајну (QbD) и зелене аналитичке хемије (GAC) примењени су као оквир за систематичну оптимизацију хроматографске методе и процену њене еколошке прихватљивости.

Да би се постигао овај циљ, специфични задаци рада били су:

1. Развој и оптимизација нове и поуздане RP-HPLC методе за истовремено одређивање периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида у њиховој комбинацији фиксних доза коришћењем приступа аналитичког квалитета по дизајну.
2. Валидација развијене аналитичке методе у складу са релевантним међународним смерницама у погледу селективности, линеарности, тачности, прецизности, осетљивости и робусности.
3. Процена еколошког профила развијене аналитичке процедуре користећи утврђене алате за процену зелене аналитичке хемије и да се докаже њена боља еколошка прихватљивост у односу на већ постојеће методе.
4. Испитивање понашања разградње периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида под киселим, базним, неутралним, оксидативним и фотолитичким условима стреса, како појединачно, тако и у бинарним и тернарним смешама.
5. Одређивање кинетичких параметара разградње, укључујући редослед реакције, константе брзине разградње, време полураспада и вредности рока трајања, под испитиваним условима стреса.
6. Процена температурне зависности процеса разградње кроз убрзане студије стабилности и да се израчунају активациони и термодинамички параметри коришћењем Аренијусовог и Ејринговог моделовања.
7. Разјашњење утицаја интеракција лекова на стабилност испитиваних активних фармацеутских састојака унутар бинарних и тернарних смеша.
8. Пружање механистичког и практичног увида релевантног за дизајн формулације, складиштење и контролу квалитета фиксних комбинација доза које садрже ове антихипертензивне агенсе.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

3.1 Преглед експерименталног дизајна и приступа

Ово поглавље описује свеобухватни експериментални дизајн и методологије које се користе у овом истраживању. Главни циљ овог рада је развој и валидација интегрисаног оквира квалитета по дизајну за робустан и одржив развој антихипертензивних лекова са комбинацијом фиксних доза, посебно се фокусирајући на периндоприл терц-бутиламин, амлодипин бесилат и индапамид. Да би се то постигло, истраживање интегрише принципе аналитичког квалитета по дизајну за развој метода и зелене аналитичке хемије за еколошку одрживост, уз детаљна истраживања кинетике разградње и стабилности активних фармацеутских састојака како појединачно тако и у комбинацији. Ова интеграција омогућава да се развој аналитичких метода, валидација метода и процена стабилности сматрају јединственим међусобно повезаним системом у оквиру Квалитета по дизајну. Експериментални приступ је систематски, заснован на подацима, и осмишљен је да пружи холистичко разумевање КФД производа од аналитичке контроле до дугорочне стабилности. Посебан нагласак је стављен на коришћење кинетичких параметара за предвиђање дугорочне стабилности на основу краткорочних убрзаних студија. Експериментални дизајн је структуриран тако да осигура репродуктивност, поузданост и генерисање висококвалитетних података неопходних за робусне научне закључке.

Централно начело овог истраживања је систематска примена принципа квалитета по дизајну током целог експерименталног процеса. QbD је проактиван, на ризику заснован приступ фармацеутском развоју који наглашава разумевање и контролу варијабли производа и процеса како би се осигурао конзистентан квалитет (14). У контексту развоја аналитичке методе, ово се преводи на аналитички квалитет по дизајну, где се идентификују критични параметри методе и критични аналитички атрибути, и успоставља се простор дизајна како би се осигурала робусност и поузданост методе (27). Експериментални дизајн, посебно за оптимизацију хроматографске методе, експлицитно укључује методологије дизајна експеримената како би се ефикасно истраживао простор параметара и разумеле интеракције између варијабли.

Надаље, ово истраживање је вођено принципима GAC, са циљем да се минимизира утицај аналитичких поступака на животну средину. Зелена аналитичка хемија наглашава спречавање отпада, смањење употребе опасних хемикалија, енергетску ефикасност и развој безбеднијих аналитичких метода (30). Избор реагенса, растварача и аналитичких техника, као и процена утицаја развијених метода на животну средину, спроводи се имајући у виду принципе GAC. Интеграција QbD и GAC осигурава да коришћене методологије нису само научно ригорозне и способне да произведу висококвалитетне податке, већ и еколошки одговорне и одрживе, у складу са савременим стандардима развоја фармацеутских производа. Овај двоструки фокус наглашава посвећеност и научној изврсној и заштити животне средине у настојању да се побољша развој КФД.

3.2 Хемикалије и реагенси

Све хемикалије и реагенси коришћени у овом истраживању били су аналитичког или HPLC квалитета. Конкретни детаљи о њиховој чистоћи и добављачима наведени су у наставку.

3.2.1 Активне фармацеутске супстанце (АПИ)

Радни стандарди три активне фармацеутске супстанце који су предмет истраживања набављени су:

- Периндоприл терц-бутиламин: за развој методе; чистота 99,3%, радни стандард доноран од стране Босналијек д.о.о., Сарајево, Босна и Херцеговина. За студије кинетике разградње, фармакопејски стандарди (*Ph. Eur.*) су купљени од - *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД.
- Амлодипин бесилат: за развој методе; чистота 99,7%, радни стандард дониран од стране Босналијек д.о.о., Сарајево, Босна и Херцеговина. За студије кинетике разградње, фармакопејски стандарди (*Ph. Eur.*) су купљени од *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД.
- Индапамид: за развој методе; чистота 100,0%, радни стандард дониран од стране Босналијек д.о.о., Сарајево, Босна и Херцеговина. За студије кинетике разградње, фармакопејски стандарди (*Ph. Eur.*) су купљени од *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД.

Ови стандарди високе чистоте били су неопходни за прецизну припрему основних и радних раствора, калибрационих кривих и за обезбеђивање поузданости аналитичких мерења, чија припрема ће бити описана у наставку.

3.2.2 Растварачи и компоненте мобилне фазе

Хроматографска мобилна фаза и различити раствори су припремљени коришћењем висококвалитетних растварача и пуферских компоненти:

- Ацетонитрил: HPLC квалитета. Набављено од Fisher Scientific, Енглеска, Лестершир, Велика Британија. Користи се као примарни органски растварач у мобилној фази и за припрему основних раствора.
- Вода: HPLC квалитета. Добијена коришћењем Thermo Scientific™ Barnstead™ LabTower™ EDI система за пречишћавање воде. Овај систем обезбеђује константно снабдевање високопречишћеном водом, што је кључно за хроматографске примене и студије стабилности.
- Калијум-дихидрогенфосфат (KH_2PO_4): Аналитичког квалитета. Набављено од *Lachner*, Чешка Република. Користи се за припрему фосфатног пуфера.
- Калијум-хидрогенфосфат (K_2HPO_4): Аналитичког квалитета. Набављено од *Lachner*, Чешка Република. Користи се за припрему фосфатног пуфера.
- о-Фосфорна киселина (85% w/w): Аналитичког квалитета. Набављено од *Lachner*, Чешка Република. Користи се за подешавање рН вредности фосфатног пуфера.

3.2.3 Стрес реагенси за студије деградације

За свеобухватне студије кинетике разградње, коришћени су специфични реагенси за стрес како би се симулирали различити путеви разградње:

- Хлороводонична киселина (HCl): 37% (w/w). Аналитичког квалитета. Набављено од *Lachner*, Чешка Република. Користи се за студије киселе хидролизе.

- Натријум хидроксид (NaOH): Аналитичког квалитета. Набављено од *Lachner*, Чешка Република. Користи се за студије базне хидролизе.
- Водоник-пероксид (H₂O₂): 30% (w/w). Аналитичког квалитета. Набављено од *Sigma-Aldrich*, САД. Користи се за студије оксидативне разградње.

3.2.4 Помоћне супстанце и плацебо смеша

За процену селективности и тачности током валидације методе, коришћена је плацебо смеша. Ову смешу је донирао Хемофарм д.о.о., Бања Лука, Република Српска, и садржала је уобичајене фармацеутске помоћне материје:

- Микрокристална целулоза
- Прежелатинизовани скроб
- Натријум-скроб гликолат
- Калцијум-хлорид хексахидрат
- Натријум-хидрогенкарбонат
- Силицијум-диоксид, колоидни, безводни
- Магнезијум-стеарат

Ова плацебо смеша била је кључна за процену способности методе да селективно квантификује активне фармацеутске супстанце у присуству типичних помоћних материја таблета, осигуравајући да нема интерференције од компоненти формулације.

3.3 Апарати и опрема

3.3.1 Систем високоефикасне течне хроматографије

Сви хроматографски експерименти и прикупљање података изведени су коришћењем *Agilent* система серије 1200. Овај интегрисани систем састоји се од следећих компоненти:

- Кватернарна HPLC пумпа (G1311A) за проток мобилне фазе прецизном и константном брзином протока и омогућава мешање до четири различита растварача, што је неопходно за развој и оптимизацију метода.
- Аутоматизовани течни узоркивач (ALS G1329A) који обезбеђује високу прецизност и тачност у убризгавању запремина узорка, минимизирајући људске грешке и повећавајући проток анализа.
- УВ/ВИС диодни детектор (DAD G1315D) за детекцију анализата на основу њихових УВ/ВИС апсорпционих својстава. DAD омогућава истовремену детекцију у широком опсегу таласних дужина, пружајући спектралне информације које помажу у идентификацији врхова и процени чистоте. Детекција за развијену методу је извршена на таласној дужини од 210 nm.
- Термостат (TCC G1316A) за постизање и одржавање температуре узорка и колоне.
- *Agilent ChemStation* софтвер је коришћен за контролу инструмената, прикупљање података, обраду хроматографских података и квантитативну анализу. Он пружа свеобухватне алате за развој метода, валидацију и извештавање.

Стационарна фаза за HPLC анализу била је ZORBAX Eclipse XDB-C18 колона (*Agilent Technologies*, САД). Ова колона се широко користи у фармацеутској анализи због свог одличног облика пика, репродуктивности и стабилности у широком pH опсегу. Специфичне

димензије коришћене колоне биле су 150 mm дужине, 4,6 mm унутрашњег пречника, напуњена честицама величине 5 μm . Избор ове колоне био је кључан за постизање оптималног раздвајања три антихипертензивна лека и њихових потенцијалних производа разградње.

Поред основног HPLC система, неколико других делова опреме било је неопходно за припрему узорак, руковање растворима и спровођење студија деградације под стресом:

- pH метар *ProfiLine pH 3110*, *Xylem*, Вашингтон, САД и *Ciberscan pH 11*, *Eutech*, *Thermo Fisher Scientific*, Волтам, Масачусетс, САД; Користи се за прецизно подешавање и мерење pH вредности за пуферске растворе и стрес медијуме.
- Ултразвучно купатило *Bandelin Sonorex Digitec*, *Bandelin electronic*, Берлин, Немачка; Користи се за дегазацију мобилне фазе и за растварање узорак, обезбеђујући хомогеност и спречавајући стварање мехурића ваздуха који би могли да ометају хроматографску анализу.
- Систем филтрације - *Whatman 47 mm glass/mesh* мембрански носач, *Whatman*, Мејдстон, Велика Британија; За филтрирање мобилне фазе и раствора узорак пре убризгавања у HPLC систем коришћен је *Chromafil* најлонски PTFE филтер са величином пора од 0,45 μm (*Merck*, Дармштад, Немачка).
- Коморе/пећи за грејање *Memmert UN30*, *Memmert GmbH + Co.KG*, Швабах, Немачка; Користе се за спровођење студија термичке разградње на контролисаним повишеним температурама (нпр. 45 °C и 65 °C) ради убрзавања процеса разградње и добијања кинетичких података.
- Комора за фотостабилност за студије фотолитичке разградње - *Memmert ICH 110L* (*Memmert GmbH + Co.KG*, Швабах, Немачка). Ова комора је опремљена флуоресцентним лампама које пружају хладну белу светлост (која одговара дневној светлости) и УВ зрачење у спектралном опсегу од 320–400 nm, што омогућава контролисано излагање светлости према ICH смерницама.
- Електронска аналитичка вага *Mettler Toledo*, Колумбус, Охајо, САД.

3.4 Припрема раствора

Поступци за припрему основних и радних стандардних раствора, као и раствора за валидацију метода и студије кинетике разградње, дати су у наставку.

3.4.1 Основни раствори стандарда

Појединачни основни раствори стандарда периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида припремљени су у концентрацији од 1 mg mL⁻¹. Сваки основни раствор је припремљен у посебном одмерном суду и добро помешан како би се осигурало потпуно растварање пре даљег разблаживања. За развој методе и валидацију, коришћени растварач је била смеша ацетонитрил/вода HPLC квалитета (40:60, v/v). За кинетичке студије разградње, основни раствори су припремљени у смеси ацетонитрил/HPLC воде (50:50, v/v). Прецизно мерење је извршено коришћењем аналитичке ваге са читавањем од 0,01 mg.

3.4.2 Радни раствори стандарда за развој методе и валидацију

Радни раствори стандарда за развој и валидацију HPLC методе припремљени су разблаживањем основних раствора до различитих концентрација коришћењем растварача ацетонитрил/воде HPLC квалитета (40:60, v/v). Ови раствори су коришћени за:

- Процену линеарности: Пет различитих концентрација је припремљено за сваки лек: ПЕР ($10\text{--}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$), АМЛ ($20\text{--}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$) и ИНД ($5\text{--}100\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Ови раствори су коришћени за конструисање калибрационих кривих и процену линеарности аналитичке методе у наведеним опсезима концентрација.
- Процена тачности: Припремљене су три серије од три различите концентрације за сваки лек: ПЕР ($128, 160$ и $192\ \mu\text{g mL}^{-1}$), АМЛ ($111,2, 139$ и $166,8\ \mu\text{g mL}^{-1}$) и ИНД ($40, 50$ и $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$). Ови раствори су коришћени за одређивање тачности методе кроз аналитички принос.
- Процена осетљивости – границе детекције (LOD) и границе квантификације (LOQ): Радни раствори су припремљени за сваки лек посебно при нижим концентрацијама ($1,0$; $0,5$; $0,25$; $0,10$; $0,05$ и $0,025\ \mu\text{g mL}^{-1}$) у растварачу да би се одредиле границе детекције и квантификације методе.

Сви радни раствори су чувани у мраку на $4\ ^\circ\text{C}$ како би се спречила деградација и одржала њихова стабилност пре анализе, а пре инјектовања су остављени да се изједначе са собном температуром.

3.4.3 Припрема узорка за анализу таблета

За валидацију развијене HPLC методе на стварним узорцима, коришћене су комерцијално доступне таблете са фиксном комбинацијом доза, Amlewe1[®] (Крка, Словенија).

Ове таблете су садржале $8,0\ \text{mg}$ периндоприл терц-бутиламина (што одговара $6,68\ \text{mg}$ периндоприла), $5\ \text{mg}$ амлодипина (у облику амлодипин бесилата $6,95\ \text{mg}$) и $2,5\ \text{mg}$ индапамида по таблети. Пре припреме узорка, таблете су фино уситњене и прецизно је измерен део који одговара циљним концентрацијама анализата, који је потом растворен и разблажен. Припремљено је шест узорка, где је сваки садржао $160\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ПЕР, $139\ \mu\text{g mL}^{-1}$ АМЛ и $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ИНД, прецизним мерењем масе таблета и растварањем садржаја таблете у одговарајућем растварачу, након чега су следила одговарајућа разблажења да би се постигле жељене концентрације за анализу.

3.4.4 Припрема узорка за студије кинетике разградње

За студије кинетике разградње, радни раствори сва три лека су припремљени појединачно и у бинарним или тернарним смешама са коначном концентрацијом од $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ за сваки лек. Ови раствори су припремљени разблаживањем $1\ \text{mL}$ одговарајућег основног раствора са одабраним реагенсом за стрес. Коначна запремина сваког узорка разградње је подешена на дефинисану запремину у нормалном суду како би се осигурала тачна концентрација анализата у свим експериментима. Коришћени реагенси за стрес су били:

- Раствор натријум-хидроксида (NaOH) за студије базне хидролизе, концентрације $0,001\text{M}$, $0,01\text{M}$, и $0,1\text{M}$.

- Раствор хлороводоничне киселине (HCl) за студије киселе хидролизе, концентрација од 0,01M, 0,1M и 1M.
- Високопречишћена вода (HPLC квалитет) за студије неутралне хидролизе (pH 6,98).
- Раствори водоник-пероксида (H₂O₂) за студије оксидативне разградње, концентрације од 3%, 15% и 30%.

За студије фотолитичке разградње, припремљени су радни раствори од 100 µg mL⁻¹ сваког лека користећи мобилну фазу као растварач. Сви узорци за студије разградње чувани су на собној температури и у мраку, осим за фотолитичко тестирање разградње, и узорковани су у одабраним временским интервалима ради праћења преостале концентрације лека. При сваком узорковању, аликвоти су узети и анализирани под идентичним хроматографским условима. Раствори слепих проба који садрже само мобилну фазу и стрес агенс (реагенси за убрзану студију стабилности) су такође припремљени и узорковани у истим временским тачкама како би се одузеле све потенцијалне позадинске сметње.

3.5 Хроматографски услови и развој методе

Хроматографска метода за истовремено одређивање периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида је развијена и оптимизована пратећи принципе аналитичког квалитета по дизајну.

Мобилна фаза се састојала од смеше ацетонитрила и фосфатног пуфера. Процес оптимизације је укључивао варирање садржаја ацетонитрила, pH вредности воденог раствора пуфера и концентрације пуфера, пратећи експериментални план генерисан кроз дизајн експеримената.

- Оптимални састав мобилне фазе је одређен да буде однос (66:34, v/v) фосфатног пуфера и ацетонитрила.
- Фосфатни пуфер је припремљен у концентрацији од 30 mM. Ово је постигнуто растварањем 0,305 g KН₂PO₄ и 3,844 g K₂HPO₄ у 1000 mL HPLC воде. pH вредност пуфера је подешена на 2,7 коришћењем 1% раствора фосфорне киселине.
- Мобилна фаза је пажљиво припремљена филтрирањем кроз Chromafil најлонски PTFE филтер са величином пора од 0,45 µm, а потом дегазирана у ултразвучној кади пре сваког хроматографског пуштања. Овај корак је кључан за уклањање растворених гасова који би могли да ометају хроматографско раздвајање и перформансе детектора.

Брзина протока мобилне фазе одржавана је на константних 1 mL min⁻¹ током експеримената. Ова брзина протока је оптимизована како би се осигурало ефикасно раздвајање и разумно време анализе. Запремина убризгавања за све узорке подешена је на 10 µL, што је утврђено да обезбеђује адекватну осетљивост и резолуцију пикова.

Температура колоне је одржавана на константних 50 °C. Контролисање температуре колоне је неопходно за одржавање хроматографске репродуктивности, јер температура може значајно утицати на време задржавања, облике пикова и ефикасност раздвајања.

УВ детекција је извршена на таласној дужини од 210 nm. Ова таласна дужина је изабрана на основу карактеристика УВ апсорпције три анализата, обезбеђујући оптималну осетљивост за њихову истовремену детекцију.

Аналитички циљни профил је успостављен на почетку развоја методе, дефинишући жељене карактеристике перформанси HPLC методе: валидирана, робусна и селективна метода способна за раздвајање три антихипертензивна лека. Кроз процену ризика квалитета и прелиминарне студије, критични параметри методе су идентификовани као фактори који могу значајно утицати на АТР. То је укључивало однос органског растварача и водене фазе,

концентрацију пуфера и рН вредност воденог дела мобилне фазе. Остали параметри као што су температура колоне, брзина протока, таласна дужина детекције и запремина убризгавања оптимизовани су током прелиминарне фазе и одржавани су константним током главне оптимизације.

3.5.1 Дизајн експеримената за оптимизацију метода

Оптимизација метода је систематски спроведена коришћењем Централног композитног дизајна (енг. *Central Composite Design - CCD*) генерисаног помоћу софтвера *Design Expert 11.0.0* (Stat Ease Inc., Минеаполис, Минесота, САД). CCD је обухватао скуп од 17 експеримената са три понављања централних тачака, што је омогућило испитивање утицаја идентификованих критичних параметара методе на критичне аналитичке атрибуте (енг. *Critical Analytical Attributes - CAA*). Праћени САА како би се осигурало постизање АТР-а укључивали су:

- Резолуцију између ПЕР и АМЛ ($R_{SPER,AML}$)
- Резолуцију између АМЛ и ИНД ($R_{SAML,IND}$)
- Време задржавања ИНД ($t_{R\ IND}$)
- Ширину пика ПЕР (W_{PER})
- Фактор задржавања ПЕР (k_{PER})

Односи између СМР и САА моделирани су коришћењем полиномске једначине другог реда, а модели су валидирани путем ANOVA тестирања, прилагођених R^2 и предвиђених вредности R^2 , осигуравајући њихову статистичку адекватност за предвиђање утицаја КПМ на КАА. Дијаграми површине одзива и оптимизација заснована на пожељности коришћени су за идентификацију оперативних услова који истовремено задовољавају све унапред дефинисане критеријуме аналитичких перформанси.

3.6 Валидација методе

Развијена HPLC метода је прошла валидацију како би се потврдила погодност за њену намену, у складу са међународним смерницама за валидацију аналитичких метода. Процењени параметри валидације обухватали су специфичност, линеарност, тачност, прецизност, осетљивост (границу детекције (LOD), границу квантификације (LOQ)) и робусност.

3.6.1 Специфичност/Селективност

Специфичност, дефинисана као способност методе да недвосмислено процени испитивани аналит у присуству компоненти за које се може очекивати да покажу интерференцију (компоненте матрикса). Ово је постигнуто анализирањем плацебо смеше (која је садржавала све ексципијенсе као у GP: микрокристалну целулозу, прежелатинизовани скроб, натријум-скроб гликолат, калцијум-хлорид хексахидрат, натријум-хидрогенкарбонат, колоидни, безводни силицијум-диоксид и магнезијум-стеарат) како би се осигурало да нема појаве интерференције на ретенционим временима анализираних лекова.

Хроматограмски пикови све три API су упоређени са хроматограмским пиковима испитиваних ексципијенаса како би се потврдило одсуство коелуирајућих пикова (интерференције).

3.6.2 Линеарност

Линеарност је потврда да у дефинисаном опсегу концентрација АПИ постоји задовољавајућа линеарна зависност промене концентрације и површине пика и да у том опсегу у којем је извршена процена линеарности ће се увек добити тачни резултати при квантитативној анализи. Ова тачност у читавању се остварује добијањем коефицијента детерминације (R^2) већи од 0,9980. Линеарност је процењена припремом и анализом пет различитих концентрација за сваки лек: ПЕР ($10\text{--}200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), АМЛ ($20\text{--}200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) и ИНД ($5\text{--}100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Калибрационе криве су конструисане цртањем површина пикова у односу на одговарајуће концентрације сваког анализата. Линеарност је процењена израчунавањем коефицијента детерминације (R^2) и проценом једначине регресије.

3.6.3 Тачност

Процена тачности методе мери блискост слагања између вредности која је прихваћена као референтна вредност и пронађене вредности. Тачност методе је процењена одређивањем *Recovery* вредности. Три серије раствора од три различите концентрације (80, 100 и 120 % од декларисане концентрације лијека у GP, тј анализираном узорку) за сваки од три лека: ПЕР (128, 160 и 192 $\mu\text{g mL}^{-1}$), АМЛ (111,2, 139 и 166,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) и ИНД (40, 50 и 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$). За сваки ниво концентрације је израчуната *Recovery* вредности, инјектовањем по три раствора од све три наведене концентрације ПЕР, АМЛ и ИНД. Од добијених резултата процењен је коефицијент варијације (односно RSD%), с циљем да се потврди тачност методе у наведеном опсегу концентрација, без обзира на њену промену од $\pm 20\%$.

3.6.4 Прецизност

Прецизност изражава блискост слагања између низа мерења добијених вишеструким узорковањем истог хомогеног узорка под прописаним условима. Прецизност је процењена на два нивоа:

- Поновљивост (прецизност током дана): Процењена анализом шест поновљених припрема стварних узорака (Amlewel® таблете) који садрже 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ПЕР, 139 $\mu\text{g mL}^{-1}$ АМЛ и 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ИНД под оптималним хроматографским условима. Израчуната је релативна стандардна девијација (RSD) резултата.
- Интерпрецизност је процењена понављањем анализе у различитим данима под истим номиналним концентрацијама узорка, а резултати су изражени као %RSD како би се потврдила доследност и прецизност добијених резултата у поновљеним анализама.

3.6.5 Осетљивост методе: Граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ)

LOD је најнижа концентрација анализата која се може поуздано детектовати, а LOQ је најнижа концентрација анализата која се може одредити са прихватљивом прецизношћу и тачношћу. Ове границе су процењене припремом и анализом радних раствора за сва три лека одвојено при веома ниским концентрацијама (1,0; 0,5; 0,25; 0,10; 0,05 и 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$) у растварачу (ацетонитрил/вода HPLC квалитета 40:60, v/v). LOD и LOQ су одређени на основу односа сигнал/шум или израчунати из стандардне девијације одзива и нагиба калибрационе криве.

3.6.6 Робусност

Робусност је мера капацитета методе да остане репродуктивна у погледу добијања поузданих резултата, без обзира на мале случајне промене методе, које се дешавају као грешка коришћене апаратуре или аналитичара. Робусност развијене HPLC методе је систематски процењена коришћењем фракционог факторијалног дизајна (FFD 2⁴⁻¹). Овај DoE приступ је омогућио процену утицаја мањих варијација у критичним параметрима методе (нпр. састав мобилне фазе, рН вредност воденог дела мобилне фазе, брзина протока мобилне фазе, температура колоне) на перформансе методе. Утврђени робусни регион (DS) из фазе оптимизације обезбедио је границе унутар којих је потврђено да је метода робусна, осигуравајући њену поузданост и преносивост у различитим лабораторијским окружењима.

3.7 Процена утицаја аналитичке методе на животну средину

У складу са принципима зелене аналитичке хемије (GAC), утицај на животну средину развијене HPLC методе за истовремено одређивање ПЕР, АМЛ и ИНД је свеобухватно процењен. Четири различита аналитичка алата су коришћена за процену и упоређивање зеленог профила предложене методе са постојећим методама за тернарне смеше лекова ПЕР, АМЛ и ИНД. Употреба више алата пружа робуснију и вишеслојну процену, обрађајући се различитим аспектима утицаја на животну средину:

- Национални индекс метода заштите животне средине (NEMI): Ово је један од најстаријих и најједноставнијих алата за процену утицаја методе. NEMI приказује пиктограм подељен у четири квадранта. Сваки квадрант указује на усклађеност са специфичним зеленим критеријумима: одсуство перзистентних, биоакумулативних и токсичних (PBT) реагенса; одсуство хемикалија наведених на листама опасног отпада Д, Ф, И или Ц; рН вредност коришћених медија у опсегу од 2 до 12; и производња отпада мања од 50 g (48).
- Аналитичка еко-скала: Овај квантитативни алат пружа нумерички резултат (од 0 до 100) за процену утицаја аналитичке методе на животну средину. Резултат се израчунава одузимањем казних поена додељених за различите еколошке недостатке (нпр. токсичност реагенса, потрошња енергије, стварање отпада) од вредности 100 (еколошки најприхватљивија вредност). Резултат са вредностима 100 указује на апсолутно зелену анализу, док су резултати са вредностима изнад 75 сматрају одличним. Резултати са вредностима између 50–75 су еколошки прихватљиви, док су они испод 50 апсолутно еколошки неприхватљиви (35).
- Индекс зелене аналитичке процедуре (GAPI): Уведен недавно, GAPI је полуквантитативни алат који пружа визуелни приказ еколошке прихватљивости. Представљен је у виду пет пентаграма, сваки подељен на неколико делова, који су обојени зеленом, жутом или црвеном бојом на основу примећеног ефекта (низак, средњи или висок утицај, респективно) различитих аспеката аналитичке процедуре. GAPI нуди свеобухватан преглед од прикупљања узорака до третмана отпада (49).
- Процена зеленог профила (AGP): Развијен од стране Драјвера и Рејнија, AGP је још један визуелни алат представљен као пентаграм подељен у пет група ризика и то ризици по: здравље, безбедност, животну средину, отпад и енергију. Сваки део је обојен зеленом, жутом или црвеном бојом, у зависности од плавих и црвених оцена на основу стандарда и прописа Националног удружења за заштиту од пожара (енг. *The National Fire Protection Association-NFPA*). AGP пружа брз визуелни резиме укупног зеленог профила методе (48).

3.7.1 Процењени параметри

Процена зеленила помоћу ових алата фокусира се на неколико кључних параметара који доприносе еколошком отиску аналитичке методе:

- Потрошња енергије: Процена енергије потребне за рад инструмента, грејање, хлађење и друге процесе.
- Опасности на раду: Процена ризика за лабораторијско особље повезаних са руковањем хемикалијама.
- Хемијске опасности: Категоризација и квантификација токсичности и опасне природе свих коришћених реагенса и растварача.
- Стварање отпада: Мерење и карактеризација запремине и врсте отпада произведеног током аналитичког поступка.

Систематским процењивањем ових параметара коришћењем вишеструких алата за процену зеленила, студија је показала да је развијена HPLC метода значајно зеленија у поређењу са претходно објављеним методама за сличне комбинације лекова. Ова свеобухватна процена истиче успешну интеграцију еколошких разматрања у процес развоја аналитичке методе, доприносећи одрживијој пракси контроле фармацеутског квалитета.

3.8 Кинетичке студије разградње

Понашање и кинетика разградње периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида, како појединачно тако и у комбинацији, свеобухватно су испитани под различитим стресним условима. Ове студије су осмишљене да симулирају потенцијалне путеве разградње који се јављају током производње, складиштења и дистрибуције производа са фиксном комбинацијом доза.

Раствори сва три АПИ су подвргнути низу услова присилне разградње како би се испровоцирала хемијска нестабилност. Фактори стреса су укључивали хидролитичку (кисела, базна, неутрална рН вредност), фотолитичку (светлост) и оксидативну деградацију. За све студије, раствори лекова су припремљени у концентрацији од $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ за сваки лек, појединачно и у бинарним или/и тернарним смешама.

- Хидролитичка разградња:
 - Кисела хидролиза: Узорци су изложени 1М раствору хлороводоничне киселине (HCl) (pH 0,52). Ова концентрација је изабрана након прелиминарних студија које су показале да ниже концентрације (0,1 М и 0,01 М) нису успеле да изазову значајну деградацију лекова у периоду од 72 сата.
 - Базна хидролиза: Узорци су подвргнути 0,001М раствору натријум-хидроксида (NaOH) (pH 11,01). Утврђено је да је ова концентрација одговарајућа за изазивање разградње након прелиминарних студија са 0,01М и 0,1М растворима.
 - Неутрална хидролиза: Узорци су изложени води HPLC чистоће (pH 6,98) ради процене разградње у неутралним условима.
 - Температурни услови: Студије хидролитичке разградње су спроведене на собној температури (око 25 °C), као и на повишеним температурама 45 °C и 65 °C, ради процене утицаја повишене температуре на брзину разградње и омогућавања кинетичких прорачуна.

- Време излагања: Узорци су били изложени хидролитичком стресу током периода од 72 сата.
- Фотолитичка разградња:
 - Узорци су били изложени светлости у Memmert ICH 110L комори опремљеној флуоресцентним лампама које пружају хладну белу светлост (која одговара дневној светлости) и УВ зрачење у спектралном опсегу од 320–400 nm.
 - Трајање излагања је одређено на основу степена примећене разградње, уз узорковање у различитим временским тачкама (0-72 h).
- Оксидативна разградња:
 - Ефекат оксидације је испитан коришћењем раствора водоник-пероксида. Прелиминарне студије су спроведене са 3%, 15% и 30% растворима H_2O_2 како би се идентификовала одговарајућа концентрација за изазивање мерљиве оксидативне разградње. Концентрација одабрана за накнадну кинетичку анализу је затим доследно примењивана у свим експериментима ове разградње, у зависности од испитиваног лека.
 - Трајање излагања је праћено, уз узорковање у различитим временским тачкама (0-72 h).

3.8.1 Узорковање и анализа

Током студија разградње, узорци су сакупљани у унапред одређеним временским интервалима (0, 15, 30 и 60 минута; 24, 48 и 72 сата). Сви узорци, осим оних који су подвргнути фотолитичкој разградњи, чувани су на собној температури и у мраку пре анализе како би се спречила даља разградња. Преостала концентрација сваког лека у третираним узорцима одређена је коришћењем претходно развијене и валидиране методе високоефикасне течне хроматографије са обрнутом фазом (RP-HPLC).

Да би се узело у обзир свако потенцијално позадинско сметање од стресних агенаса или компоненти мобилне фазе, припремљени су и узорковани раствори слепих проба, који су садржавали само мобилну фазу и одговарајући стресни агенс, у истим временским тачкама. Аналитички резултати из ових *blank* раствора коришћени су за одузимање позадинских сметњи, осигуравајући да измерене концентрације лекова тачно одражавају разградњу три лека, те да нема појаве интерференције.

3.8.2 Кинетички прорачуни

Концентрације сва три лека одређене из третираних узорака коришћене су за конструисање одговарајућих графика за кинетичку анализу. Ред реакције разградње (нултог реда, првог реда или другог реда) одређен је конструисањем одговарајућих графика концентрације (за нулти ред), природног логаритма концентрације (за први ред) или инверзне концентрације (за други ред) као функције времена. Ред реакције је додељен на основу највишег коефицијента детерминације (R^2) добијеног из ових графика.

Из нагиба линеарних графика одређене су константе брзине разградње (k). Ове константе брзине, заједно са одређеним редовима реакција, су затим коришћене за прорачун кључних кинетичких параметара, укључујући:

- Полувремена разградње ($t_{1/2}$): Време потребно да се концентрација лека смањи за половину.

- Рок трајања (t_{90}): Време потребно да се концентрација лека смањи на 90% од њене почетне концентрације.

Време полураспада разградње и рок трајања су израчунати користећи једначину (1), (2) или (3).

$$\text{нулти ред } t_{1/2} = \frac{A_0}{2 \cdot k}, t_{90} = \frac{A_0}{10 \cdot k} \quad (1)$$

$$\text{први ред } t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}, t_{90} = \frac{0.105}{k} \quad (2)$$

$$\text{други ред } t_{1/2} = \frac{1}{k \cdot A_0}, t_{90} = \frac{0.111}{k \cdot A_0} \quad (3)$$

где је A_0 концентрација лека на почетку експеримента, а k је константа брзине разградње (50–52). Користећи Аренијусову једначину (4):

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (4)$$

где је E_a Аренијусова енергија активације, R је универзална гасна константа $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T је температура у K и A је преекспоненцијални фактор (51);

и Ејрингову једначину (5) (53–55):

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (5)$$

где је k_B Болцманова константа ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h је Планкова константа ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$) и $\Delta G^\ddagger$ је слободна енергија активације, дефинисана једначинама (6) и (7) (50–52):

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (6)$$

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (7)$$

одредила се енергија активације (E_a), те привидни термодинамички параметри активације као што су слободна енергија активације ($\Delta G^\ddagger$), енталпија активације ($\Delta H^\ddagger$) и ентропија активације ($\Delta S^\ddagger$). Пошто разградња испитиваних лекова може укључивати више истовремених или узастопних реакционих путева, израчунати параметри активације третирају се као привидни термодинамички параметри активације, те су вредности добијене из укупне, експериментално посматране деградације, па оне описују “ефективно” понашање система, а не нужно тачне термодинамичке параметре једног елементарног механистичког корака. Ови термодинамички параметри пружају дубљи увид у механизам и енергетске потребе процеса разградње. Сви кинетички прорачуни и статистичке анализе су извршени коришћењем софтверских пакета наведених у наставку, чиме се обезбеђује следљивост и поновљивост добијених резултата.

3.9 Анализа података и статистичке методе

Сви експериментални подаци генерисани развојем хроматографске методе, валидацијом и студијама кинетике деградације подвргнути су ригорозној статистичкој анализи како би се осигурала поузданост, валидност и научни интегритет резултата.

За обраду, моделовање и интерпретацију података коришћени су одговарајући софтвер и статистички тестови.

3.9.1 Софтвер за анализу података

- Design Expert 11.0.0 (Stat Ease Inc., Минеаполис, Минесота, САД): Овај софтвер је широко коришћен за дизајн експеримената (DoE), укључујући Централни композитни дизајн за оптимизацију метода и Фракциони факторијални дизајн за тестирање робусности. Такође је олакшао анализу података за DoE студије, укључујући тестирање анализе варијансе (ANOVA), Дерингерову функцију пожељности и одређивање глобалних оптималних услова. Софтвер је био кључан у развоју и валидацији квадратних модела одговора за критичне аналитичке атрибуте.
- Agilent ChemStation софтвер: Овај софтвер, интегрисан са Agilent 1200 серијом HPLC система, коришћен је за контролу инструмената, прикупљање сирових података, интеграцију пикова и почетну квантитативну анализу хроматографских циклуса.
- Microsoft Excel/Остали статистички пакети: За општу обраду података, прорачуне и графичку презентацију коришћени су Microsoft Excel и други статистички софтверски пакети. За статистичке анализе које превазилазе могућности Design Expert-a, коришћен је, по потреби, специјализовани софтвер (SPSS и GraphPad Prism) за кинетичке прорачуне, регресиону анализу и тестирање хипотеза.

3.9.2 Статистички тестови

- Анализа варијансе: ANOVA је била примарни статистички алат који се користио за процену значаја фактора и њихових интеракција на критичне аналитичке атрибуте током оптимизације методе и тестирања робусности. Помогла је у одређивању који параметри имају статистички значајан утицај на перформансе методе и у валидацији развијених модела квадратног одговора. Добијене p -вредности из ANOVA биле су кључне за идентификацију значајних чланова у регресионим моделима, који су били неопходни за дефинисање утицаја критичних фактора и њихових двофакторских интеракција на праћене одговоре система – процена је вршена кроз статистичке и графичке анализе (3D и 2D дијаграми).
- Регресиона анализа: Вишеструка линеарна регресиона анализа је примењена за моделирање односа између критичних параметара методе и критичних аналитичких атрибута. Адекватност модела је процењена на основу коефицијента детерминације (R^2), прилагођеног $adj.R^2$ и предвиђених вредности $pred.R^2$, као и теста недостатка подударана. Високе вредности R^2 указују на добар одабир математичког модела – постоји добра корелација између експериментално добијених и израчунатих резултата анализе. Сви фактори који су имали p -вредност $< 0,05$, сматрају се значајним, те су се морали јасно дефинисати (опсег њихове вредности у којима ће се очувати робусност методе).
- Корелациона анализа: Користи се за процену јачине и правца линеарних односа између варијабли, посебно у кинетичким студијама за одређивање реда реакција разградње на основу највишег коефицијента детерминације.
- Израчунавање кинетичких параметара: Константе брзине разградње, време полураспада и рок трајања израчунати су коришћењем утврђених кинетичких

једначина заснованих на утврђеном реду реакција. Енергија активације и термодинамички параметри (слободна енергија, енталпија и ентропија активације) израчунати су коришћењем Аренијусове и Ејрингове једначине, респективно.

Овакав ригорозан приступ анализи података и примена одговарајућих статистичких метода осигурали су да су закључци изведени из експерименталног рада научно утемељени и статистички валидни.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Ово поглавље представља свеобухватан приказ и дискусију резултата добијених експерименталним истраживањима спроведеним у оквиру ове докторске дисертације. Резултати су систематски организовани тако да одражавају вишестепени приступ истраживању, који обухвата развој и валидацију аналитичке методе, процену њене еколошке прихватљивости, као и детаљно испитивање кинетике разградње активних фармацеутских супстанци, како појединачно тако и у бинарним, тернарним смешама и фиксној комбинацији доза. Поред приказа експерименталних података, у овом поглављу дата је и њихова интерпретација у контексту стабилности испитиваних лековитих супстанци, могућих интеракција у комбинованим системима и значаја добијених резултата за развој робусних, поузданих и еколошки прихватљивих аналитичких поступака.

Први део поглавља односи се на развој и валидацију методе високоефикасне течне хроматографије за истовремено одређивање периндоприл терц-бутиламина, амлодипин-бесилата и индапамида. У оквиру овог дела приказани су резултати прелиминарних испитивања, примена експерименталног дизајна у оптимизацији методе, као и процена робусности и валидационих параметара у складу са релевантним међународним смерницама. Добијени резултати су разматрани са аспекта аналитичке поузданости, селективности и применљивости методе за испитивање фиксне комбинације антихипертензивних лекова. Након тога, представљена је процена еколошке прихватљивости развијене методе применом различитих алата зелене аналитичке хемије, са циљем да се сагледа укупан утицај предложеног аналитичког поступка на животну средину, здравље аналитичара и потрошњу ресурса.

Последњи део поглавља посвећен је приказу и дискусији резултата студија форсиране разградње, са посебним освртом на профиле стабилности и кинетику разградње ПЕР, АМЛ и ИНД под различитим стресним условима. У овом делу анализирано је понашање испитиваних супстанци појединачно, у бинарним и тернарним смешама, као и у оквиру формулисане фиксне комбинације доза. Посебна пажња посвећена је поређењу кинетичких параметара, утицају састава система на брзину разградње, као и тумачењу привидних термодинамичких функција активације добијених применом Аренијусове и Еирингове једначине.

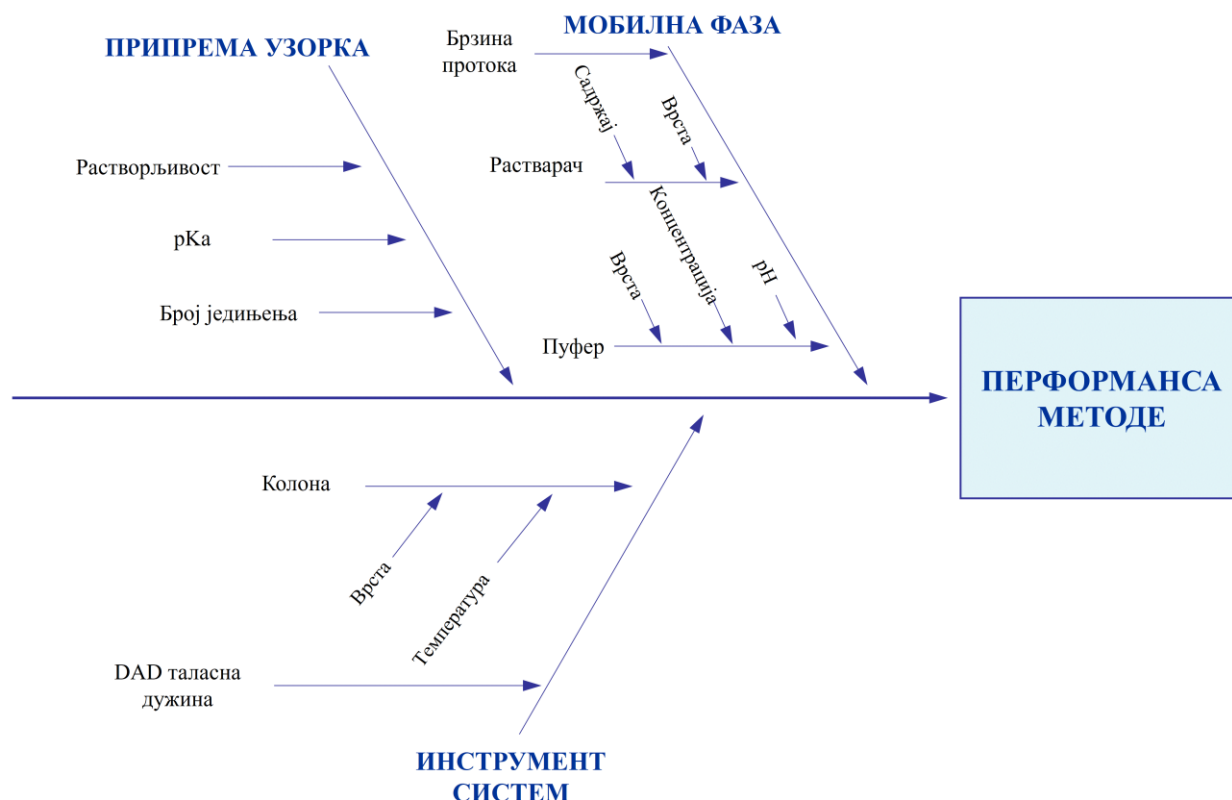
Резултати и њихова дискусија директно су повезани са специфичним циљевима дефинисаним у уводном делу дисертације и омогућавају проверу полазне хипотезе да присуство више активних фармацеутских супстанци у фиксној комбинацији може утицати на путеве разградње, стабилност и кинетичко понашање појединачних компонената. Успешан развој и валидација HPLC методе доприноси унапређењу аналитичког приступа за испитивање фиксних комбинација доза применом принципа квалитета по дизајну. Истовремено, процена еколошке прихватљивости методе пружа основу за сагледавање њене одрживости, док студије кинетике разградње дају значајан увид у стабилност испитиваног система и могуће правце даљег развоја формулације. Заједно, ови резултати представљају експерименталну основу за интегрисани QbD приступ у развоју робусних, стабилних и еколошки прихватљивих аналитичких метода за фиксне комбинације антихипертензивних лекова.

4.1 Резултати развоја и оптимизације методе

4.1.1 Прелиминарне студије и процена ризика

Почетне прелиминарне студије су спроведене с циљем да се идентификују критични параметри методе који значајно утичу на аналитички циљни профил за истовремено одређивање периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида. На основу прелиминарних истраживања, која су се заснивала на статистичкој обради података о партиционој вредности и дистрибуционом коефицијенту ($\log P$ и pK_a -вредности), користећи Марвин Скеч програм, као и на основу спроведених прелиминарних експеримената који су подразумевали варирања колоне и састава мобилне фазе, могло се закључити да за испитиване супстанце највише одговарају стационарне фазе неполарног карактера (C18 колоне) да би се омогућило довољно задржавање анализата. За мобилне фазе, закључено је да би најбоље одговарала комбинација смеше ацетонитрила и воденог раствора фосфатног пуфера, јер се на тај начин метода скратила у односу на кориштење метанола, односно ацетатног пуфера, те су се побољшали профили пикова и резолуција.

Конструкцијом *Ishikawa* дијаграма узрока/последиче (Слика 4) визуелно су представљени потенцијални фактори (варијабле) који утичу на значајне одговоре система који ће се пратити у овој аналитичкој методи. Овај алат је омогућио систематску идентификацију ризика и одређивање приоритета варијабли које утичу на перформансе методе.



Слика 4: *Ishikawa* дијаграм узрока/последиче

Овај систематски приступ довео је до идентификације кључних СМР за даљу оптимизацију. Док су температура колоне, брзина протока, таласна дужина детекције и запремина убризгавања оптимизоване током ове прелиминарне фазе и одржаване константним (50 °C, 1 mL min⁻¹, 210 nm и 10 µL, респективно), однос органског растварача (садржај ацетонитрила), концентрација пуфера и рН водене фазе су одабрани као примарне варијабле за систематску оптимизацију коришћењем DoE. Варирањем рН вредности воденог дела мобилне фазе, те процента ацетонитрила, као и јачине пуфера дошло се до централне тачке дизајна за даљу оптимизацију методе (35% ацетонитрила, 20 mM пуфер и рН 2,7).

Критични аналитички атрибути су дефинисани као одговори методе које је потребно контролисати да би се постигао АТР. То је укључивало: фактор резолуције између ПЕР и АМЛ ($R_{SPER,AML}$), фактор резолуције између АМЛ и ИНД ($R_{SAML,IND}$), време задржавања ИНД (t_{RIND}), ширину пика ПЕР (W_{PER}) и фактор задржавања ПЕР (k_{PER}). Избор ових САА је заснован на њиховој директној релевантности за перформансе методе, посебно ефикасност раздвајања, време анализе и карактеристике хроматографског пика испитиваних једињења (нпр. фактор асиметрије пика, ширина и висина пика, и др).

4.1.2 Оптимизација методе коришћењем Централног композитног дизајна

Централни композитни дизајн је коришћен за систематско испитивање утицаја одабраних СМР (садржај ацетонитрила, концентрација пуфера и рН воденог дела мобилне фазе) на дефинисане САА. Помоћу DoE генерисан је и извршен сет од 17 експеримената, укључујући три понављања у централним тачкама. Експериментални дизајн и добијени одговори за сваки експеримент сумирани су у Табели 1.

Табела 1. Дизајн експеримената креираних централним композитним дизајном и добијени резултати

Број	Фактори			Одговори				
	Ацетонитрил (%)	Концентрација пуфера (mM)	pH	k_{PER}	$Rs_{AML,IND}$	t_{RIND} (min)	W_{PER}	$Rs_{PER,AML}$
1	30	10	2,2	1,58	0,10	8,334	0,1230	30,47
2	40	10	2,2	0,45	13,97	3,807	0,0667	9,60
3	30	30	2,2	1,68	1,47	8,468	0,1099	27,60
4	40	30	2,2	0,51	13,49	3,800	0,0603	10,56
5	30	10	3,2	2,87	0,83	8,308	0,5602	7,81
6	40	10	3,2	1,08	10,94	3,824	0,1252	0,58
7	30	30	3,2	2,83	2,53	8,708	0,5609	8,76
8	40	30	3,2	1,12	11,07	3,788	0,1079	0,82
9	30	20	2,7	2,47	2,43	8,831	0,3986	12,47
10	40	20	2,7	0,91	12,44	3,822	0,1903	2,05
11	35	10	2,7	1,25	8,51	5,381	0,2036	7,17
12	35	30	2,7	1,20	7,09	5,792	0,1016	16,63
13	35	20	2,2	0,85	9,17	5,366	0,0817	16,93

14	35	20	3,2	1,76	8,07	5,298	0,3979	2,61
15	35	20	2,7	1,41	7,91	5,358	0,2624	6,01
16	35	20	2,7	1,41	8,00	5,362	0,2651	6,02
17	35	20	2,7	1,41	8,02	5,362	0,2622	6,05

k_{PER} – ретенциони фактор периндоприл терц-бутиламина; $R_{SAML,IND}$ - фактор резолуције између амлодипин бесилата и индапамида; $t_{R\ IND}$ – време задржавања индапамида; W_{PER} - ширина пика периндоприл терц-бутиламина; $R_{S\ PER,AML}$ – фактор резолуције између периндоприл терц-бутиламина и амлодипин бесилата

Добијени резултати из табеле 1 су показали да су вредности k_{PER} значајно варирале (0,45 до 2,87), што указује на његову високу осетљивост на промене праћених фактора. Слично томе, W_{PER} се кретао од 0,0667 до 0,5609. Оба фактора резолуције, $R_{SAML,IND}$ и $R_{SPER,AML}$, показали су широк распон вредности ($R_{SAML,IND}$: 0,10–13,97; $R_{SPER,AML}$: 0,58–30,47), што указује такође на њихову осетљивост на промене испитиваних фактора и потенцијал за постизање потпуног раздвајања хроматографских пикова испитиваних једињења. Време задржавања IND (t_{RIND}) варирало је од 3,788 до 8,831 минута, што одражава утицај СМР на трајање методе, као и на што бољу еколошку прихватљивост.

Односи између СМР и САА моделирани су коришћењем полиномске једначине другог реда, која укључује детаљну анализу за линеарне, интеракцијске и квадратне ефекте. Коефицијенти ових квадратних модела одговора и њихова статистичка значајност (p -вредности) приказани су у Табели 2.

Табела 2. Коефицијенти квадратних модела одговора.

	k_{PER}		$Rs_{AML,IND}$		t_{RIND}		W_{PER}		$Rs_{PER,AML}$	
	Коеф,	р-вредност	Коеф,	р-вредност	Коеф,	р-вредност	Коеф,	р-вредност	Коеф,	р-вредност
b_0	1,3800	<0,0001*	8,2200	<0,0001*	5,4500	<0,0001*	0,2511	<0,0001*	7,1200	0,0006*
b_1	-0,7360	<0,0001*	5,4600	<0,0001*	-2,3600	<0,0001*	-0,1202	<0,0001*	-6,3500	0,0001*
b_2	0,0110	0,4680	0,1300	0,5300	0,0902	0,0961	-0,0138	0,2096	0,8740	0,3407
b_3	0,4590	<0,0001*	-0,4760	0,0462*	0,0151	0,7571	0,1310	<0,0001*	-7,4600	<0,0001*
b_{12}	0,0050	0,7642	-0,4275	0,0931	-0,0721	0,2118	-0,0014	0,9030	0,3900	0,6955
b_{13}	-0,1500	<0,0001*	-0,9050	0,0045*	-0,0261	0,6339	-0,0978	<0,0001*	2,8400	0,0207*
b_{23}	-0,0200	0,2523	0,1175	0,6098	0,0296	0,5901	0,0004	0,9750	0,3875	0,6973
b_{11}	0,3254	<0,0001*	-0,9761	0,0371*	0,8104	<0,0001*	0,0525	0,0299*	-0,6800	0,6929
b_{22}	-0,1396	0,0015*	-0,6111	0,1520	0,0704	0,4628	-0,0894	0,0024*	3,9600	0,0477*
b_{33}	-0,0596	0,0683	0,2089	0,5998	-0,1841	0,0820	-0,0022	0,9131	1,8300	0,3045
R^2	0,9982		0,9915		0,9974		0,9836		0,9853	
adj, R^2	0,9959		0,9805		0,9940		0,9625		0,9664	
pred, R^2	0,9843		0,9356		0,9795		0,8735		0,8957	
Недостатак подударња (р-вредност)	0,2900		0,4772		0,5779		0,5344		0,2560	

k_{PER} – ретенциони фактор периндоприл терц-бутиламина; $Rs_{AML,IND}$ - фактор резолуције између амлодипин бесилата и индапамида; t_{RIND} – време задржавања индапамида; W_{PER} - ширина пика периндоприл терц-бутиламина; $Rs_{PER,AML}$ – фактор резолуције између периндоприл терц-бутиламина и амлодипин бесилата; $b_{1,2,3}$ – коефицијенти који одговарају линеарним члановима, $b_{12,13,23}$ – коефицијенти који одговарају интеракцијским члановима и $b_{11,22,33}$ – коефицијенти који одговарају квадратним члановима; adj. R^2 - прилагођени коефицијент детерминације; pred. R^2 - предвиђени коефицијент детерминације; (*) – статистички значајни фактори и интеракције за p -вредност < 0,05

Добијени модели из табеле 2 су показали високу статистичку адекватност, са R^2 вредностима у распону од 0,9836 до 0,9982, прилагођеним R^2 вредностима од 0,9625 до 0,9959 и предвиђеним R^2 вредностима од 0,8735 до 0,9843. Разлика између прилагођеног и предвиђеног R^2 била је константно мања од 0,2 за све САА, што потврђује предиктивну способност модела. Штавише, p -вредности за недостатак подудараности за све моделе одговора биле су веће од 0,05, што указује на одличан одабир математичком модела за предвиђање, као и на то да нема значајне грешке у математички израчунатим и експериментално добијеним подацима – присутно је одлично подударане.

Конкретни увиди у утицај СМР на САА изведени су из једначина модела (које садрже само вредности за СМР и њихове интеракције које су се показале значајним p -вредност $< 0,05$):

$$k_{PER} = 1,38 - 0,736A + 0,4590C - 0,1500AC + 0,3254A^2 - 0,1396B^2 \quad (8)$$

$$Rs_{AML,IND} = 8,22 + 5,45A - 0,4760C - 0,9050AC - 0,9761A^2 \quad (9)$$

$$tR_{IND} = 5,45 - 2,36A + 0,8104A^2 \quad (10)$$

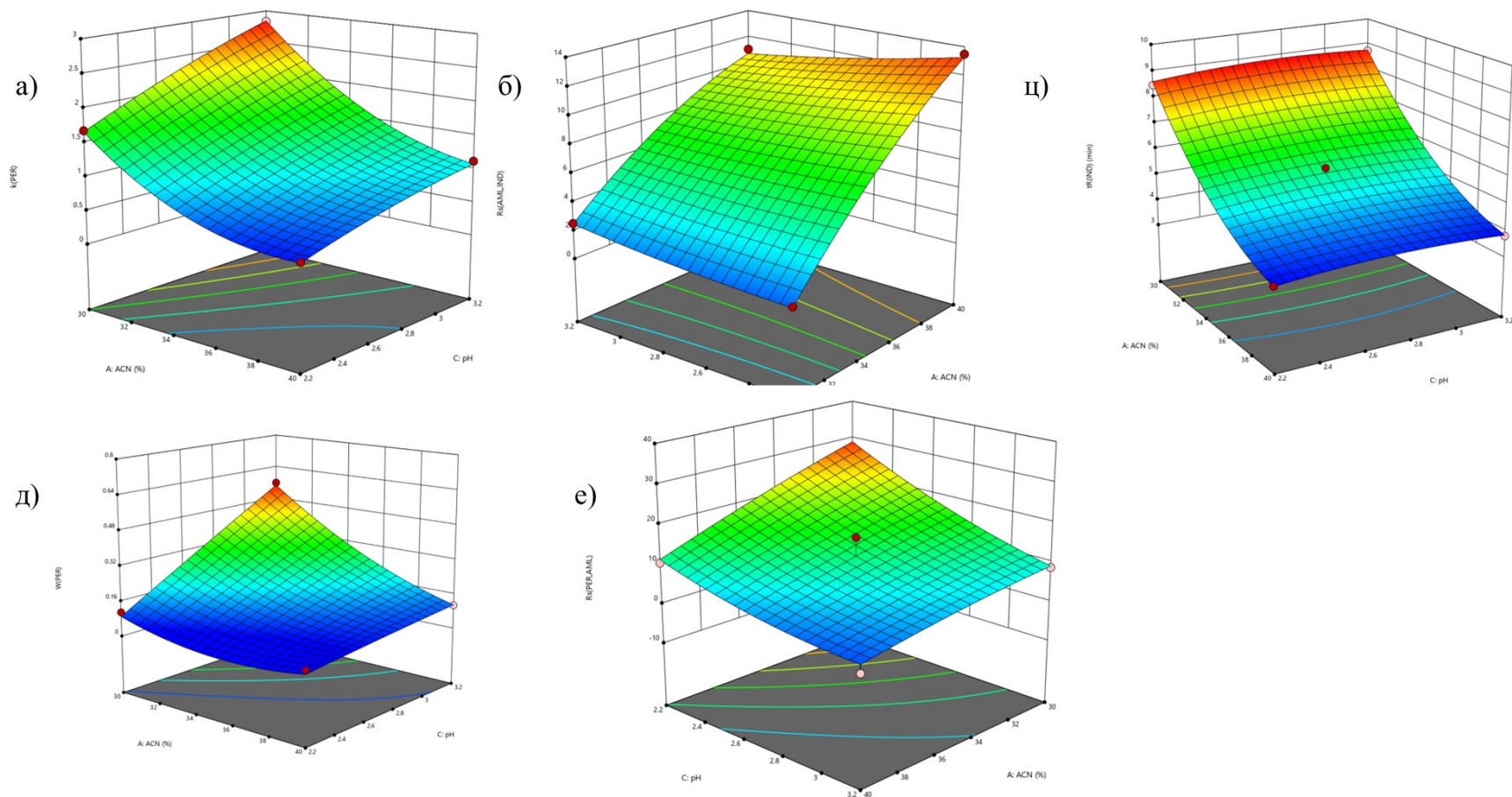
$$W_{PER} = 0,2511 - 0,1202A + 0,1310C - 0,0978AC + 0,0525A^2 - 0,0894B^2 \quad (11)$$

$$Rs_{PER,AML} = 7,12 - 6,35A - 7,46C + 2,84AC + 3,96B^2 \quad (12)$$

A – садржај ацетонитрила (%); B – концентрација пуфера (mmol L^{-1}); C – рН вредност воденог дела мобилне фазе

- k_{PER} : Из једначине (8) се види да фактори A и C имају значајан утицај на ретенциони фактор ПЕР уз додатак нелинеарних ефеката фактора B; са смањењем садржаја ацетонитрила и повећањем рН вредности водене фазе, вредност k_{PER} се повећава до одређене тачке, када је потребно узети у обзир интеракције између A и C, као и нелинеарне ефекте концентрације пуфера.
- $Rs_{AML,IND}$: Са повећањем садржаја ацетонитрила, фактор резолуције између АМЛ и ИНД ће се повећавати до одређене тачке, када ће вредност $Rs_{AML,IND}$ почети да се смањује због негативног знака испред нелинеарног квадратног члана A^2 (једначина 9). Са повећањем рН водене фазе, $Rs_{AML,IND}$ се смањује, међутим, са повећањем оба фактора, A и C, вредност $Rs_{AML,IND}$ се смањује.
- tR_{IND} : Време задржавања IND значајно је под утицајем садржаја ацетонитрила, где је метода краћа са повећањем садржаја ацетонитрила до одређене тачке, када даље повећање доводи до дужег елуирања (једначина 10).
- W_{PER} : Ширина пика периндоприла се смањује са вишим садржајем ацетонитрила и смањеном рН вредношћу водене фазе, са значајном интеракцијом између ова два фактора и нелинеарном зависношћу садржаја ацетонитрила, што имплицира да ће повећање садржаја ацетонитрила након одређене тачке резултирати повећањем ширине пика (једначина 11).
- $Rs_{PER,AML}$: На овај САА утиче промена садржаја ацетонитрила и рН вредности водене фазе, са значајним утицајем интеракција ових фактора; са повећањем садржаја ацетонитрила и рН вредности водене фазе, фактор резолуције између PER и AML се смањује (једначина 12).

Графички прикази, као што су 3Д површински дијаграми (Слика 5) и преклапајући дијаграм (Слика 6), визуелно су приказали сложене односе између два критична параметра и одговора, помажући у разумевању дизајн простора.



Слика 5. 3Д графикони за критичне одговоре у функцији два критична параметра хроматографског система (садржај ацетонитрила (%) и рН вредност водене фазе): а) k_{PER} – ретенциони фактор периндоприл терц-бутиламина; б) $R_{sAML,IND}$ - фактор резолуције између амлодипин бесилата и индапамида; ц) t_{RIND} – време задржавања индапамида; д) W_{PER} - ширина пика периндоприл терц-бутиламина и е) $R_{sPER,AML}$ - фактор резолуције између периндоприл терц-бутиламина и амлодипин бесилата.

Фактори-стварне вредности

$k(\text{PER})$
 $R_s(\text{AML}, \text{IND})$
 $t_R(\text{IND})$
 $W(\text{PER})$
 $R_s(\text{PER}, \text{AML})$

● експерименталне тачке

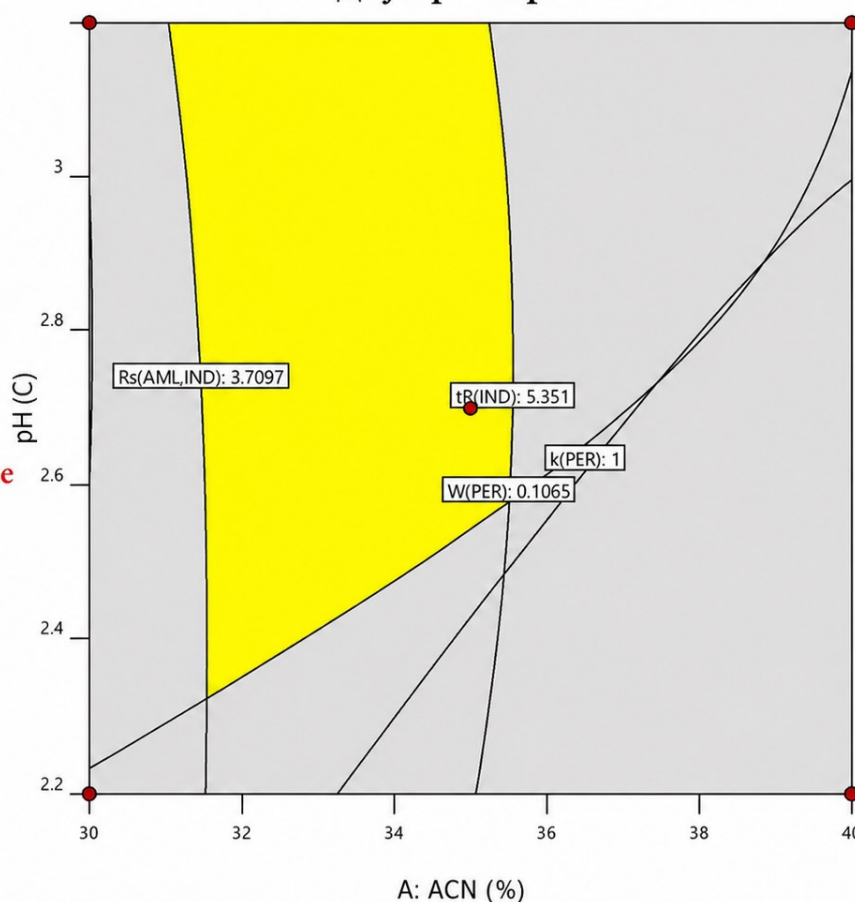
X1 = A: ACN

X2 = C: pH

сталан фактор

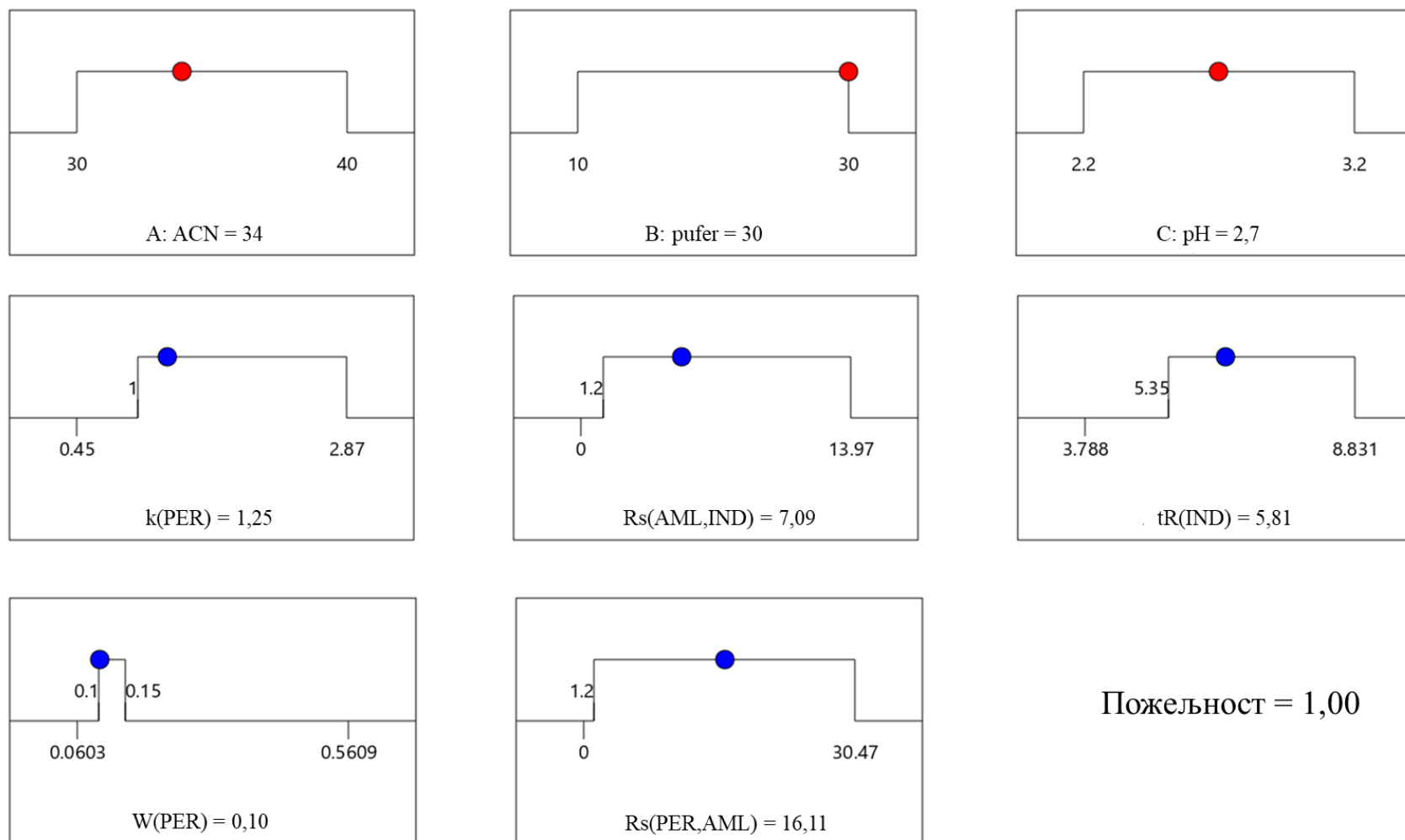
B: пуфер = 30

Дијаграм преклапања



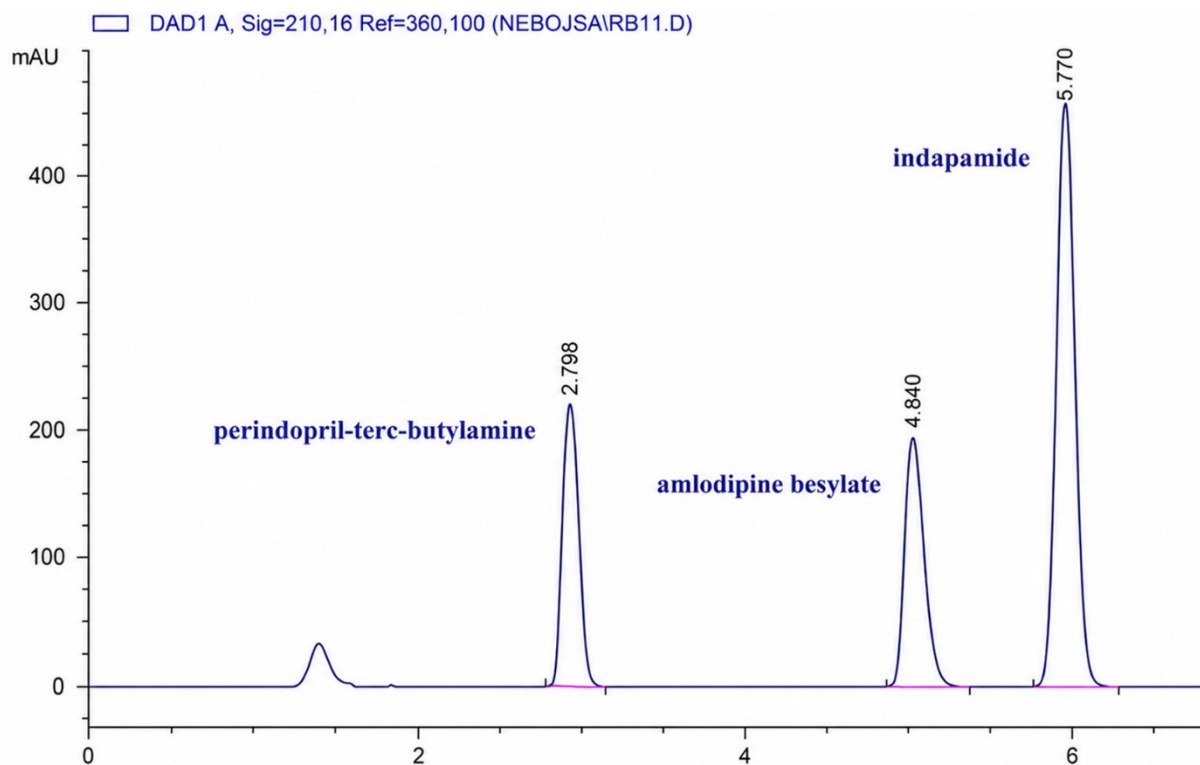
Слика 6. Преклапајући графикон – оптимална област (где су испуњени сви критеријуми за постизање АТР-а) је жута, док су субоптимална решења осенчена, из Design Expert програма.

Оптимални хроматографски услови су, након прелиминарних истраживања, те спроведене оптимизације применом CCD добијени коришћењем Дерингерове функције пожељних одговора, проналажењем оптималних услова анализе са вредности пожељности од 1,0 (сви постављени услови између испитиваних фактора и жељених одговора система су испоштовани – постигнут је глобални оптимум - Слика 7).



Слика 7. Графички приказ резултата Дерингер-ове функције пожељности за СМР и предвиђене вредности САА

Препоручени оптимални услови су били: садржај ацетонитрила од 34%, рН водене фазе 2,7 и концентрација фосфатног пуфера од 30 mmol L⁻¹. Хроматограм добијен под овим оптималним условима (Слика 8) показао је одлично раздвајање ПЕР, АМЛ и ИНД, задовољавајући облик хроматографских пикова, као и задовољавајуће кратко трајање анализе, што потврђује успешно проналажење оптималних услова методе.



Слика 8. Експериментално добијен хроматограм под оптималним условима (садржај ацетонитрила од 34%, рН водене фазе 2,7 и концентрација калијум-фосфатног пуфера од 30 mmol L⁻¹).

Блиско слагање између предвиђених и експериментално добијених вредности САА потврђује адекватност модела оптимизације и подржава робусност одабраних услова рада (Табела 3), што ће се потврдити у наредној фази истраживања.

Табела 3. Доња и горња граница САА и поређење предвиђених и експериментално добијених вредности САА.

САА	Циљ	Доња граница	Горња граница	Релативна значајност	Предвиђене вредности	Експерименталне вредности
k_{PER}	in range	1	2,87	5	1,25	1,20
$Rs_{AML,IND}$	in range	1,2	13,97	5	7,09	7,14
t_{RIND}	in range	5,35	8,83	4	5,81	5,77
W_{PER}	in range	0,10	0,15	3	0,10	0,10
$Rs_{PER,AML}$	in range	1,20	30,47	5	16,11	16,72

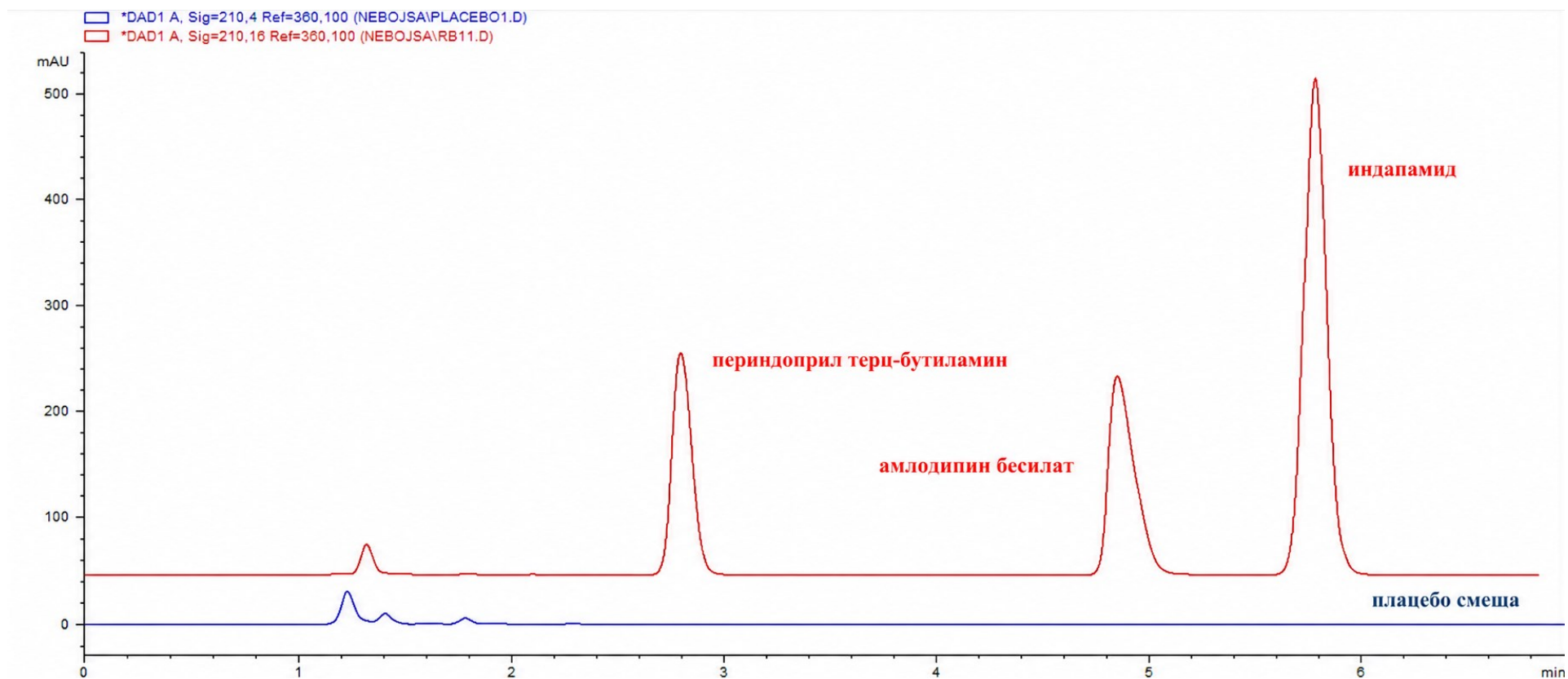
k_{PER} – ретенциони фактор периндоприл терц-бутиламина; $R_{S_{AML,IND}}$ - фактор резолуције између амлодипин бесилата и индапамида; $t_{R\ IND}$ – време задржавања индапамида; W_{PER} - ширина пика периндоприл терц-бутиламина; $R_{S\ PER,AML}$ - фактор резолуције између периндоприл терц-бутиламина и амлодипин бесилата.

4.2 Резултати и дискусија валидације аналитичке методе

Оптимизована HPLC метода је прошла свеобухватну валидацију како би се осигурала њена поузданост, репродуктивност и погодност за истовремено одређивање ПЕР, АМЛ и ИНД у комбинацијама фиксних доза. Параметри валидације који су се у процесу валидације испитивали, били су: робусност, а затим специфичност, линеарност, тачност, прецизност и осетљивост – граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ). Сви параметри валидације процењени су у складу са ICH Q2(R1) смерницом и показали су потпуну усклађеност са прихваћеним критеријумима валидације (46).

4.2.1 Специфичност

Специфичност развијене методе потврђена је поређењем хроматограма добијених из смеше стандардних раствора ПЕР, АМЛ и ИНД са хроматограмима смеше плацеба, односно смеше ексципијенаса присутних у таблетној формулацији. Као што је приказано на сликама 8 и 9, нису уочени интерферирајући пикови из смеше плацеба при временима задржавања (t_R) ПЕР, АМЛ и ИНД, што потврђује способност методе да поуздано идентификује и квантификује испитиване активне фармацеутске супстанце у присуству сложене матрице. Специфичност методе додатно је процењена кроз студије присилне разградње и процену чистоће пикова применом детекције диодним низом, чиме је потврђено да пикови испитиваних супстанци нису били нарушени присуством продуката разградње или помоћних супстанци. Задовољавајуће вредности фактора резолуције између суседних хроматографских пикова ($R_s > 2,0$) за оба пара анализата обезбедиле су адекватно раздвајање и искључиле могућност коелуације која би могла да угрози тачност и прецизност квантитативне анализе (56).



Слика 9. Хроматограм који потврђује специфичност методе (садржај ацетонитрила од 34%, рН вредност воденог дела мобилне фазе 2,7 и концентрација пуфера (калијум-фосфат) у воденом делу мобилне фазе 30 mmol L^{-1}) – хроматограм означен са плавом бојом = анализа смеше плацеба, хроматограм означен са црвеном бојом = анализа смеше лекова ПЕР, АМЛ и ИНД.

4.2.2 Линеарност

Линеарност методе је процењена у широком опсегу концентрација релевантног за испитивање и валидацију методе, као што је приказано у Табели 4. Калибрационе криве су конструисане на основу зависности површине одговарајућих хроматографских пикова од концентрације сваке појединачне активне фармацеутске супстанце. Линеарност је потврђена у опсегу концентрација 10,0–200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ за ПЕР, 20,0–200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ за АМЛ и 5,0–100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ за ИНД. Добијене су регресионе једначине на основу које су се израчунале потребне статистичке вредности (Табела 4):

- $y=9,5827x+12,0055$ за ПЕР,
- $y=13,9771x-0,6198$ за АМЛ и
- $y=73,8153x+40,8393$ за ИНД.

Високе вредности коефицијената корелације ($r > 0,9980$), односно коефицијената детерминације ($R^2 > 0,9990$), указују на изражену линеарност методе у испитиваним концентрационим опсезима за сва три анализита. Овако широки линеарни опсези обезбеђују флексибилност у анализи узорака различитих концентрација и омогућавају примену методе за истовремено одређивање ПЕР, АМЛ и ИНД, узимајући у обзир њихове различите садржаје у комерцијалним формулацијама фиксне комбинације доза. Добијени резултати су у складу са захтевима валидације аналитичких метода и потврђују да је одговор детектора пропорционалан концентрацији анализита у дефинисаним радним опсезима (57).

Табела 4. Параметри валидације за развијену методу.

	ПЕР	АМЛ	ИНД
LOD (S/N=3) $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,025	0,01	0,01
LOQ (S/N=10) $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,05	0,05	0,025
Линеарност			
Концентрације ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10,0-200,0	20,0 – 200,0	5,0-100,0
$y = ax + b$	$y = 9,5827x+12,0055$	$y = 13,9771x-0,6198$	$y = 73,8153x+40,8393$
S_a	0,0705	0,0844	0,5837
S_b	8,6449	10,3704	30,0495
t_b	1,3887	-0,0598	1,3591
r	0,9999	0,9999	0,9999
Тачност			
80%	(128,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(111,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Recovery (%)	103,07 $\pm$ 0,55	102,42 $\pm$ 0,64	103,17 $\pm$ 0,28
RSD (%) ^a	0,41	0,79	0,67
100%	(160,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(139,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Recovery (%)	100,89 $\pm$ 1,14	101,58 $\pm$ 0,78	103,19 $\pm$ 0,10
RSD (%) ^a	0,71	0,27	0,20
120%	(192,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(166,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	(60,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
Recovery (%)	103,84 $\pm$ 1,01	102,66 $\pm$ 1,24	103,45 $\pm$ 0,44
RSD (%) ^a	0,51	0,72	0,71
Прецизност			
Концентрација ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	160,0	139,0	50,0
RSD (%) ^b	0,79	0,77	0,82

Параметри погодности система			
Резолуција		16,72	7,14
k	1,20	2,81	3,54
T	0,981	0,871	1,094
N	12677,76	21030,43	35730,60
Чистоћа пика			
фактор чистоће/израчунати праг	999,978 / 999,958	999,972 / 999,955	999,910 / 999,988

AML – амлодипин бесилат; IND – индапамид; PER – периндоприл терц-бутиламин; LOD – граница детекције, према ICH смерницама прихваћен је однос сигнал/шум од 3; LOQ – граница квантификације, према ICH смерницама прихваћен је однос сигнал/шум од 10; S_a – стандардна девијација нагиба; S_b стандардна девијација пресека на правој линији; t_b – вредност пресека на правој линији; r – коефицијент корелације ($> 0,9990$ за активне супстанце (58)); ^a RSD – релативна стандардна девијација за тачност (критеријуми прихватања $< 2\%$ за активне супстанце); ^b RSD – релативна стандардна девијација за прецизност (критеријуми прихватања $\leq 1,0\%$ за активне супстанце) (58); k – ретенциони фактор (USP референца 1-10 прихватљива); T – фактор асиметрије пика (USP референца $T \leq 2$, $T=1$ за симетрични пик); N – број теоријских платоа (USP референца $N > 2000$)

4.2.3 Тачност

Тачност методе је процењена применом методе стандардног додавања на три нивоа концентрације, односно на 80%, 100% и 120% циљне концентрације за сваки испитивани аналит. Резултати, приказани у Табели 4, показали су задовољавајуће Recovery вредности у распону од 100,89% до 103,84% за ПЕР, од 101,58% до 102,66% за АМЛ и од 103,17% до 103,45% за ИНД. Релативне стандардне девијације (RSD%) за процену тачности биле су ниске и кретале су се у опсегу од 0,20% до 0,79%, што је у складу са прихватљивим критеријумима за анализу активних фармацеутских супстанци. Конзистентност добијених Recovery вредности на различитим нивоима концентрације указује на одсуство пропорционалне пристрасности и потврђује да метода омогућава тачно одређивање садржаја све три активне фармацеутске супстанце у предвиђеном опсегу примене. Ови резултати потврђују погодност методе за анализу ПЕР, АМЛ и ИНД, независно од могућих варијација њихових концентрација које се могу јавити током производње, чувања или процеса разградње лекова (59).

4.2.4 Прецизност

Прецизност методе је процењена кроз испитивање поновљивости, односно прецизности у току дана, анализом шест идентично припремљених раствора стварних узорака готовог производа Amlewel® таблета. Испитивање је спроведено при концентрацији која одговара 100% декларисаног садржаја лекова у таблетама, односно $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ за ПЕР, $139 \mu\text{g mL}^{-1}$ за АМЛ и $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ за ИНД. Добијене вредности релативне стандардне девијације (RSD%) износиле су 0,79% за ПЕР, 0,77% за АМЛ и 0,82% за ИНД, као што је приказано у Табели 4. Ниске вредности RSD%, које су за сва три аналита биле испод 1,0%, потврђују одличну поновљивост методе и указују на њену способност да обезбеди конзистентне резултате квантитативне анализе под уобичајеним радним условима. Овај ниво прецизности је посебно значајан за анализу фиксних комбинација доза, где чак и мање варијације у аналитичким резултатима

могу имати важне импликације на процену униформности дозе, поузданост контроле квалитета и укупни квалитет фармацеутског производа (59).

4.2.5 Граница детекције (LOD) и граница квантификације (LOQ)

Осетљивост методе процењена је одређивањем границе детекције и границе квантификације за све три испитиване активне фармацеутске супстанце, као што је приказано у Табели 4. Вредности LOD и LOQ одређене су на основу односа сигнал/шум од 3:1 за LOD и 10:1 за LOQ, при чему су за валидацију методе усвојене конзервативније вредности. Добијене LOD вредности износиле су $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ за ПЕР, $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ за АМЛ и $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ за ИНД, док су одговарајуће LOQ вредности износиле $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ за ПЕР, $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ за АМЛ и $0,025 \mu\text{g mL}^{-1}$ за ИНД. Ниске вредности LOD и LOQ потврђују да је развијена метода довољно осетљива за поуздану идентификацију и квантификацију све три АПИ, чак и при ниским концентрационим нивоима. Ова осетљивост је од посебног значаја за праћење промена концентрације анализата током студија стабилности и деградације, када може доћи до постепеног смањења садржаја испитиваних супстанци или појаве ниских преосталих концентрација. Постигнута осетљивост је нарочито важна имајући у виду истовремену анализу три једињења са различитим хромофорним својствима. Избор таласне дужине детекције од 210 nm представља аналитички компромис који омогућава адекватну осетљивост за ПЕР, АМЛ и ИНД, уз очување селективности методе. Додатно, примена детекције диодним низом омогућила је процену чистоће пикова и пружила додатну сигурност у идентификацији и квантификацији испитиваних анализата (Табела 4) (60).

4.2.6 Робусност

Испитивање робусности методе спроведено је са циљем да се процени способност развијене методе да остане репродуктивна, поуздана и у оквиру прихватљивих критеријума перформанси при малим, намерним променама критичних хроматографских параметара. Утицај варијација критичних фактора методе на значајне одговоре система, као што су фактор резолуције између хроматографских пикова, време задржавања и ширина пика, процењен је применом фракционог факторијалног дизајна ($\text{FFD } 2^{4-1}$). Испитивани фактори обухватили су садржај ацетонитрила у мобилној фази, концентрацију пуфера у воденом делу мобилне фазе, рН вредност воденог дела мобилне фазе и температуру колоне. Варијације ових параметара износиле су $\pm 2\%$ за састав мобилне фазе, $\pm 2,0 \text{ mM}$ за концентрацију пуфера, $\pm 0,2 \text{ pH}$ јединице за рН вредност воденог дела мобилне фазе и $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ за температуру колоне.

Резултати добијени применом $\text{FFD } 2^{4-1}$ дизајна приказани су у Табели 5. Статистичка анализа ефеката фактора показала је да садржај ацетонитрила, као фактор А, има значајан утицај на фактор резолуције између АМЛ и ИНД ($R_{\text{sAML,IND}}$), као и на време задржавања ИНД (t_{RIND}). Овај резултат је очекиван, имајући у виду значајан утицај удела органског модификатора на ретенционо понашање анализата у RP-HPLC систему. Са друге стране, рН вредност воденог дела мобилне фазе, као фактор Ц, значајно је утицала на ширину пика ПЕР (W_{PER}), што указује на осетљивост хроматографског понашања периндоприла на јонизационо стање и услове у мобилној фази. Насупрот томе, концентрација пуфера и температура колоне показале су релативно ограничен утицај на испитиване одговоре, што додатно потврђује практичну робусност методе.

Табела 5. Тестирање робусности – резултати дизајна експеримената према фракционом факторијалном дизајну 2⁴⁻¹ и коришћењем Донговог алгоритма.

Број	Фактори				Одговори				
	A	B	C	D	k_{PER}	$R_{sAML,IND}$	$t_{RIND}(\min)$	W_{PER}	$R_{sPER,AML}$
1	32	28	2,5	48	1,39	3,68	7,025	0,1109	22,15
2	36	28	2,5	52	0,89	9,62	4,892	0,0810	14,44
3	32	32	2,5	52	1,39	3,07	6,627	0,1040	21,66
4	36	32	2,5	48	0,86	11,04	5,071	0,0824	15,20
5	32	28	2,9	52	1,89	2,67	6,615	0,283	10,37
6	36	28	2,9	48	1,19	10,49	5,057	0,2382	5,98
7	32	32	2,9	48	1,69	3,83	6,913	0,2754	12,21
8	36	32	2,9	52	1,16	9,88	4,771	0,1817	6,55
9	34	30	2,7	50	1,20	7,09	5,792	0,1016	17,39
10	34	30	2,7	50	1,19	7,15	5,780	0,1080	16,10
11	34	30	2,7	50	1,20	7,17	5,770	0,0994	16,68
Factor effects	A				0,565	6,945*	1,847*	0,0475	6,055
	B				0,065	0,340	0,052	0,0174	0,670
	C				0,350	0,135	0,065	0,1500	9,585
	D				0,050	0,950	0,290	0,0143	0,630
Ecritical ($\alpha = 0,05$)					0,929	1,870	0,554	0,097	15,788

A – садржај ацетонитрила (%); B – концентрација пуфера (mmol L⁻¹); C – pH воденог дела мобилне фазе; D - температура колоне (°C); k_{PER} – ретенциони фактор периндоприл терц-бутиламина; R_{sAML,IND} - фактор резолуције између амлодипин бесилата и индапамида; t_{RIND} – време задржавања индапамида; W_{PER} - ширина пика периндоприл терц-бутиламина; R_{sPER,AML} - фактор резолуције између периндоприл терц-бутиламина и амлодипин бесилата

На основу добијених резултата дефинисани су интервали робусности, односно опсези унутар којих варијације критичних фактора не доводе до значајних промена у одговорима методе. Садржај ацетонитрила треба одржавати у опсегу од 33,4% до 34,6%, док pH вредност воденог дела мобилне фазе треба да буде у опсегу од 2,57 до 2,82. Сви израчунати опсези били су у складу са DS регионом, односно робусним регионом претходно дефинисаним дијаграмом преклапања, приказаним на слици 6. Ово потврђује да варијације параметара унутар дефинисаних опсега не доводе до значајног нарушавања хроматографских перформанси методе.

Иако је студија робусности показала да је метода посебно осетљива на промене у садржају ацетонитрила и pH вредности воденог дела мобилне фазе, перформансе методе су остале у оквиру прихватљивих граница при свим испитиваним минималним варијацијама. Чак и при варијацијама pH вредности од ±0,2 јединице, одговори методе остали су задовољавајући, што указује да уобичајени поступци припреме пуфера обезбеђују адекватну контролу овог параметра. Добијени резултати потврђују да је метода робусна и погодна за рутинску примену, као и за потенцијални трансфер између различитих лабораторија и хроматографских система,

под условом да се критични параметри одржавају унутар дефинисаних интервала робусности (61).

4.2.7 Предности и иновације у анализи КФД

Развијена RP-HPLC метода нуди неколико значајних предности за анализу ПЕР/АМЛ/ИНД КФД које је разликују од постојећих аналитичких приступа. Истовремена анализа сва три АПИ у једном аналитичком циклусу представља значајно побољшање аналитичке ефикасности у поређењу са методама које захтевају одвојене анализе за сваку компоненту или евентуално њихове двојне комбинације. Ово повећање ефикасности је посебно вредно у окружењима контроле квалитета са високим протоком где велики број узорака мора бити анализиран у кратким временским оквирима, нпр. *in process*-на и завршна контрола готовог производа у фармацеутској индустрији (62).

Способност методе да брзо и ефикасно раздвоји, идентификује и одреди сваки АПИ у присуству помоћних супстанци и потенцијалних производа деградације АПИ, директно се бави једним од примарних изазова у анализи КФД. Сложени матрични ефекти који се могу јавити у формулацијама са више лекова успешно се превазилазе оптимизираним и валидираним хроматографским условима, обезбеђујући тачну процену садржаја и чистоће сваке АПИ. Ова могућност је неопходна за усклађеност са прописима и осигурање квалитета КФД производа (63).

Интеграција принципа зелене хемије у процес развоја метода представља иновативан приступ који се бави растућим еколошким проблемима у фармацеутској анализи. Смањена потрошња растварача, елиминација опасних реагенаса и минимизирано стварање отпада доприносе одрживијим аналитичким праксама без угрожавања аналитичких перформанси. Ова еколошка свест је у складу са тренутним трендовима у индустрији ка одговорнијој производњи и анализи фармацеутских производа (64).

Природа методе која се кроз проверу низа параметара показала као поуздана и репродуктивна омогућава њену употребу и у анализи ПЕР/АМЛ/ИНД, било у смеши или појединачно, као АПИ или готовог производ, али и за тестирање њихове стабилности. Ова двострука функционалност елиминише потребу за одвојеним аналитичким методама за различите сврхе, поједностављујући аналитичке операције и смањујући дуготрајне процедуре у комплекснијим захтевима за валидацију аналитичких поступака. Могућност праћења производа деградације који се формирају под различитим стресним условима омогућила је добијање вредних информација за разумевање стабилности лекова и оптимизације формулације (56).

4.3 Резултати и дискусија процене утицаја методе на животну средину

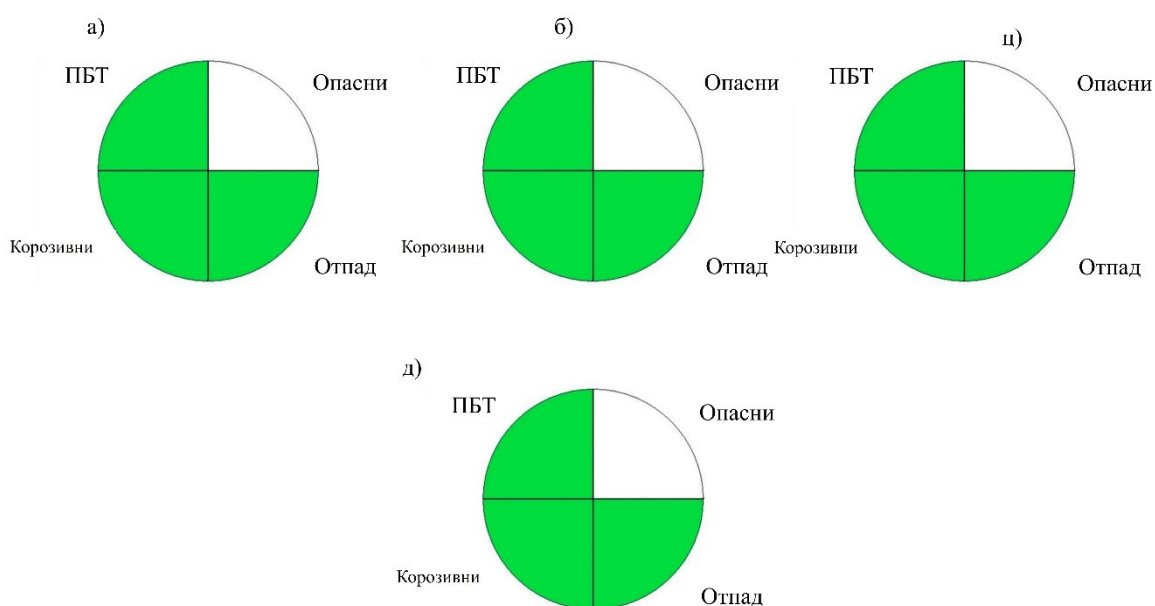
У складу са принципима зелене аналитичке хемије, утицај развијене RP-HPLC методе на животну средину процењен је применом више утврђених алата за процену еколошке прихватљивости аналитичких метода. У овом истраживању примењени су NEMI, Analytical Eco-Scale, GAPI и AGP приступи, што је омогућило свеобухватну и вишестрану процену еколошке прихватљивости развијене методе. Овакав комбиновани приступ обезбеђује робустан оквир за сагледавање различитих аспеката аналитичке одрживости, укључујући избор и количину употребљених растварача, потрошњу енергије, безбедност реагенаса, количину генерисаног отпада и укупан утицај аналитичког поступка на животну средину. На тај начин, процена еколошке прихватљивости није ограничена само на један параметар, већ

пружа квантитативан и квалитативан увид у еколошку прихватљивост предложене методе у контексту савремене фармацеутске анализе (66).

4.3.1 Евалуација Националног индекса метода заштите животне средине (NEMI)

NEMI пиктограм (Слика 10) за развијену HPLC методу указивао је на висок зелени степен. Три од четири квадранта NEMI пиктограма су обојена зеленом бојом, што значи да:

- коришћени реагенси нису означени као перзистентни, биоаккумулативни или токсични (PBT) од стране Инвентара токсичног испуштања Агенције за заштиту животне средине;
- рН вредност коришћеног медијума (2,7) је у прихватљивом опсегу од 2–12;
- количина отпада произведеног током методе је мања од 50 g.



Слика 10. NEMI пиктограм за три постојеће методе (а, б и ц) (41,43,44) и предложену методу (д)

Евалуација NEMI пиктограма је резултирала тиме да су три од четири квадранта обојена зеленом бојом, што указује на повољне еколошке перформансе у већини процењених критеријума заштите животне средине (Слика 10). Овај резултат је посебно значајан јер показује да метода избегава употребу перзистентних, биоаккумулативних и токсичних (PBT) реагенса како је одређено у Инвентару токсичног испуштања Агенције за заштиту животне средине. Преостали део, означен белом бојом, одражава еколошки штетну класификацију повезану са употребом штетних реагенаса, нпр. ацетонитрила, упркос повољном еколошком профилу ове методе у свим осталим фазама (од припреме узорака до анализе завршних података).

Евалуација критеријума за рН вредност показала је да сви раствори коришћени у методи спадају у прихватљив опсег рН вредност (2-12), избегавајући употребу јако киселих или јако базних услова који би могли представљати опасност по животну средину. Процена стварања отпада потврдила је да је укупна количина произведеног отпада по анализи мања од 50 g, што испуњава NEMI критеријум за минималну производњу отпада (65). Овај резултат показује да

метода умањује употребу опасних супстанци и генерише малу количину отпада, што је у складу са циљевима заштите животне средине.

4.3.2 Аналитичка еко-скала

Процена аналитичком еко-скалом је пружила квантитативну меру утицаја методе на животну средину, са резултатом од 85 поена који класификују методу као „одличну“ (еколошки добро прихватљиву) са еколошке перспективе (Табела 6). Овај систем бодовања, који почиње са савршеним резултатом од 100 (апсолутна безбедност по животну средину) и одузимањем казних поена за различите опасности по животну средину, пружа нумеричку основу за поређење различитих аналитичких метода (35).

Казнени поени додељени у овој евалуацији првенствено су се односили на употребу ацетонитрила као органског модификатора у мобилној фази, који, иако мање токсичан од многих алтернативних органских растварача, и даље носи одређено оптерећење/штетност по животну средину. Међутим, релативно мала казна за употребу ацетонитрила, у комбинацији са релативно ниским казним бодовима из других аспеката као што су енергија инструмента и стварање отпада, резултирала је одличном укупном оценом за еколошку прихватљивост.

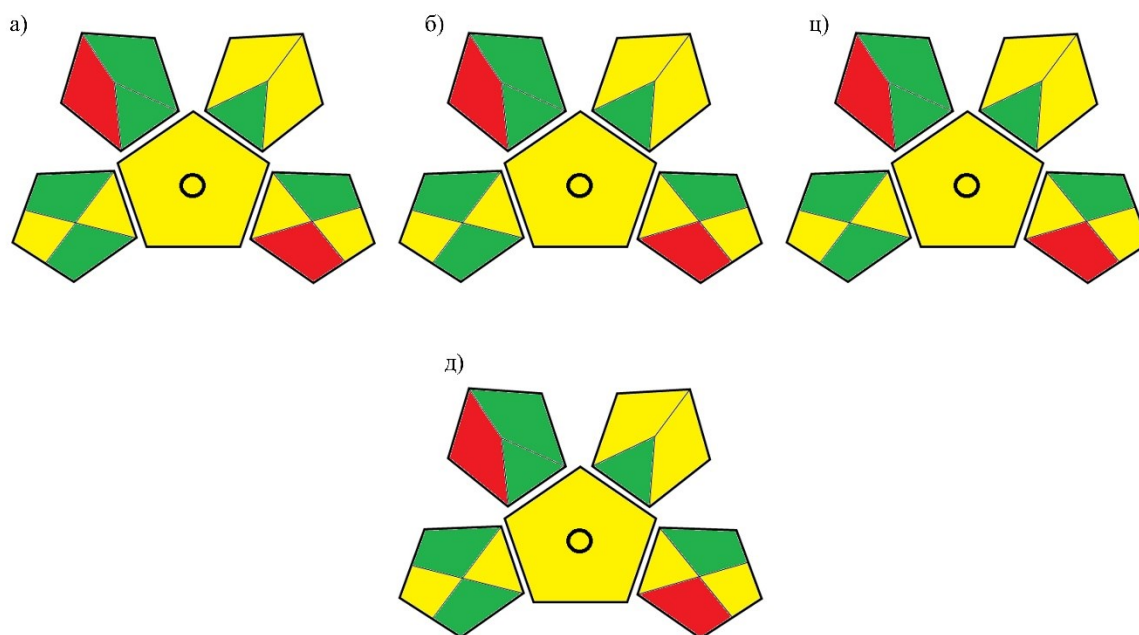
Еко-скала је такође узела у обзир енергетске захтеве аналитичке процедуре, укључујући време рада инструмента и енергетске потребе за припрему узорка. Оптимизовани хроматографски услови, са укупним временом рада мањим од 15 минута и минималним захтевима за припрему узорка, доприносе смањеној потрошњи енергије у поређењу са дужим аналитичким поступцима. Ова ефикасност у погледу времена и енергије представља важан аспект зелене аналитичке хемије који се често занемарује у развоју традиционалних метода (66).

Табела 6. Поређење еко-скале резултата за предложену методу и објављене методе (41–44)

	Казнени поени				
	Развијена метода	Објављена метода ⁽⁴¹⁾	Објављена метода ⁽⁴²⁾	Објављена метода ⁽⁴³⁾	Објављена метода ⁽⁴⁴⁾
Реагенси					
Калијум хидроген фосфат	0	-	-	-	-
Калијум дихидроген фосфат	0	0	0	0	-
Фосфорна киселина	1	2	1	1	-
Метанол	-	6	18	12	12
Ацетонитрил	8	8	-	8	-
Дихлорметан	-	-	-	-	4
Толуен	-	-	-	-	6
Сирћетна киселина	-	-	-	-	4
Енергија инструмента	1	1	1	1	1
Опасност од руковања	0	0	0	0	0
Отпад	5	5	5	5	5
Укупно казних поена	15	22	25	27	32
Укупна оцјена аналитичке Еко скале	85	78	75	73	68

4.3.3 Процена индекса зелене аналитичке процедуре (GAPI)

Додатна процена еколошке прихватљивости развијене методе извршена је применом GAPI приступа, који омогућава визуелну и полуквантитативну процену еколошке прихватљивости аналитичке процедуре кроз приказ у облику пентаграма. Појединачни сегменти GAPI пентаграма означени су бојама у зависности од степена еколошког ризика, при чему зелена боја указује на најповољнији, жута на умерени, а црвена на најнеповољнији еколошки профил. GAPI процена је обухватила више кључних аспеката аналитичког поступка, укључујући припрему узорка, употребу хемијских реагенса, инструменталну анализу, безбедност аналитичара и управљање отпадом.



Слика 11. Петоделни GAPI пентаграми за три објављене методе (а, б и ц) (41,43,44) и предложену методу (д).

Као што је приказано на слици 11, већина сегмената унутар GAPI пентаграма обојена је зеленом бојом, што указује на повољан еколошки профил развијене RP-HPLC методе. Посебно повољна оцена добијена је за припрему узорка, јер је поступак заснован на једноставном растварању и разблаживању, без потребе за сложеним екстракционим техникама, дериватизацијом или употребом већег броја додатних реагенса. Овакав приступ смањује потрошњу хемикалија, скраћује време анализе, смањује количину отпада и истовремено умањује могућност појаве аналитичких грешака.

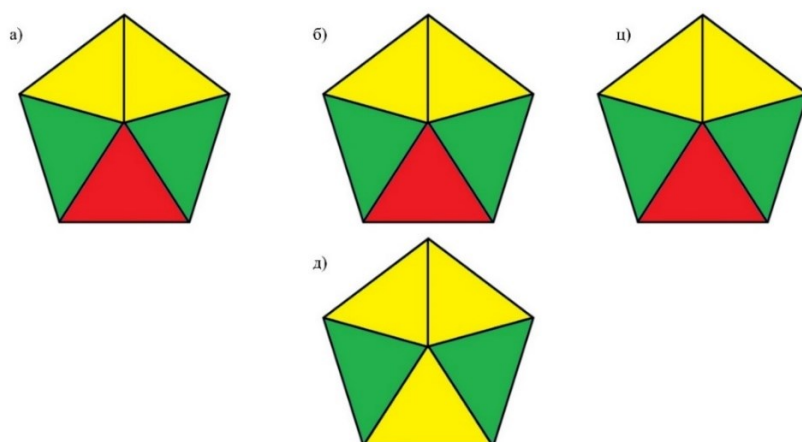
Процена хемијских реагенса показала је да употреба ацетонитрила и фосфатног пуфера у релативно малим количинама доприноси прихватљивом еколошком профилу методе, нарочито имајући у виду да поступак не захтева примену високо токсичних реагенса. Ипак, присуство жутих и црвених сегмената у GAPI пентаграму углавном је повезано са употребом органског растварача, односно ацетонитрила у мобилној фази, као и са настанком течног хемијског отпада. Ови елементи представљају очекиване и тешко потпуно избегљиве компромисе код HPLC метода, али су у развијеној методи сведени на најмању могућу меру у складу са захтевима аналитичке ефикасности и хроматографске селективности.

Процена инструментације указала је на прихватљиву енергетску потрошњу HPLC система у поређењу са енергетски захтевнијим аналитичким техникама, као што су гасна хроматографија или течна хроматографија спрегнута са масеном спектрометријом. Истовремено, процена безбедности аналитичара потврдила је да је ризик од изложености штетним супстанцама ограничен, захваљујући једноставној припреми узорка, умереној употреби органског растварача и одсуству високо опасних реагенса. У целини, GAPI евалуација је потврдила да развијена метода има повољан еколошки профил и да представља прихватљив аналитички приступ у погледу одрживости, безбедности и практичне применљивости у фармацеутској анализи (33).

Додатна процена еколошке прихватљивости вршена је GAPI приступом, тј. конструкцијом сета од пет специфичних пентаграма, који су на основу степена еко-ризика означени одређеним бојама (зелена – еколошки најприхватљивија, до црвене – еколошки најнеприхватљивија). Визуелна анализа добијених пентаграма, пружила је детаљну, полуквантитативну процену еколошке прихватљивости методе у различитим фазама аналитичке процедуре. Из добијених резултата (Слика 11) се види да је већина делова унутар GAPI пентаграма обојена зеленом бојом, што указује на најмањи штетни утицај на животну средину. Преостали жути/црвени сегменти углавном одражавају штетни утицај органских растварача који се користе у одређеним корацима аналитичке процедуре (употреба ацетонитрила за припрему мобилне фазе) и повезано стварање отпада, што су неизбежни компромиси код HPLC метода. Ово је укључивало аспекте везане за припрему узорка, потрошњу реагенса, инструментацију и третман отпада. GAPI процена је истакла успех методе у смањењу укупног оптерећења животне средине повезаног са аналитичким процесом, од руковања узорцима до одлагања отпада.

4.3.4 Процена зеленог профила (AGP)

Евалуација применом AGP приступа, приказана у облику пентаграма, омогућила је свеобухватну процену ризика повезаних са развијеном аналитичком методом у пет кључних категорија: здравље, безбедност, животна средина, отпад и енергија. Као што је приказано на слици 12, пентаграмски приказ показао је претежно зелен профил, што указује на низак ризик у већини процењиваних категорија. Овакав резултат потврђује да развијена RP-HPLC метода има повољан еколошки и безбедносни профил, као и да доприноси смањењу укупног еколошког отиска аналитичке процедуре.



Слика 12. AGP пентаграми за три објављене методе (а, б и ц) (41,43,44) и предложену методу (д).

Процена здравственог ризика обухватила је потенцијалне акутне и хроничне ефекте изложености аналитичким реагенсима, при чему је релативно повољан токсиколошки профил употребљених компоненти мобилне фазе допринео зеленој оцени. У оквиру процене безбедности разматрани су ризици повезани са запаљивошћу и могућом изложеношћу ацетонитрилу. Иако ацетонитрил представља органски растварач са одређеним безбедносним ризицима, његова употреба у релативно малим количинама допринела је прихватљивом укупном профилу методе. Процена утицаја на животну средину узела је у обзир потенцијалну постојаност и биоакumulацију примењених реагенаса, при чему употреба фосфатног пуфера и ограничене количине органског растварача подржавају повољну оцену методе.

AGP процена је такође показала да су ризици повезани са настанком отпада и потрошњом енергије сведени на прихватљив ниво. Иако се током HPLC анализе неизбежно генерише течни хемијски отпад, количина отпада је ограничена оптимизованим саставом мобилне фазе и рационалном потрошњом растварача. Са аспекта енергетске потрошње, метода је оцењена као прихватљива за рутинску лабораторијску примену, посебно у поређењу са сложенијим и енергетски захтевнијим аналитичким техникама. У целини, повољна AGP оцена потврђује да развијена метода представља безбеднији и еколошки прихватљивији аналитички приступ, у складу са принципима зелене аналитичке хемије и одрживе фармацеутске анализе (48).

4.3.5 Компаративна анализа еколошке прихватљивости методе

Свеобухватна процена еколошке прихватљивости развијене RP-HPLC методе, спроведена применом NEMI, Analytical Eco-Scale, GAPI и AGP приступа, показала је да новоразвијена метода има повољнији еколошки профил у односу на претходно објављене методе за испитивање сличних антихипертензивних лекова и њихових комбинација. Ова предност постигнута је пажљивим избором компоненти мобилне фазе, смањењем удела органског растварача, рационализацијом потрошње реагенаса, скраћењем времена анализе и систематским приступом развоју методе заснованим на AQbD принципима. На тај начин је добијена метода која истовремено испуњава захтеве аналитичке поузданости, робусности, ефикасности и еколошке одговорности.

Упоредна анализа са литературно доступним подацима за HPLC методе показала је да се код традиционалних поступака за анализу антихипертензивних лекова често користе већи удели органских растварача, најчешће у опсегу од 50% до 70% ацетонитрила или метанола. Насупрот томе, оптимизована метода развијена у оквиру ове дисертације користи 34% ацетонитрила, уз повећан удео водене фазе, што представља значајно смањење потрошње органског растварача. Ово смањење има важан еколошки и економски значај, посебно у лабораторијама у којима се свакодневно изводи велики број анализа. Мања потрошња ацетонитрила директно доводи до смањења количине органског отпада који захтева посебне поступке сакупљања, складиштења и одлагања, као и до смањења укупног утицаја производње, транспорта и третмана растварача на животну средину (30,67,68).

Поред смањене потрошње органског растварача, развијена метода избегава примену проблематичних реагенаса који се могу срести у појединим конвенционалним HPLC методама, као што су средства за јонско упаривање, халогеновани растварачи, испарљива органска једињења или сложени пуферски системи. Уместо тога, метода користи једноставан фосфатни пуфер и минимално потребну количину ацетонитрила, чиме се смањују токсиколошки ризици, утицај на животну средину и трошкови аналитичког поступка. Елиминација средстава за јонско упаривање је посебно значајна, јер ова једињења могу

отежати третман отпадних вода и представљати додатно еколошко оптерећење. Истовремено, употреба једноставнијег пуферског система није нарушила хроматографске перформансе методе, већ је омогућила адекватно раздвајање свих испитиваних једињења у кратком времену анализе (69).

Енергетска ефикасност методе такође представља важан аспект њене еколошке прихватљивости. Оптимизовани хроматографски услови омогућили су краће време анализе, што директно смањује потрошњу енергије током рада инструмента. Поред тога, доказана робусност методе доприноси енергетској и ресурсној ефикасности, јер смањује вероватноћу понављања анализа услед неиспуњавања критеријума системске погодности или добијања резултата ван спецификације. На тај начин се избегава непотребна потрошња мобилне фазе, узорака, времена рада инструмента и енергије (70).

У целини, резултати процене еколошке прихватљивости потврђују да је интеграција принципа зелене аналитичке хемије већ у раним фазама развоја методе омогућила добијање аналитичког поступка који је не само робустан, селективан и ефикасан, већ и еколошки прихватљивији у односу на велики број претходно описаних метода. Развијена RP-HPLC метода стога представља пример одрживијег приступа фармацеутској анализи фиксних комбинација доза, јер успешно повезује захтеве савремене контроле квалитета са принципима смањења потрошње растварача, генерисања отпада, токсичности реагенса и енергетског оптерећења аналитичког процеса.

4.3.6 Допринос одрживој фармацеутској анализи

Успешан развој ове зелене RP-HPLC методе представља значајан допринос области одрживе фармацеутске анализе, демонстрирајући да се еколошка разматрања могу успешно интегрисати у развој аналитичке методе без угрожавања аналитичких перформанси. Ово достигнуће пружа практичан пример за шире усвајање ГАС принципа у фармацеутским лабораторијама широм света. Одличне аналитичке перформансе методе у комбинацији са њеним супериорним еколошким профилем чине је практичном опцијом за фармацеутске лабораторије које желе да побољшају еколошку одрживост, уз одржавање аналитичких перформанси и усклађеност са прописима. Свеобухватни подаци о валидацији и процена еколошке прихватљивости пружају документацију неопходну за регулаторно подношење и трансфер метода у уговорне лабораторије.

Економске користи повезане са смањеном потрошњом растварача и стварањем отпада пружају додатне подстицаје за усвајање методе. Уштеде трошкова од смањене куповине реагенса и накнада за одлагање отпада могу бити значајне, посебно за лабораторије које обављају велики број анализа. Ове економске користи, у комбинацији са еколошким предностима, стварају убедљив пословни случај за усвајање зелених аналитичких метода.

Растући фокус на еколошку одрживост у фармацеутској производњи и контроли квалитета огледа се у еволуирајућим регулаторним очекивањима. Еколошка одрживост постаје све релевантнија у регулаторним и индустријским дискусијама које се тичу фармацеутског развоја и контроле квалитета, чинећи зелене аналитичке методе све важнијим за усклађеност са прописима. Свеобухватна документација о користима за животну средину, која је дата у овом истраживању, подржава регулаторне поднеске и демонстрира корпоративну еколошку одговорност.

Усклађеност методе са ИСН смерницама за валидацију аналитичких метода осигурава да њено усвајање неће угрозити усклађеност са прописима или квалитет производа. Ова комбинација

усклађености са прописима и еколошке одрживости представља идеалан исход за модерну фармацеутску анализу, истовремено се бавећи и квалитетом и еколошким проблемима.

4.4 Резултати и дискусија студије кинетике деградације

Свеобухватне студије кинетике деградације периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида, како појединачно, тако и у готовом производу, пружиле су кључне увиде у њихове профиле стабилности под различитим условима, користећи разне агенсе стреса. Ови налази, кључни су за разумевање изазова у формулисању стабилних КФД производа.

4.4.1 Испитивање стабилности лека под различитим стресним условима

Хидролитичка деградација:

- Кисела хидролиза: Студије киселе хидролизе, спроведене у 1М НСl (рН 0,52), показале су да ниже концентрације киселине (0,1М и 0,01М) нису успеле да изазову значајну деградацију ПЕР и ИНД у року од 72 сата. Ово указује на релативно високу стабилност ових лекова под умерено киселим условима. АМЛ је, међутим, показао осетљивост на киселу хидролизу са значајним процентом деградације ($27,32 \pm 0,97$ % након 72 сата, Табела 7), што може бити повезано са трансформацијама функционалних група присутних у АМЛ катализованом киселином.

Константе брзине разградње приказане у Табели 7, 8, 9, 10 и 11 добијене су из нагиба одговарајућих кинетичких графика. За сваки услов разградње, процењени су кинетички модели нултог, првог и другог реда, а изабран је модел са највећом вредношћу R^2 и најбољим линеарним поклапањем. Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања за киселу хидролизу приказани су у Прилогу 1 Слика П1-П7.

Табела 7. Проценат разградње и одговарајући кинетички параметри (ред реакције (n), константа брзине реакције (k), време полуразградње ($t_{1/2}$) и рок трајања (t_{90})) за ПЕР, АМЛ и ИНД (појединачно, и у бинарним и тернарним смешама) под киселим условима (1М НСl).

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН*				
Време узорковања (h)	ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД	ПЕР+АМЛ+ИНД
0	0	0	0	0
0,5	$0,01 \pm 0,007^*$	$0,74 \pm 0,12$	$0,24 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,10$
1	$0,18 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,16$	$0,54 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,03$
24	$0,37 \pm 0,03$	$1,31 \pm 0,13$	$0,76 \pm 0,23$	$1,86 \pm 0,14$
48	$0,87 \pm 0,07$	$10,80 \pm 0,20$	$0,86 \pm 0,02$	$3,00 \pm 0,05$
72	$0,93 \pm 0,09$	$14,53 \pm 0,48$	$1,30 \pm 0,15$	$3,16 \pm 0,10$
n	II	II	II	II
k (mM ⁻¹ h ⁻¹)	0,0006	0,0098	0,0007	0,0019
$t_{1/2}$ (h)	7572,10	434,38	6945,15	2394,29
t_{90} (h)	840,50	48,22	770,91	265,77
АМЛОДИПИН БЕСИЛАТ*				
Време узорковања (h)	АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД

0	0	0	0	0
0,5	2,54 ± 0,16	2,80 ± 0,19	0,72 ± 0,11	2,09 ± 0,08
1	2,76 ± 0,09	3,25 ± 0,20	3,13 ± 0,03	2,96 ± 0,14
24	11,85 ± 0,30	11,93 ± 0,62	14,34 ± 0,89	31,31 ± 1,18
48	20,78 ± 0,81	23,05 ± 1,51	27,66 ± 1,11	48,35 ± 2,18
72	27,32 ± 0,97	28,75 ± 1,26	39,77 ± 1,10	57,18 ± 0,21
n	II	II	II	II
k (mM⁻¹h⁻¹)	0,0295	0,0301	0,0501	0,1055
t_{1/2} (h)	196,80	193,15	117,39	53,92
t₉₀ (h)	21,84	20,41	13,03	5,99
ИНДАПАМИД*				
Време узорковања (h)	ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
0	0	0	0	0
0,5	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,01 ± 0,005	0,09 ± 0,02
1	0,13 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,14 ± 0,03
24	0,28 ± 0,06	0,15 ± 0,06	0,10 ± 0,03	7,19 ± 0,75
48	0,54 ± 0,03	0,18 ± 0,07	1,49 ± 0,06	12,60 ± 0,42
72	0,82 ± 0,06	0,21 ± 0,04	1,86 ± 0,08	15,48 ± 0,55
n	II	II	II	II
k (mM⁻¹h⁻¹)	0,0002	0,00009	0,001	0,0097
t_{1/2} (h)	17844,12	43047,10	3779,39	376,70
t₉₀ (h)	1980,70	4778,23	419,51	41,81

* Проценат разградње је дат као средња вредност ± стандардна девијација мерења извршених у трипликату

- Базна хидролиза: У базним условима (0,001 М NaOH; pH 11,01), АМЛ је био подложен највећем степену деградације, као најосетљивије једињење на овај стресни агенс, док је ПЕР показао умерену разградњу, а ИНД је остао релативно стабилан (Табела 8). Након 72 сата, ПЕР је показао 11,37 ± 0,08 % деградације, док се АМЛ највише деградирало 35,72 ± 0,18 %, а ИНД је показао минималну деградацију 2,34 ± 0,20 % у овим условима. Ово истиче посебну осетљивост ПЕР и АМЛ на базну средину.

Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања за базну хидролизу приказани су у Прилогу 1 Слика П8-П14.

Табела 8. Проценат разградње и одговарајући кинетички параметри (ред реакције (n), константа брзине реакције (k), време полуразградње (t_{1/2}) и рок трајања (t₉₀)) за ПЕР, АМЛ и ИНД (појединачно, и у бинарним и тернарним смешама) под базним условима (0,001 М NaOH).

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН*				
Време узорковања (h)	ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД	ПЕР+АМЛ+ИНД
0	0	0	0	0
0,5	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,10
1	1,04 ± 0,01	0,22 ± 0,07	0,06 ± 0,03	0,26 ± 0,07
24	5,17 ± 0,02	2,96 ± 0,01	1,15 ± 0,14	1,44 ± 0,08
48	8,93 ± 0,02	6,89 ± 0,11	3,46 ± 0,09	2,53 ± 0,13
72	11,37 ± 0,08	10,41 ± 0,09	4,58 ± 0,08	4,03 ± 0,05
n	II	II	II	II
k (mM⁻¹h⁻¹)	0,0078	0,0065	0,0027	0,0023
t_{1/2} (h)	561,91	630,44	1460,85	1803,46

t₉₀ (h)	62,37	69,98	162,15	200,18
АМЛОДИПИН БЕСИЛАТ*				
Време узорковања (h)	АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД
0	0	0	0	0
0,5	1,69 ± 0,07	0,76 ± 0,05	0,65 ± 0,11	0,83 ± 0,05
1	3,27 ± 0,03	1,49 ± 0,06	2,42 ± 0,14	1,64 ± 0,05
24	17,36 ± 0,64	12,37 ± 0,65	11,29 ± 0,15	9,50 ± 0,51
48	27,60 ± 0,51	19,58 ± 0,43	19,59 ± 0,50	14,69 ± 0,35
72	35,72 ± 0,18	26,94 ± 0,95	26,82 ± 0,39	20,53 ± 0,66
n	II	II	II	II
k (mM⁻¹h⁻¹)	0,043	0,0286	0,0275	0,019
t_{1/2} (h)	131,89	198,87	200,94	282,25
t₉₀ (h)	14,64	22,07	22,30	31,33
ИНДАПАМИД*				
Време узорковања (h)	ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
0	0	0	0	0
0,5	0,28 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,03 ± 0,01	0,46 ± 0,09
1	0,32 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,14 ± 0,08	0,60 ± 0,04
24	0,85 ± 0,07	0,93 ± 0,16	0,26 ± 0,04	1,21 ± 0,12
48	1,52 ± 0,03	1,28 ± 0,04	1,05 ± 0,24	1,51 ± 0,05
72	2,34 ± 0,20	1,70 ± 0,16	1,43 ± 0,14	1,53 ± 0,03
n	II	II	II	II
k (mM⁻¹h⁻¹)	0,0012	0,0009	0,0008	0,0008
t_{1/2} (h)	3243,23	4343,95	4879,55	4854,71
t₉₀ (h)	92,50	482,18	541,63	538,88

* Проценат разградње је дат као средња вредност ± стандардна девијација мерења извршених у трипликату

- Неутрална хидролиза: Неутрална хидролиза свих испитиваних узорак је била генерално мање изражена од киселе или базне хидролизе; међутим, у неким смешама (нпр. ИНД + АМЛ), разградња се повећала, што указује на ефекте зависне од интеракције чак и при скоро неутралној рН вредности раствора (Табела 9), што указује да су екстремне рН вредности примарни покретачи хидролитичке деградације ових једињења.

Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања за неутралну хидролизу приказани су у Прилогу 1 Слика П15-П21.

Табела 9. Проценат разградње и одговарајући кинетички параметри (ред реакције (n), константа брзине реакције (k), време полуразградње (t_{1/2}) и рок трајања (t₉₀)) за ПЕР, АМЛ и ИНД (појединачно, и у бинарним и тернарним смешама) под неутралним условима.

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН*				
Време узорковања (h)	ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД	ПЕР+АМЛ+ИНД
0	0	0	0,00	0
0,5	0,01 ± 0,006	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,28 ± 0,03
1	0,13 ± 0,05	0,15 ± 0,06	0,17 ± 0,07	0,55 ± 0,03
24	0,39 ± 0,10	0,21 ± 0,06	0,30 ± 0,05	0,82 ± 0,09
48	0,52 ± 0,12	7,41 ± 0,41	0,41 ± 0,08	1,05 ± 0,07
72	0,72 ± 0,12	7,64 ± 0,31	0,72 ± 0,03	1,13 ± 0,09

n	II	II	II	II
k (mM ⁻¹ h ⁻¹)	0,0004	0,0055	0,0002	0,0004
t _{1/2} (h)	10786,97	788,54	21131,51	10950,41
t ₉₀ (h)	1197,35	87,33	2345,60	1215,50
АМЛОДИПИН БЕСИЛАТ*				
Време узорковања (h)	АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД
0	0	0	0	0
0,5	1,05 ± 0,06	0,30 ± 0,05	0,45 ± 0,13	0,74 ± 0,08
1	1,15 ± 0,07	0,36 ± 0,08	0,65 ± 0,02	1,29 ± 0,06
24	1,42 ± 0,15	0,75 ± 0,09	1,66 ± 0,11	7,67 ± 0,39
48	1,49 ± 0,21	7,17 ± 0,70	12,21 ± 0,12	11,20 ± 0,81
72	1,91 ± 0,12	9,81 ± 0,24	13,09 ± 0,36	14,68 ± 0,36
n	0	0	0	0
k (mM h ⁻¹)	0,00002	0,0002	0,0002	0,0003
t _{1/2} (h)	4393,31	445,02	238,62	286,11
t ₉₀ (h)	878,62	89,00	47,72	57,22
ИНДАПАМИД*				
Време узорковања (h)	ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
0	0	0	0	0
0,5	0,01 ± 0,001	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,18 ± 0,09
1	0,06 ± 0,03	0,15 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,05
24	0,12 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,50 ± 0,10
48	0,16 ± 0,05	0,35 ± 0,02	2,38 ± 0,40	1,23 ± 0,70
72	0,25 ± 0,06	0,42 ± 0,01	2,51 ± 0,48	2,86 ± 0,12
n	II	II	II	II
k	0,0001 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0002 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0014 mM ⁻¹ h ⁻¹	0,0013 mM ⁻¹ h ⁻¹
t _{1/2} (h)	36043,88	17307,17	2550,09	2867,59
t ₉₀ (h)	4000,87	1921,10	283,06	318,30

* Проценат разградње је дат као средња вредност ± стандардна девијација мерења извршених у трипликату

Фотолитичка деградација (Табела 10):

- Индапамид је показао екстремну фотолизу, са деградацијом од 26,18% након 72 сата и најкраћи рок трајања под излагањем светлости (t₉₀ = 34,96 сати; Табела 10), што значи да је био веома подложен деградацији када је изложен светлости (дневној светлости и УВ зрачењу таласне дужине 320-400 nm). Ово откриће наглашава критичну потребу за заштитом индапамида од светлости током формулације, паковања и складиштења производа.

Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања за реакције фотолизе приказани су у Прилогу 1 Слика П22-П28.

Табела 10. Проценат разградње и одговарајући кинетички параметри (ред реакције (n), константа брзине реакције (k), време полуразградње (t_{1/2}) и рок трајања (t₉₀)) за ПЕР, АМЛ и ИНД (појединачно, и у бинарним и тернарним смешама) изазвани видљивом и UV светлошћу.

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН*				
Време узорковања (h)	ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД	ПЕР+АМЛ+ИНД
0	0	0	0	0

0,5	0,01 ± 0,005	0,14 ± 0,05	0,01 ± 0,005	0,02 ± 0,006
1	0,09 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,11 ± 0,03
24	0,32 ± 0,08	0,23 ± 0,06	0,54 ± 0,16	0,70 ± 0,08
48	0,42 ± 0,08	0,32 ± 0,07	0,81 ± 0,04	1,39 ± 0,05
72	0,58 ± 0,12	0,81 ± 0,19	1,68 ± 0,21	6,83 ± 0,10
n	0	0	0	0
k (mM h⁻¹)	0,00002	0,00002	0,00005	0,0002
t_{1/2} (h)	6275,00	6240,07	2473,44	634,15
t₉₀ (h)	1207,30	1248,01	494,69	126,83
АМЛОДИПИН БЕСИЛАТ*				
Време узорковања (h)	АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД
0	0	0	0	0
0,5	0,10 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,02 ± 0,015	0,01 ± 0,003
1	0,12 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,03 ± 0,015	0,07 ± 0,02
24	0,19 ± 0,05	0,25 ± 0,08	1,54 ± 0,19	2,23 ± 0,09
48	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,04	3,76 ± 0,25	7,55 ± 0,40
72	0,50 ± 0,11	0,52 ± 0,05	7,90 ± 0,14	13,84 ± 0,16
n	0	0	0	0
k (mM h⁻¹)	0,00001	0,000009	0,0002	0,0003
t_{1/2} (h)	8360,54	9180,00	418,46	287,62
t₉₀ (h)	1672,11	1836,00	83,69	57,52
ИНДАПАМИД*				
Време узорковања (h)	ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
0	0	0	0	0
0,5	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,003	0,02 ± 0,01
1	0,39 ± 0,17	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,05 ± 0,02
24	0,50 ± 0,05	0,39 ± 0,05	1,05 ± 0,09	0,37 ± 0,20
48	7,14 ± 0,43	7,94 ± 0,39	1,69 ± 0,10	0,76 ± 0,22
72	26,18 ± 0,40	27,54 ± 0,59	4,45 ± 0,34	1,50 ± 0,15
n	0	0	0	0
k (mM h⁻¹)	0,0008	0,0009	0,0001	0,00005
t_{1/2} (h)	174,79	144,10	1315,21	2717,94
t₉₀ (h)	34,96	28,82	263,04	543,59

* Проценат разградње је дат као средња вредност ± стандардна девијација мерења извршених у трипликату

Оксидативна деградација (Табела 11):

- Утврђено је да је амлодипин највише погођен оксидативним условима (раствор водоник-пероксида). Познато је да је његов дихидропиридински прстен склон оксидацији. Ово истиче важност смањења изложености кисеонику (нпр. паковање непропусно за кисеоник, инертни простор изнад течности, антиоксидативне стратегије) током производње и складиштења.

Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања за киселу хидролизу приказани су у Прилогу 1 Слика П29-П35.

Табела 11. Проценат разградње и одговарајући кинетички параметри (ред реакције (n), константа брзине реакције (k), време полуразградње (t_{1/2}) и рок трајања (t₉₀)) за ПЕР, АМЛ и ИНД (појединачно, и у бинарним и тернарним смешама) изазвани оксидацијом 3% раствором водоник-пероксида.

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН*				
Време узорковања (h)	ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД	ПЕР+АМЛ+ИНД
0	0	0	0	0
0,5	0,15 ± 0,04	2,92 ± 0,13	0,56 ± 0,04	0,39 ± 0,01
1	0,20 ± 0,04	2,96 ± 0,19	0,59 ± 0,20	0,65 ± 0,02
24	0,74 ± 0,16	3,50 ± 0,25	1,87 ± 0,13	0,69 ± 0,06
48	1,27 ± 0,12	8,20 ± 0,30	3,23 ± 0,16	1,59 ± 0,12
72	2,86 ± 0,14	9,78 ± 0,08	3,87 ± 0,14	2,65 ± 0,13
n	0	0	0	0
k (mM h ⁻¹)	0,00008	0,0003	0,0001	0,00007
t _{1/2} (h)	1451,27	402,87	1268,95	1689,27
t ₉₀ (h)	290,25	80,57	253,79	337,85
АМЛОДИПИН БЕСИЛАТ*				
Време узорковања (h)	АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД
0	0	0	0	0
0,5	0,40 ± 0,09	1,250,09	0,05 ± 0,03	0,05 ± 0,02
1	0,59 ± 0,01	1,60 ± 0,17	0,85 ± 0,15	0,33 ± 0,07
24	8,97 ± 0,58	7,05 ± 0,50	9,20 ± 0,52	4,80 ± 0,41
48	16,75 ± 0,27	14,04 ± 0,03	14,13 ± 0,24	10,20 ± 1,58
72	23,33 ± 2,20	19,81 ± 0,72	20,27 ± 1,20	14,72 ± 0,60
n	II	II	II	II
k (mM ⁻¹ h ⁻¹)	0,0238	0,0186	0,0386	0,0137
t _{1/2} (h)	238,03	302,56	290,79	424,32
t ₉₀ (h)	26,42	33,58	32,28	47,10
ИНДАПАМИД*				
Време узорковања (h)	ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
0	0	0	0	0
0,5	0	0,30 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,05 ± 0,02
1	0,16 ± 0,02	0,31 ± 0,08	0,18 ± 0,03	0,32 ± 0,11
24	1,05 ± 0,06	1,49 ± 0,10	0,78 ± 0,05	1,27 ± 0,09
48	1,85 ± 0,10	7,46 ± 0,11	1,27 ± 0,21	2,44 ± 0,44
72	2,38 ± 0,05	9,40 ± 0,05	1,49 ± 0,04	3,52 ± 0,49
n	II	II	II	II
k (mM ⁻¹ h ⁻¹)	0,0013	0,0065	0,0008	0,0018
t _{1/2} (h)	2777,76	554,54	4748,47	2095,57
t ₉₀ (h)	308,33	61,55	527,08	232,61

* Проценат разградње је дат као средња вредност ± стандардна девијација мерења извршених у трипликату

4.4.2 Профил стабилности периндоприл терц-бутиламина

Периндоприл терц-бутиламин је показао највећу осетљивост у базним хидролизним условима (0,001 М NaOH, pH 11,01), потврђујући базну хидролизу као његов доминантни пут разградње у тестираним стресним условима. Ово понашање је у складу са хемијском структуром периндоприла, који садржи естарске везе које су посебно осетљиве на нуклеофилни напад хидроксилних јона. Под базним условима, разградња ПЕР је пратила кинетику другог реда, са

константом брзине од $0,0078 \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ на собној температури (око 25°C), што одговара времену полураспада од $561,91 \text{ h}$ и року трајања од $62,37 \text{ h}$ (Табела 8).

Механизам базне хидролизе укључује нуклеофилни напад хидроксидних јона на естарски карбонилни угљеник, што доводи до стварања карбоксилатних и алкохолних производа. Овај пут разградње је добро документован за АЦЕ инхибиторе који садрже естре и представља важно питање стабилности формулација изложених алкалним срединама. Зависност разградње ПЕР-а од температуре под базним условима пратила је Аренијусово понашање, са енергијом активације од $50,33 \text{ kJ mol}^{-1}$, што указује на мерљиву зависност брзине разградње од температуре (71). Ово тумачење је поткрепљено повећањем константе брзине разградње са $0,0071$ (на 45°C) на $0,0219$ (на 65°C), заједно са одговарајућим смањењем $t_{1/2}$ и t_{90} . Позитивне вредности $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta G^\ddagger$ добијене за ПЕР под базним условима указују на присуство активационе баријере за разградњу, док негативне вредности $\Delta S^\ddagger$ сугеришу формирање уређенијег прелазног стања током процеса разградње (Табела 12).

У киселим условима (1 M HCl , $\text{pH } 0,52$), периндоприл је показао знатно већу стабилност, са само $0,93\%$ разградње након 72 сата на собној температури (Табела 7). Ова побољшана стабилност у киселим условима приписује се протонацији естарског кисеоника, што смањује његову подложност нуклеофилном нападу. Међутим, на повишеној температури (65°C), разградња катализована киселином постала је израженија, што указује да температура значајно убрзава нестабилност ПЕР чак и у киселој средини. Овај тренд је у складу са повећањем k од $0,0035$ (на 45°C) до $0,0119$ (на 65°C) за ПЕР у киселим условима (Табела 13).

Оксидативно тестирање под пријављеним условима од $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ показало је умерену осетљивост ПЕР-а, са деградацијом од $2,86\%$ након 72 сата (Табела 11). Оксидативна деградација периндоприла вероватно укључује секундарну амино групу и систем индолног прстена, који су подложни оксидативном нападу реактивних врста кисеоника. Секундарни амин може подлећи N-оксидацији или оксидативној деалкилацији, док је индолни прстен склон оксидативном цепању или хидроксилацији, што доводи до стварања различитих производа деградације (72).

Студије фотостабилности показале су да је ПЕР релативно стабилан под примењеним условима излагања светлости, са само $0,58\%$ деградације након 72 сата (Табела 10). Ова стабилност се приписује одсуству проширених коњугованих система или фотолабилних функционалних група у структури периндоприла. Међутим, присуство индолског прстенастог система може допринети извесној фотосензитивности под екстремним условима (73).

4.4.3 Профил стабилности амлодипин бесилата

Амлодипин бесилат је показао значајну подложност и базној хидролизи и оксидативној деградацији, што одражава инхерентну нестабилност дихидропиридинског прстенастог система под овим условима. Под базним условима ($0,001 \text{ M NaOH}$), АМЛ је показао брзу разградњу пратећи кинетику другог реда, са константом брзине од $0,0430 \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ на собној температури, што одговара полуживоту од $131,89 \text{ h}$ и року трајања од $14,64 \text{ h}$ (Табела 8).

Деградација АМЛ изазвана базама вероватно укључује вишеструке путеве, укључујући хидролизу естра и оксидацију дихидропиридинског прстена до одговарајућег деривата пиридина. Дихидропиридински прстен је посебно подложен оксидацији у алкалним условима, где двоструке везе богате електронима могу бити лако нападнуте нуклеофилима и оксидирајућим врстама. Овај пут разградње је добро документован за блокаторе калцијумових канала класе дихидропиридина и представља велики изазов за формулацију (74).

Оксидативно тестирање под условима од 3% H_2O_2 показало је да је АМЛ био најосетљивији на оксидацију од сва три АФС-а, са деградацијом од 23,33% након 72 сата (Табела 11). Примарно место оксидације је дихидропиридински прстен, који лако подлеже оксидацији и формира одговарајући дериват пиридина. Ова оксидација је праћена променама у фармаколошкој активности, јер је дихидропиридинска структура неопходна за блокирање калцијумових канала (75). Оксидативна деградација АМЛ вероватно се одвија кроз више путева усмерених на дихидропиридински прстен.

У киселим условима, АМЛ је показао значајну разградњу, са 27,32% разградње након 72 сата у 1М HCl на собној температури (Табела 7). Разградња катализована киселином вероватно укључује протонацију амино групе након чега следе интрамолекуларне реакције циклизације које могу довести до стварања различитих производа разградње. Зависност разградње киселином од температуре прати Аренијусову кинетику са енергијом активације од 28,93 kJ/mol (76). Као и у случају ПЕР позитивне вредности $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta G^\ddagger$ добијене за АМЛ указују на присуство активационе баријере за разградњу, док негативне вредности $\Delta S^\ddagger$ сугеришу формирање уређенијег прелазног стања током процеса разградње (Табела 13).

Студије фотостабилности показале су да је АМЛ релативно стабилан када се тестира појединачно под примењеним условима излагања светлости, са само 0,50% деградације након 72 сата (Табела 10). Фотодеградација се приписује присуству дихидропиридинског хромофора, који може да апсорбује УВ светлост и да подлеже фотохемијским реакцијама које доводе до отварања прстена и појаве нових производа разградње (74).

4.4.4 Профил стабилности индапамида

ИНД је показао јединствен профил стабилности који карактерише највећа фотосензитивност међу три АФС-а, у комбинацији са релативно добром стабилношћу под већином осталих тестираних услова стреса. Фотодеградација ИНД-а била је најизраженија међу три АФС-а, са 26,18% деградације примећене након 72 сата под примењеним условима излагања светлости. Ова екстремна фотосензитивност се приписује присуству индолског прстенастог система, који садржи хромофорне групе које лако апсорбују УВ светлост (77).

Механизам фотодеградације индапамида укључује апсорпцију УВ светлости од стране индолског хромофора, што доводи до формирања побуђених стања која могу да прођу кроз различите фотохемијске реакције. Ове реакције укључују отварање прстена, преуређење и процесе оксидације који резултирају формирањем вишеструких производа разградње. Фотодеградација прати кинетику нултог реда под константном изложеношћу светлости, што указује да је брзина реакције ограничена интензитетом светлости, а не концентрацијом лека (78).

У базним условима (0,001 М NaOH), ИНД је показао највећу стабилност међу три АФС-а, са само 2,34% разградње након 72 сата на собној температури. Базна разградња укључује хидролизу сулфонамидне групе и могуће реакције отварања прстена. Разградња ИНД је пратила кинетику другог реда, са константом брзине од $0,0012 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, временом полураспада ($t_{1/2}$) од 3243,23 h и роком трајања (t_{90}) од 92,50 h (77).

Студије киселинске стабилности показале су да је ИНД остао веома стабилан у 1 М HCl , са само 0,82% разградње након 72 сата на собној температури. Ова стабилност се приписује протонацији базних атома азота у молекулу, што стабилизује структуру од хидролитичког напада. Међутим, на повишеним температурама, разградња катализована киселином постаје значајнија (77,78).

Тестирање оксидативне стабилности под условима од 3% H_2O_2 показало је да ИНД има релативно добру оксидативну стабилност, са разградњом од 2,38% након 72 сата. Оксидација вероватно укључује атом сумпора у сулфонамидној групи и могуће атоме азота у систему индолског прстена. Оксидативна разградња прати кинетику другог реда.

4.4.5 Утицај интеракције између лекова на стабилност

Један од најзначајнијих доприноса овог истраживања представља детаљно испитивање интеракција између лекова у бинарним и тернарним смешама ПЕР, АМЛ и ИНД под различитим условима стреса. Добијени резултати показали су да су односи стабилности у овим системима сложени и изразито зависни од природе стресног услова, при чему коформулисане активне фармацеутске супстанце могу испољити стабилизујуће или дестабилизујуће ефекте у зависности од средине у којој се одвија разградња. Посебно је важно истаћи да уочени ефекти нису били једнозначно заштитни или дестабилизујући, већ су се значајно разликовали у зависности од рН вредности, изложености светлости, оксидативних услова и специфичног састава бинарне или тернарне смеше. Овакви резултати имају значајне импликације за развој и дизајн формулација фиксних комбинација доза, јер указују на то да присуство једне активне фармацеутске супстанце може утицати на стабилност друге, било кроз промену кинетике разградње, модификацију деградационог пута или потенцијалне међусобне интеракције у систему (79).

4.4.5.1 ПЕР-АМЛ бинарне интеракције

Бинарна интеракција између периндоприл терц-бутиламина (ПЕР) и амлодипин бесилата (АМЛ) је веома динамична, при чему два лека имају и стабилизујуће и дестабилизујуће ефекте један на други у зависности од стресора из околине.

У базним условима (0,001 М NaOH), периндоприл и амлодипин показују корисну синергистичку интеракцију (Табеле 8,12). Присуство амлодипина значајно успорава разградњу периндоприла. Константа брзине другог реда се смањује са $0,0078 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ (индивидуална) на $0,0065 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ (бинарна), што резултира смањењем брзине разградње за 16,7% и продужавањем рока трајања са 62,37 h на 69,98 h. Периндоприл пружа још јачи стабилизујући ефекат на амлодипин. Константа брзине за амлодипин пада са $0,043 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ на $0,0286 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, што представља смањење брзине разградње за 33,5% и повећање рока трајања са 14,64 h на 22,07 h. Ова реципрочна стабилизација сугерише да, у базном окружењу, лекови могу да се такмиче за доступне хидроксидне јоне или да формирају молекуларни комплекс који штити њихове одговарајуће лабилне естарске групе од нуклеофилног напада (77).

Механизам ове стабилизујуће интеракције вероватно укључује промене у локалном реакционом окружењу или пролазне интермолекуларне интеракције које смањују доступност функционалних група склони хидролизи. Такви интеракцијски ефекти су релевантни за формулацију јер показују да се стабилност једног АПИ не може предвидети независно од осталих компоненти присутних у систему (80).

У киселој средини (1 М HCl), интеракција постаје антагонистичка, при чему оба лека негативно утичу на међусобну стабилност (Табеле 7,13). Амлодипин драматично убрзава киселином катализовану разградњу периндоприла. Константа брзине се повећава од $0,0006 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ до $0,0098 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, што представља повећање брзине разградње од 16,3 пута. Ово доводи до озбиљног смањења рока трајања периндоприла са 840,50 сати на само 48,22 сата. Ефекат периндоприла на амлодипин је такође негативан, мада мање изражен, са константом

брзине која се благо повећава од $0,0295 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ до $0,0301 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ови резултати указују да су киселе средине, или чак употреба ексципијенаса који могу да утичу на снижење рН вредности, посебно неповољне за комбинацију ПЕР-АМЛ и да их треба избегавати током формулације и складиштења кад год је то могуће, или наћи рјешење у погледу најадекватније формулације готовог производа (вишеслојно облагање сваке АПИ или израда нпр. двослојних таблета гдје се у једном слоју налази ПЕР, а у другом АМЛ).

Изражена антагонистичка интеракција примећена између периндоприла и амлодипина у киселим условима (1 М НСl), коју карактерише 16,30 пута веће убрзање брзине разградње периндоприла, може се механистички приписати каталитичком утицају сопствених производа разградње амлодипина и специфичном хемијском окружењу које ствара његова протонирана структура. Како амлодипин подлеже киселински катализованом хидролизи својих естарских група, он генерише деривате карбоксилне киселине и нечистоће на бази пиридина које могу деловати као секундарни катализатори, олакшавајући протонацију естарског карбонила периндоприла и смањујући енергију активације за његову хидролизу. Ова синергистичка комбинација ко-катализе путем међупроизвода разградње и стабилизације прелазног стања протонисаним амином, ефикасно преноси протоне ка лабилној естарској вези периндоприла ефикасније него код обичног растварача, што доводи до драстичног смањења његовог рока трајања у бинарној смеси.

У неутралним условима (вода HPLC квалитета), интеракција остаје негативна за оба лека. Амлодипин има значајан негативан ефекат на стабилност периндоприла, са константом брзине која се повећава од $0,0004 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ до $0,0055 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, смањујући рок трајања са 1197,35 h на 87,33 h (Табеле 9,14). Слично томе, периндоприл негативно утиче на амлодипин, са константом брзине нултог реда која се повећава од $0,00002 \text{ mMh}^{-1}$ до $0,0002 \text{ mMh}^{-1}$, што доводи до 10 пута мањег рока трајања (са 878,62 h на 89,00 h).

Под оксидативним стресом (3% H_2O_2), лекови показују различите ефекте. Амлодипин има негативан ефекат на периндоприл, са константом брзине нултог реда која расте од $0,00008 \text{ mMh}^{-1}$ до $0,0003 \text{ mMh}^{-1}$, смањујући рок трајања са 290,25 h на 80,57 h (Табела 11). Периндоприл пружа позитиван, стабилизујући ефекат на амлодипин. Константа брзине другог реда се смањује од $0,0238 \text{ mMh}^{-1}$ до $0,0186 \text{ mMh}^{-1}$, што представља смањење брзине разградње од 21,9%. Ова стабилизација се може приписати антиоксидативним својствима периндоприла, који може реаговати са оксидујућим врстама, чиме штити дихидропиридински прстен амлодипина.

При излагању видљивом и УВ светлу, интеракција је помешана (Табела 10). Амлодипин нема значајан утицај на фотостабилност периндоприла, док периндоприл пружа благи стабилизујући ефекат на амлодипин, при чему константа брзине нултог реда опада са $0,00001 \text{ mMh}^{-1}$ на $0,000009 \text{ mMh}^{-1}$, продужавајући рок трајања са 1672,11 h на 1836,00 h.

Збирно гледајући, ови резултати показују да је интеракција снажно зависна од средине у којој се испитивани лекови налазе: стабилизује се у алкалним и делимично, оксидативним условима, али се јасно дестабилизује у киселим и неутралним срединама.

4.4.5.2 ПЕР-ИНД бинарне интеракције

Комбинација периндоприл терц-бутиламина и индапамида показала је веома корисну синергистичку интеракцију под базним условима (0,001 М NaOH), где је индапамид обезбедио значајну стабилизацију молекула периндоприла (Табеле 8,12). Утврђено је да је константа брзине разградње другог реда за периндоприл у бинарној смеси износила $0,0027 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, што је значајно смањење у односу на $0,0078 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ примећено за периндоприл појединачно.

Ово представља значајно смањење стопе разградње од 65,4%, што истиче снажан заштитни утицај индапамида. Ова стабилизација је додатно потврђена повећањем израчунатог рока трајања од 2,6 пута, који је порастао са 62,37 сати на 162,15 сати у присуству индапамида. Такав изражен стабилизујући ефекат сугерише да ИНД модификује локално окружење за разградњу ПЕР под алкалним условима. Ови налази наглашавају предности стабилности комбинације фиксних доза, посебно у срединама где је контрола рН вредности средине изазовна. Индапамид такође има користи од присуства периндоприла. Његова константа брзине се смањује са $0,0012 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ на $0,0009 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, што резултује смањењем брзине разградње за 25% и повећањем рока трајања са 92,50 сати на 482,18 сати.

Механизам ове стабилизујуће интеракције може укључивати формирање водоничних веза између сулфонамидне групе индапамида и естарских група периндоприла. Ове интеракције смањују доступност естарских група нуклеофилном нападу, чиме се успорава реакција хидролизе. Поред тога, индапамид може деловати као хватач радикала, смањујући формирање реактивних врста које би могле убрзати разградњу периндоприла (81).

У киселој средини (1 М НСl), интеракција остаје позитивна, посебно за индапамид (Табеле 7 и 13). Индапамид има занемарљив утицај на стабилност периндоприла, са константом брзине која се благо повећава од $0,0006 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ до $0,0007 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$. Периндоприл пружа значајан стабилизујући ефекат на индапамид; константа брзине се смањује од $0,0002 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ до $0,00009 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, што представља смањење брзине разградње за 55% и више него удвостручује његов рок трајања од 1980,70 h до 4778,23 h.

У неутралним условима индапамид пружа стабилизујући ефекат на периндоприл, са константом брзине која се смањује са $0,0004 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ на $0,0002 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, удвостручујући његов рок трајања са 1197,35 h на 2345,60 h (Табеле 9,14). Насупрот томе, периндоприл има негативан ефекат на индапамид, са константом брзине која се повећава са $0,0001 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ на $0,0002 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, смањујући за 50% његов рок трајања са 4000,87 h на 1921,10 h.

Под оксидативним стресом (3% H_2O_2), интеракција је антагонистичка за оба лека. Индапамид негативно утиче на периндоприл, са константом брзине нултог реда која расте од $0,00008 \text{ mMh}^{-1}$ до $0,0001 \text{ mMh}^{-1}$ (Табела 11). Периндоприл има изражен дестабилизујући ефекат на стабилност индапамида. Константа брзине расте од $0,0013 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$ до $0,0065 \text{ mM}^{-1}\text{h}^{-1}$, што представља петоструко повећање брзине разградње и смањење рока трајања са 308,33 h на 61,55 h.

Може се закључити да индапамид благо негативно утиче на фотостабилност периндоприла, док фотостабилност индапамида се не мења у присуству периндоприла (Табела 10). Ово указује да ПЕР не пружа значајну фотозаштиту за ИНД, који остаје најфотосензитивнији од три АФС-а под примењеним условима излагања светлости.

Генерално, бинарни систем ПЕР-ИНД показао је претежно стабилизујуће понашање под хидролитичким стресом, али је ова корисна интеракција изгубљена под оксидативним и фотолитичким условима.

4.4.5.3 АМЛ-ИНД бинарне интеракције

Бинарна комбинација амлодипин бесилата и индапамида открила је сложен и од околине зависан профил стабилности, који карактерише и синергистичка стабилизација и антагонистичко убрзање у различитим условима стреса.

Под базним условима (0,001 М NaOH), примећена је значајна реципрочна стабилизација, при чему се константа брзине разградње другог реда амлодипина смањила за 36,0 % (са 0,043 на

0,0275 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$) и константа брзине разградње индапамида се смањила за 33,3 % (са 0,0012 на 0,0008 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$) (Табеле 8 и 12). Ова синергија се вероватно приписује пуферском капацитету сулфонамидне групе индапамида и потенцијалним интермолекуларним интеракцијама које штите лабилне естарске групе амлодипина од нуклеофилног напада (82).

Насупрот томе, кисели (1 М HCl) и неутрални услови су се показали веома антагонистичким, при чему је амлодипин убрзао разградњу индапамида за 5 и 14 пута, респективно, док је индапамид повећао брзину киселе разградње амлодипина за 69,8% (Табеле 7 и 13). Ови резултати указују на јаку међусобну дестабилизацију у киселим и неутралним срединама, што сугерише да сваки АПИ мења локално хемијско окружење на начин који подстиче разградњу другог.

Под оксидативним стресом (3% H_2O_2), амлодипин је пружио користан стабилизујући ефекат на индапамид, смањујући његову брзину разградње за 38,5% (са 0,0013 на 0,0008 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$), вероватно делујући као жртвена мета за реактивне врсте кисеоника (Табела 11) (82).

Најзначајније је да је амлодипин пружио изузетну заштиту индапамиду под фотолитичким условима, постижући смањење стопе фотодеградације за 87,5% (са 0,0008 на 0,0001 mMh^{-1}) кроз значајан ефекат заштите од светлости, где дихидропиридин хромофор амлодипина делује као унутрашњи УВ филтер (Табела 10). Овај ефекат се такође одразио у израженом повећању ИНД t_{90} под фотолитичким стресом, са 34,96 h на 263,04 h у присуству АМЛ.

Ови налази показују да, иако комбинација АМЛ-ИНД нуди значајне предности стабилности у базним и фотолитичким срединама, суочава се са значајним изазовима компатибилности у киселим и неутралним срединама који се морају решити рационалним стратегијама формулације.

4.4.5.4 ПЕР-АМЛ-ИНД тернарне интеракције

Тернарна смеша је открила веома сложену равнотежу стабилизујућих и дестабилизујућих ефеката, при чему је укупни исход снажно зависио од примењених услова стреса. Ова сложена равнотежа наглашава важност студија стабилности мултикомпонентних смеша лекова за рационалан дизајн формулације.

Под базним условима (0,001 М NaOH), тернарна смеша је показала изузетну синергистичку стабилизацију за све три компоненте, превазилазећи многе бинарне интеракције (Табеле 8,12). Периндоприл је показао смањење брзине разградње од 70,5% (са 0,0078 на 0,0023 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$), амлодипин је доживео смањење од 55,8% (са 0,043 на 0,019 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$), а индапамид је показао смањење од 33,3% (са 0,0012 на 0,0008 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$). Ова побољшана стабилизација указује на комбиновани пуферски капацитет и формирање стабилнијих интермолекуларних комплекса који стерно ометају нуклеофилни напад.

У киселим условима (1 М HCl), тернарна смеша је делимично ублажила неке бинарне дестабилизујуће ефекте, посебно за ПЕР у односу на кисели пар ПЕР+АМЛ, али је укупна деградација остала значајна (Табеле 7,13). Стопа разградње периндоприла се повећала 3,17 пута (са 0,0006 на 0,0019 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$), амлодипина 3,58 пута (са 0,0295 на 0,1055 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$), а индапамида 48,5 пута (са 0,0002 на 0,0098 $\text{mM}^{-1}\text{h}^{-1}$). Комплексна интеракција сугерише да, иако производи разградње амлодипина и даље катализују хидролизу периндоприла, присуство индапамида може делимично ометати ове каталитичке путеве, али је укупни ефекат и даље штетан, посебно за индапамид.

Под неутралним условима, тернарна смеша је подстакла разградњу АМЛ и ИНД, док је ПЕР показао малу укупну промену (Табеле 9,14). Периндоприл није показао промену у брзини

разградње, док је АМЛ био снажно дестабилизован са повећањем брзине разградње 15 пута (са $0,00002$ на $0,0003 \text{ mMh}^{-1}$), а ИНД је такође показао повећану разградњу, са константом брзине која је порасла са $0,0001$ на $0,0013 \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Дестабилизација, посебно за амлодипин, могла би бити последица стварања реактивних интермедијера из споре разградње ПЕР или ИНД, који затим нападају АМЛ.

Под оксидативним стресом ($3\% \text{ H}_2\text{O}_2$), тернарна смеша је показала мешовите ефекте, са значајном стабилизацијом амлодипина (Табела 11). Брзина разградње периндоприла је смањена за $12,5\%$ (са $0,00008$ на $0,00007 \text{ mMh}^{-1}$), амлодипин је показао значајну стабилизацију са смањењем брзине разградње од $42,5\%$ (са $0,0238$ на $0,0137 \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$), док је брзина разградње индапамида повећана за $38,5\%$ (са $0,0013$ на $0,0018 \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Јака стабилизација амлодипина сугерише да и периндоприл и индапамид доприносе његовој заштити кроз комбиновани антиоксидативни ефекат, вероватно на штету стабилности индапамида.

При излагању видљивом и УВ светлу, тернарна смеша је пружила значајну заштиту индапамиду (Табела 10). Брзина разградње периндоприла повећала се 10 пута (са $0,00002$ на $0,0002 \text{ mMh}^{-1}$), амлодипина 30 пута (са $0,00001$ на $0,0003 \text{ mMh}^{-1}$), док је индапамид показао изузетну стабилизацију са смањењем стопе фоторазградње од $93,75\%$ (са $0,0008$ на $0,00005 \text{ mMh}^{-1}$). Овај заштитни ефекат се такође огледао у значајном повећању ИНД t_{90} под фотолитичким стресом, од $34,96 \text{ h}$ за сам ИНД до $543,59 \text{ h}$ у тернарној смеси. Изузетна фотостабилизација индапамида се првенствено приписује комбинованим ефектима светлосних заштитника и периндоприла и амлодипина, који делују као жртвени фотостабилизатори.

Тернарна смеша показује сложен и снажно зависан од стања профил стабилности, са јасним предностима у неким условима стреса, али важним манама у другим. Иако неке антагонистичке интеракције и даље постоје, посебно у киселим и неутралним условима за одређене компоненте, укупни ефекат у базним, оксидативним (за АМЛ) и посебно фотолитичким условима (за ИНД) показује снажну синергистичку стабилизацију. Ово истиче потенцијал формулација са више лекова да постигну супериорне профиле стабилности у поређењу са појединачним лековима, под условом да се специфичне интеракције под различитим условима стреса темељно разумеју и ублаже кроз одговарајуће стратегије формулације (83).

4.4.6 Кинетички параметри, моделовање деградације и механистички увиди

Процеси разградње су анализирани кинетички, с циљем да се одреди ред реакције, константа брзине реакције и други термодинамички параметри сваког лека појединачно и у њиховим смешама (Табеле 12-14). Ред реакције разградње (нулти, први или други ред) је додељен на основу најбољег линеарног поклапања добијеног из графика концентрација-време, $\ln(\text{концентрација})$ -време или реципрочне концентрације-време, при чему највећи коефицијент корелације указује на најприкладнији кинетички модел за дати систем.

- Ред реакције: Разградња ПЕР, АМЛ и ИНД није пратила један универзални кинетички модел. У зависности од лека, стрес агенса и састава смеше, примећене су појаве кинетике првог, другог и нултог реда (Табеле 12–14), што указује да је понашање разградње снажно зависно од стрес услова.
- Константа брзине разградње (k): Константа брзине је одређена из нагиба линеарних графика за сваки и пут и услов разградње (Прилог 1). Ове вредности одређују брзину разградње под специфичним факторима стреса.
- Време полураспада ($t_{1/2}$) и рок трајања (t_{90}): На основу израчунатих константи брзине реакције и реда реакције, одређена су времена полураспада и рокови трајања лекова.

Вредности времена полураспада ($t_{1/2}$) и рока трајања (t_{90}) значајно су варирали у зависности од стрес услова и састава смеше. У неким системима, посебно у базним условима, коформулација је повећала $t_{1/2}$ и t_{90} за одабране активне фармацеутске супстанце, док су у киселим или неутралним условима одређене комбинације смањиле кинетичку стабилност.

- Енергија активације (E_a): Аренијусова једначина је примењена на податке о температурно зависној разградњи како би се израчунала енергија активације (E_a) за сваки лек и њихову комбинацију. Добијена E_a вредност пружа увид у енергетску баријеру која се мора превазићи да би дошло до разградње; веће вредности E_a указују на већу температурну осетљивост брзине разградње.
- Термодинамички параметри ($\Delta G^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$, $\Delta S^\ddagger$): Ејрингова једначина је коришћена за израчунавање слободне енергије активације ($\Delta G^\ddagger$), енталпије активације ($\Delta H^\ddagger$) и ентропије активације ($\Delta S^\ddagger$). Ови параметри нуде дубље разумевање прелазног стања и молекуларних механизма који леже у основи процеса разградње. Позитивне вредности $\Delta G^\ddagger$ указују на постојање слободноенергетске баријере повезане са формирањем активаног комплекса, док позитивне вредности $\Delta H^\ddagger$ указују на то да је за достизање активаног комплекса био потребан енталпијски допринос, док претежно негативне вредности $\Delta S^\ddagger$ указују на формирање уређенијег активаног комплекса током разградње.

Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања, те привидни термодинамички параметри за базну хидролизу на 45°C и 65°C приказани су у Прилогу 1 Слика П36-П46.

Табела 12. Термодинамички и кинетички параметри разградње ПЕР, АМЛ и ИНД под базним условима (0,001М NaOH), добијени на 45 и 65 °C. Одговарајући кинетички графици на основу којих су одређени ред реакције и константе брзине приказани су у Прилогу 1.

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН					
Термодинамички параметри		ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД	ПЕР+АМЛ+ИНД
E_a (kJ mol ⁻¹)		50,33	57,88	64,56	78,16
$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	47,69	55,23	61,91	75,51
	65 °C	47,52	55,07	61,75	75,35
$\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	91,13	92,28	87,52	94,48
	65 °C	93,87	94,62	89,14	95,68
$\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	45 °C	-0,137	-0,117	-0,081	-0,060
	65 °C	-0,137	-0,117	-0,081	-0,060
Кинетички параметри					
k^*	45 °C	0,0071	0,0046	0,0278	0,002
	65 °C	0,0219	0,0168	0,1179	0,0115
n	45 °C	I	I	II	I
	65 °C	I	I	II	I
$t_{1/2}$ (h)	45 °C	97,61	150,65	148,69	319,5
	65 °C	31,64	41,25	34,89	55,56
t_{90} (h)	45 °C	14,79	22,83	16,50	52,50
	65 °C	4,79	6,25	3,87	9,13
АМЛОДИПИН БЕСИЛАТ					
Термодинамички параметри		АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД
E_a (kJ mol ⁻¹)		22,77	3,80	16,25	5,57
$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	20,13	1,16	13,61	2,92
	65 °C	19,96	0,993	13,44	2,76
$\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	85,03	85,22	84,99	85,79
	65 °C	89,12	90,51	89,48	91,01
$\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	45 °C	-0,204	-0,264	-0,224	-0,261

	65 °C	-0,205	-0,265	-0,225	-0,261
Кинетички параметри					
k*	45 °C	0,0713	0,0664	0,0725	0,0535
	65 °C	0,1187	0,0723	0,1043	0,0606
n	45 °C	II	II	II	II
	65 °C	II	II	II	II
t_{1/2} (h)	45 °C	80,48	85,91	77,44	105,13
	65 °C	49,44	77,12	54,82	90,97
t₉₀ (h)	45 °C	8,93	9,54	8,59	11,67
	65 °C	5,49	8,56	6,08	10,10
ИНДАПАМИД					
Термодинамички параметри		ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
E_a (kJ mol⁻¹)		44,75	65,94	54,45	17,82
ΔH[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	42,11	63,30	51,83	15,17
	65 °C	41,94	63,13	51,67	15,01
ΔG[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	90,20	90,12	93,79	89,17
	65 °C	93,23	91,82	96,43	93,83
ΔS[‡] (kJ mol⁻¹ K⁻¹)	45 °C	-0,151	-0,084	-0,132	-0,233
	65 °C	-0,152	-0,085	-0,132	-0,233
Кинетички параметри					
k*	45 °C	0,0101	0,0104	0,0026	0,0149
	65 °C	0,0275	0,0455	0,0088	0,0222
n	45 °C	II	II	II	II
	65 °C	II	II	II	II
t_{1/2} (h)	45 °C	348,52	346,10	1391,95	243,73
	65 °C	130,45	78,70	409,36	160,49
t₉₀ (h)	45 °C	38,69	38,42	154,51	27,05
	65 °C	14,48	8,74	45,44	17,81

*Константа брзине (k) је изражена у јединицама [h⁻¹] за реакцију првог реда и [mM⁻¹ h⁻¹] за реакцију другог реда.

Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања, те привидни термодинамички параметри за киселу хидролизу на 45°C и 65°C приказани су у Прилогу 1 Слика П47-П57.

Табела 13. Термодинамички и кинетички параметри разградње ПЕР, АМЛ и ИНД под киселим условима (1М НСl), добијени на 45 и 65 °C. Одговарајући кинетички графици на основу којих су одређени ред реакције и константе брзине приказани су у Прилогу 1.

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН					
Термодинамички параметри		ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД	ПЕР+АМЛ+ИНД
E_a (kJ mol⁻¹)		54,68	34,68	46,00	28,15
ΔH[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	52,04	32,04	43,36	25,51
	65 °C	51,87	31,87	43,19	25,34
ΔG[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	93,00	88,29	93,41	87,52
	65 °C	95,42	91,83	96,56	91,43
ΔS[‡] (kJ mol⁻¹ K⁻¹)	45 °C	-0,129	-0,177	-0,157	-0,195
	65 °C	-0,129	-0,177	-0,158	-0,196
Кинетички параметри					
k *	45 °C	0,0035	0,0208	0,003	0,0278
	65 °C	0,0119	0,0452	0,0084	0,0522
n	45 °C	I	II	I	II
	65 °C	I	II	I	II
t_{1/2} (h)	45 °C	198	197,83	231,00	146,37
	65 °C	58,23	79,86	82,50	80,73

t₉₀ (h)	45 °C	30,00	21,96	35,00	16,25
	65 °C	8,82	8,86	12,50	8,96
АМЛОДИПИН БЕСИЛАТ					
Термодинамички параметри		АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД
E_a (kJ mol⁻¹)		28,93	41,85	66,17	68,07
ΔH[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	26,29	39,21	63,53	65,42
	65 °C	26,12	39,04	63,36	65,26
ΔG[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	72,79	85,20	74,08	75,01
	65 °C	75,72	88,10	74,75	75,62
ΔS[‡] (kJ mol⁻¹ K⁻¹)	45 °C	-0,146	-0,145	-0,033	-0,030
	65 °C	-0,147	-0,145	-0,034	-0,031
Кинетички параметри					
k *	45 °C	7,3077	0,0669	4,4853	3,1626
	65 °C	13,963	0,1707	19,723	14,509
n	45 °C	II	I	II	II
	65 °C	II	I	II	II
t_{1/2} (h)	45 °C	0,75	10,36	1,26	1,78
	65 °C	0,41	4,06	0,29	0,38
t₉₀ (h)	45 °C	0,08	1,57	0,14	0,20
	65 °C	0,05	0,61	0,03	0,04
ИНДАПАМИД					
Термодинамички параметри		ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
E_a (kJ mol⁻¹)		62,24	11,92	52,75	65,82
ΔH[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	59,60	9,28	50,11	63,18
	65 °C	59,43	9,11	49,94	63,01
ΔG[‡] (kJ mol⁻¹)	45 °C	92,86	89,72	92,72	89,23
	65 °C	94,95	94,79	95,40	90,87
ΔS[‡] (kJ mol⁻¹ K⁻¹)	45 °C	-0,105	-0,253	-0,134	-0,082
	65 °C	-0,105	-0,253	-0,134	-0,082
Кинетички параметри					
k *	45 °C	0,0037	0,0121	0,0037	0,0146
	65 °C	0,0149	0,0158	0,0127	0,0637
n	45 °C	I	I	I	II
	65 °C	I	I	I	II
t_{1/2} (h)	45 °C	187,30	57,27	177,69	237,76
	65 °C	46,51	43,86	54,57	56,19
t₉₀ (h)	45 °C	28,38	8,68	26,92	26,39
	65 °C	7,05	6,65	8,27	6,24

*Константа брзине (k) је изражена у јединицама [h⁻¹] за реакцију првог реда и [mM⁻¹ h⁻¹] за реакцију другог реда.

Сви кинетички графици на основу којих су одређени редови реакција, константе брзине разградње и коефицијенти линеарног поклапања, те привидни термодинамички параметри за неутралну хидролизу на 45°C и 65°C приказани су у Прилогу 1 Слика П58-П68.

Табела 14. Термодинамички и кинетички параметри разградње ПЕР, АМЛ и ИНД под неутралним условима (H₂O), добијени на 45 и 65 °C. Одговарајући кинетички графици на основу којих су одређени ред реакције и константе брзине приказани су у Прилогу 1.

ПЕРИНДОПРИЛ ТЕРЦ-БУТИЛАМИН				
Термодинамички параметри		ПЕР	ПЕР+АМЛ	ПЕР+ИНД
E_a (kJ mol⁻¹)		45,92	40,17	30,97
ΔH[‡] (kJ mol⁻¹)		45 °C	43,28	37,52
			28,33	46,44

	65 °C	43,11	37,36	28,16	46,28
$\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	92,72	93,00	96,90	98,15
	65 °C	95,83	96,50	101,22	101,40
$\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	45 °C	-0,155	-0,174	-0,216	-0,163
	65 °C	-0,156	-0,175	-0,216	-0,163
Кинетички параметри					
k *	45 °C	0,0039	0,0035	0,0008	0,0005
	65 °C	0,0109	0,0086	0,0016	0,0015
n	45 °C	I	I	0	0
	65 °C	I	I	0	0
t_{1/2} (h)	45 °C	177,69	198,00	165,79	238,78
	65 °C	63,58	80,58	74,22	77,81
t₉₀ (h)	45 °C	26,92	30,00	33,16	47,76
	65 °C	9,63	12,21	14,84	15,56
АМЛЮДИПИН БЕСИЛАТ					
Термодинамички параметри		АМЛ	АМЛ+ПЕР	АМЛ+ИНД	АМЛ+ПЕР+ИНД
E_a (kJ mol⁻¹)		57,91	34,05	76,62	71,91
$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	55,27	31,41	73,98	69,27
	65 °C	55,10	31,24	73,81	69,10
$\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	93,50	95,43	102,68	102,40
	65 °C	95,91	99,46	104,49	104,49
$\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	45 °C	-0,120	-0,201	-0,090	-0,104
	65 °C	-0,121	-0,202	-0,091	-0,105
Кинетички параметри					
k *	45 °C	0,0029	0,0014	0,00009	0,0001
	65 °C	0,0106	0,003	0,0005	0,0005
n	45 °C	I	I	0	0
	65 °C	I	I	0	0
t_{1/2} (h)	45 °C	238,97	495,00	982,54	855,78
	65 °C	65,38	231,00	170,54	170,16
t₉₀ (h)	45 °C	36,21	75,08	196,51	171,16
	65 °C	9,91	32,84	34,11	34,03
ИНДАПАМИД					
Термодинамички параметри		ИНД	ИНД+ПЕР	ИНД+АМЛ	ИНД+ПЕР+АМЛ
E_a (kJ mol⁻¹)		35,68	71,91	54,68	102,88
$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	33,03	69,27	52,04	100,24
	65 °C	32,87	69,10	51,87	100,07
$\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	45 °C	102,68	102,40	98,15	106,66
	65 °C	107,07	104,50	101,05	107,07
$\Delta S^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	45 °C	-0,219	-0,104	-0,145	-0,020
	65 °C	-0,220	-0,105	-0,146	-0,021
Кинетички параметри					
k *	45 °C	0,00005	0,0001	0,0005	0,00002
	65 °C	0,0002	0,0005	0,0017	0,0002
n	45 °C	0	0	II	0
	65 °C	0	0	II	0
t_{1/2} (h)	45 °C	2734,72	2713,21	7004,85	6896,66
	65 °C	697,00	553,58	2152,00	687,57
t₉₀ (h)	45 °C	546,94	271,32	777,54	1379,33
	65 °C	139,40	55,36	238,87	137,51

*Константа брзине реакције (k) је изражена у јединицама [mM h⁻¹] за реакцију нултог реда, [h⁻¹] за реакцију првог реда и [mM⁻¹ h⁻¹] за реакцију другог реда.

Кинетичка испитивања спроведена у овој студији интегришу експерименте разградње у реалном времену спроведене на собној температури (око 25 °C) и са убрзаним студијама на повишеној температури (45 °C и 65 °C), омогућавајући свеобухватну карактеризацију реда реакције, константи брзине разградње, енергија активације и термодинамичких параметара активације. Овај комбиновани приступ омогућава механистичко тумачење путева деградације и подржава научно утемељену процену понашања стабилности под испитиваним условима стреса (84).

Под хидролитичким и оксидативним стресом, разградња је показала мешовито кинетичко понашање у зависности од АПИ, средине у којој се налазе, али и састава смеше лекова (бинарне и тернарне), са примећеном кинетиком првог реда, другог реда, а у неким случајевима и нултог реда. Насупрот томе, фоторазградња је константно пратила кинетику нултог реда под примењеним условима зрачења. Ова варијабилност указује да се не може са једним кинетичким моделом адекватно описати сваки пут разградње и да су и стресни медијум и састав смеше лекова значајно утицали на привидни ред реакције.

Понашање другог реда је у складу са процесима разградње у којима брзина реакције зависи и од концентрације лека и од концентрације реагујућих врста, као што су хидроксидни јони или оксидативне врсте. Иако се фармацеутска разградња често апроксимира моделима првог реда, садашњи резултати показују да је кинетичко понашање у овим системима зависно од услова и да је концентрација стрес агенаса значајно допринела брзини разградње у многим испитиваним медијумима.

Фотодеградација нултог реда одражава кинетику засићења у којој флуks фотона, а не концентрација лека, управља брзином разградње. Под константним интензитетом зрачења, број фотона апсорбованих по јединици времена остаје константан, што доводи до разградње независне од концентрације.

Кинетичка анализа је пружила квантитативни оквир за разумевање понашања разградње ПЕР, АМЛ и ИНД, како појединачно, тако и у њиховим смешама. Резултати наглашавају да на стабилност сва три лека у великој мери утиче рН вредност средине, светлост и фактори оксидације, као и њихове сложене интеракције, што захтева пажљиво разматрање током развоја формулације.

4.4.6.1 Периндоприл - нестабилност изазвана хидролизом естра

ПЕР садржи естарски део који је инхерентно подложен хидролизи катализованом базама (85). На собној температури (око 25 °C) под базним условима (0,001 M NaOH), ПЕР се разграђује према кинетици другог реда са константом брзине реакције од 0,0078 mM⁻¹h⁻¹ и t₉₀ од 62,37 h (Табела 8). Ово потврђује нуклеофилни напад хидроксидних јона на естарски карбонил као доминантан пут разградње.

Кисела и неутрална хидролиза показале су знатно ниже константе брзине реакције (0,0006 mM⁻¹h⁻¹ и 0,0004 mM⁻¹h⁻¹, респективно), што даје знатно веће вредности t₉₀ од 840,50 h и 1197,35 h (Табеле 7 и 9). Ови резултати показују да је хидролиза ПЕР снажно катализована базама и релативно сузбијена у киселим или неутралним срединама.

Убрзане студије су откриле енергије активације за базну хидролизу ПЕР у распону од 50,33 до 78,16 kJ/mol у зависности од комбинације лекова (Табела 12). Ове вредности су у складу са процесом хидролитичке разградње зависним од температуре и указују на умерену до релативно високу осетљивост брзине разградње са температуром. Вредности негативне ентропије активације ($\Delta S^\ddagger$) указују на формирање уређеног прелазног стања у складу са бимолекуларном нуклеофилном супституцијом.

Механистички, повећана стабилност ПЕР у бинарним и тернарним смешама може се приписати делимичном штићењу естарске групе или модулацији рН микроокружења коформулисаним лековима.

4.4.6.2 Амлодипин - Оксидативно-осетљив дихидропиридински систем

АМЛ је показао највећу нестабилност под базним и оксидативним стресом. На 25 °C у бази, АМЛ је показао константу брзине реакције другог реда од 0,043 mM⁻¹h⁻¹ са t₉₀ од 14,64 h (Табела 8). Оксидативна разградња под дејством 3% H₂O₂ одвијала се са константом брзине реакције од 0,0238 mM⁻¹h⁻¹ и t₉₀ од 26,42 h (Табела 11).

Дихидропиридински прстен у АМЛ се лако оксидује у одговарајући дериват пиридина и ова структурна карактеристика такође помаже у објашњењу изражене осетљивости АМЛ на оксидацију, што је у складу са израженом оксидативном осетљивошћу примећеном експериментално (86).

У киселим, а посебно неутралним медијумима, АМЛ је показао веће вредности t₉₀ (21,84 h у киселим и 878,62 h у неутралним медијумима), што указује да је његова разградња под овим условима била мање изражена, него под базним или оксидативним стресом (Табеле 7 и 9).

Фотодеградација је пратила кинетику нултог реда са веома ниским константама брзине реакције (0,00001 mMh⁻¹), потврђујући да је АМЛ релативно фотостабилан под примењеним условима излагања светлосном стрес агенсу (Табела 10).

4.4.6.3 Индапамид - Претежна фотохемијска деградација

ИНД је показао највећу фотосензитивност међу три АПИ, са разградњом од 26,18% након 72 сата на 25 °C, константом брзине реакције нултог реда од 0,0008 mM h⁻¹ и t₉₀ од 34,96 сати (Табела 10). Ово понашање је у складу са фотоактивацијом хромофорних структура у молекулу ИНД, што доводи до фотохемијских реакција разградње.

Под хидролитичким условима, ИНД је остао релативно стабилан. Базна хидролиза је показала кинетику другог реда са константом брзине реакције од 0,0012 mM⁻¹h⁻¹ и t₉₀ од 92,50 h (Табела 8), док су киселе и неутралне средине дале много дуже вредности t₉₀ од 1980,70 h и 4000,87 h, респективно (Табеле 7 и 9).

За сам ИНД, убрзане студије деградације су дале вредности за енергије активације од 44,75 kJ mol⁻¹ под базним условима, 62,24 kJ mol⁻¹ под киселим условима и 35,68 kJ mol⁻¹ под неутралним условима (Табеле 12–14), што указује на умерену температурну зависност хидролитичке разградње (87).

4.4.6.4 Аренијус/Ејринг моделовање и импликације на интегрисану стабилност

Студије убрзане деградације спроведене на повишеним температурама (45 °C и 65 °C) омогућиле су конструисање Аренијусових графика, који су показали јаку линеарну зависност (R² > 0,98), што подржава употребу температурно зависног кинетичког моделирања унутар испитиваног опсега концентрација. Израчунате енергије активације покривале су широк опсег у зависности од АПИ, стресног медијума и састава смеше: 28,15–78,16 kJ mol⁻¹ за системе који

садрже ПЕР; 3,80–76,62 kJ mol⁻¹ за системе који садрже АМЛ и 11,92–102,88 kJ mol⁻¹ за системе који садрже ИНД. Широки распон параметара активације у различитим *стрес* медијумима и саставима смеша указује на то да енергетски процеси разградње нису били интринзична константа само АПИ, већ су били снажно модулирани околним хемијским окружењем.

Важно је нагласити да већа енергија активације одговара већој температурској зависности брзине разградње испитиваних лекова. У складу са Аренијусовом кинетиком, реакције карактерисане вишим E_a вредностима показују израженије повећање брзине разградње са повећањем температуре. Сходно томе, веће вредности E_a унутар датог пута разградње указују на већу температурну осетљивост тог специфичног процеса. Међутим, у овој студији, температурна зависност је значајно варијала у зависности од АПИ, стресног медијума и састава смеше.

Поред енергије активације, процена енталпије активације ($\Delta H^\ddagger$) и ентропије активације ($\Delta S^\ddagger$) пружа дубљи увид у молекуларну природу прелазних стања која управљају реакцијама разградње. Енталпија активације одражава енергетску баријеру повезану са цепањем и формирањем веза (степеном ригидности интрамолекуларних веза), док ентропија активације описује промене у молекуларном реду како реагенти напредују ка активаном комплексу (стабилност и уређеност интрамолекуларног система).

За периндоприл, позитивне вредности $\Delta H^\ddagger$ у комбинацији са негативним вредностима $\Delta S^\ddagger$ указују на то да се разградња одвија кроз енергетски захтевно и уређеније прелазно стање, што је у складу са механизмом бимолекуларне нуклеофилне супституције током хидролизе естра катализоване базама. Негативно $\Delta S^\ddagger$ сугерише смањење степена слободе како се хидроксидни јони приближавају и оријентишу ка карбонилној групи естра, формирајући компактни активирани комплекс.

Добијене вредности енергије активације за системе који садрже периндоприл у овој дисертацији биле су у опсегу од 28,15 до 78,16 kJ mol⁻¹, у зависности од стресног медијума и састава смеше. Ове вредности су упоредиве са литературним подацима за термичку разградњу периндоприла, где је показано да главни корак термичке разградње периндоприл-ербумина има енергију активације приближно 59–69 kJ mol⁻¹, у зависности од примењеног кинетичког модела. Истовремено, у истој студији је показано да формулација у облику таблете може имати знатно вишу вредност енергије активације, око 170 kJ mol⁻¹, што указује на значајан утицај ексципијенаса и чврстог стања на стабилност активне супстанце (88). Ово је у складу са резултатима ове дисертације, јер су вредности E_a за ПЕР варијале у зависности од присуства АМЛ и/или ИНД, што потврђује да коформулација може променити енергетску баријеру разградње и модификовати стабилност појединачне активне супстанце.

Насупрот томе, АМЛ је често показивао ниже вредности $\Delta H^\ddagger$ и мање негативне вредности $\Delta S^\ddagger$ него ПЕР, што указује на нижу енергетску баријеру (већи степен нестабилности) и мање строге оријентационе захтеве за разградњу у неколико испитиваних система. Ово тумачење је у складу са експериментално примећеном високом осетљивошћу АМЛ на базни и оксидативни стрес.

За амлодипин су у овој дисертацији добијене вредности енергије активације у широком опсегу, од 3,80 до 76,62 kJ mol⁻¹, што указује на изражену зависност кинетичког понашања од стресног услова и састава смеше. Литературни подаци такође потврђују да је амлодипин осетљив на услове који укључују оксидативне и радикалске процесе. У студији разградње амлодипина УВ/хлор процесом показано је да се његова разградња добро описује псеудо-првим редом, при чему су брзина и степен разградње зависили од дозе хлора, интензитета УВ зрачења, рН вредности и присуства других компоненти у воденој средини. У истој студији је показано да УВ зрачење само по себи има ограничен ефекат, док присуство реактивних радикалских врста,

посебно $\text{OH}\cdot$ и $\text{Cl}\cdot$, значајно убрзава разградњу амлодипина (89). Ови подаци су сагласни са резултатима ове дисертације, у којој је АМЛ показао изражену нестабилност у базним и оксидативним условима, што се може повезати са осетљивошћу дихидропиридинског система на оксидацију.

ИНД је показао умерене до променљиве вредности $\Delta\text{H}^\ddagger$ у зависности од састава анализираног медијума и смеше лекова, док су негативне вредности $\Delta\text{S}^\ddagger$ генерално указивале на формирање уређенијег прелазног стања током процеса хидролитичке разградње испитиваних у убрзаним студијама. Међутим, доминација фотодеградације нултог реда указује на то да је, под излагањем светлости, брзина реакције првенствено одређена апсорпцијом фотона, а не класичним термички активираним хемијским корацима.

Литературни подаци за индапамид показују да његова стабилност значајно зависи од физичког стања узорка, растварача и присуства друге активне супстанце. У студији која је испитивала стабилност смеше индапамида и дихидралазина показано је да индапамид у чврстом стању показује релативно ограничену фотодеградацију, док у метанолном раствору долази до много израженије разградње при излагању светлости. Такође је показано да присуство другог лека може повећати нестабилност система и да комбиноване формулације захтевају заштиту од УВ-ВИС светлости (90). Ови налази су у доброј сагласности са резултатима ове дисертације, у којој је ИНД показао изражену фотосензитивност, а фотодеградација је пратила кинетику нултог реда. Разлика између литературних података и резултата ове дисертације може се објаснити различитим експерименталним условима, односно чињеницом да фотостабилност значајно зависи од растварача, агрегатног стања, интензитета светлости, времена излагања и присуства коформулисаних супстанци.

Сличан тренд утицаја формулационог окружења на кинетику и термодинамику разградње описан је и код других фармацеутских супстанци. На пример, у студији термичке разградње флурбипрофена и његовог полимерног коњугата показано је да се кинетички параметри, укључујући E_a , ΔH , ΔS и ΔG , значајно мењају након везивања лека за полимерни носач. За сам флурбипрофен добијене су вредности E_a приближно $98,70\text{--}104,75\text{ kJ mol}^{-1}$, док су за коњугат вредности биле око $111,90\text{--}112,59\text{ kJ mol}^{-1}$, што је тумачено као повећање термичке стабилности након модификације формулационог окружења (91). Ово потврђује општи принцип који је уочен и у овој дисертацији: промена хемијског или формулационог окружења може значајно утицати на енергетску баријеру разградње и на вредности привидних термодинамичких функција активације.

У целини, поређење са литературним подацима потврђује да су вредности кинетичких и привидних термодинамичких параметара добијене у овој дисертацији у складу са опсезима који се уобичајено налазе у студијама разградње фармацеутских супстанци. Истовремено, резултати ове дисертације проширују постојећа сазнања јер не разматрају само понашање појединачних активних супстанци, већ систематски испитују њихово понашање у бинарним и тернарним смешама. Посебан допринос ове студије огледа се у томе што показује да стабилност фиксне комбинације доза није једноставан збир стабилности појединачних компонената, већ резултат сложених међусобних утицаја активних супстанци, стресног медијума и температуре. Због тога се добијене вредности E_a , $\Delta\text{H}_{\text{app}}^\ddagger$, $\Delta\text{G}_{\text{app}}^\ddagger$ и $\Delta\text{S}_{\text{app}}^\ddagger$ могу тумачити као привидни параметри који описују укупно кинетичко понашање система, а не искључиво један изолован елементарни реакциони корак.

Узети заједно, параметри активације сугеришу да деградација ПЕР укључује и значајна енергетска и оријентациона ограничења, деградација АМЛ често се одвија са релативно нижом активационом баријером и мање негативним ентропијским условима, а стабилност ИНД-а одражава комбиновани утицај хидролитичког понашања и изражене фотохемијске осетљивости. Ове разлике пружају механистичку основу за уочене разлике у стабилности и воде стратегије формулације, укључујући контролу температуре производње, транспорта и

чувања за периндоприл, затим антиоксидативну заштиту за амлодипин, као и паковање које ће обезбедити заштиту од утицаја светлости за индапамид.

Механистичка интерпретација експериментално одређених кинетичких редова, заједно са Аренијусовим и Ејринговим параметрима активације, показује да је стабилност сваког АПИ унутар фиксне комбинације испитиваних лекова одређена посебним доминантним покретачем разградње. На стабилност периндоприла првенствено највећи утицај има рН вредност окружења и температура средине у којој се налази, што одражава хидролизу естра другог реда, катализовану базама, коју карактерише релативно висока енталпија активације и негативна ентропија активације, што је у складу са формирањем уређеног бимолекуларног прелазног стања. Стабилност АМЛ је била под снажним утицајем оксидативних услова, што је у складу са њеном израженом подложношћу оксидативној деградацији и релативно ниским активационим баријерама у неколико испитиваних система. Стабилност индапамида је контролисана углавном излагањем светлости, што доказује кинетика фотодеградације нултог реда, што указује на процес ограничен фотонима, а не на хемијску реакцију зависну од концентрације.

Комплементарна природа ових путева деградације помаже у објашњењу зашто бинарне и тернарне смеше могу показати побољшану стабилност под одабраним условима стреса, док под другим условима могу уместо тога подстаћи дестабилизацију. Ови налази пружају механистичку основу за рационалан дизајн фиксне комбинације лекова који укључује контролу рН вредности средине у којој се налазе, антиоксидативну заштиту, контролу температуре и паковање које ће обезбедити заштиту од светлости, чиме се подржава побољшана дугорочна стабилност комбинованог готовог производа.

4.5 Регулаторне и практичне импликације

Механистичко разумевање путева разградње и зависности од температуре добијено у овој студији је у складу са принципима који леже у основи ICH Q1A(R2) тестирања стабилности за нове лекове и производе. Комбинована употреба убрзаних услова испитивања стабилности лекова (45 °C и 65 °C) заједно са студијама у реалном времену на 25 °C подржава научно утемељену процену стабилности АПИ и готових производа, те помаже у информисању о одговарајућим препорукама за њихово складиштење.

Штавише, идентификација доминантних покретача разградње за сваку компоненту омогућава стратегију формулације засновану на ризику у складу са принципима квалитета по дизајну (QbD). Важно је напоменути да уочени ефекти бинарне и тернарне интеракције додатно указују на то да одлуке о формулацији не би требало да се заснивају само на понашању стабилности појединачних активних фармацеутских састојака, већ и на њиховом међусобном утицају, унутар комбинованог система. Конкретно, контрола рН вредности формулације и температуре складиштења може ублажити хидролизу периндоприла, уградња антиоксиданата и паковања непропусног за кисеоник може смањити оксидацију амлодипина, а примарно паковање које штити од светлости је неопходно за минимизирање фотодеградације индапамида.

Узети заједно, ови налази показују да интеграција кинетичког моделирања, термодинамичке анализе и регулаторних принципа пружа робустан оквир за рационалан развој стабилних комбинација фиксних доза лекова и подржава побољшани фармацеутски квалитет кроз научно засноване стратегије формулације и складиштења.

4.6 Интеграција QbD, GAC и студија стабилности

Ово истраживање доприноси фармацеутској науци кроз успешну интеграцију три важне савремене парадигме: Експериментални дизајн и Квалитет по дизајну, Зелена аналитичка хемија и свеобухватне студије стабилности лекова коришћењем кинетичких и термодинамичких параметара анализе. Усвајањем QbD приступа, развој HPLC методе је трансформисан из процеса покушаја и грешака у систематски приступ заснован на савременој интеракцији науке и софтвера који идентификују и отклањају факторе ризика у свим фазама истраживања. Ово не само да је дало робусну и поуздану методу, већ је омогућило и дубље разумевање њених критичних параметара и њиховог утицаја на праћене одговоре система, чиме је подржано конзистентно аналитичко деловање током примене методе. Проактивна примена QbD принципа, посебно Аналитичког квалитета по дизајну, пружа снажан оквир за директно уграђивање квалитета у току развоја аналитичких метода у контексту сложених комбинација фиксних доза (92). Важно је напоменути да је интеграција ова три приступа омогућила процену аналитичких перформанси, утицаја на животну средину и понашања стабилности релевантног за формулацију у оквиру јединственог кохерентног развојног оквира.

Штавише, експлицитно укључивање GAC принципа кроз истраживање наглашава посвећеност еколошкој одрживости у фармацеутској анализи. Детаљна процена „зеленила” коришћењем вишеструких комплементарних алата, показала је да се високе аналитичке перформансе могу постићи уз значајно смањен еколошки отисак. Ово подржава шире усвајање зелених аналитичких метода и доприноси одрживијим и одговорнијим фармацеутским анализама. Успешна интеграција QbD и GAC показује да аналитички квалитет и еколошка одговорност нису међусобно искључиви, већ се могу спроводити истовремено и синергијски (93).

Свеобухватне студије кинетике разградње, спроведене на појединачним лековима и њиховим комбинацијама, омогућавају детаљну анализу стабилности производа уз добијање свих потребних информација за предвиђање најстабилнијег окружења у којем се лек треба налазити, као и дефинисање рока његове употребе. Разјашњавањем специфичних путева разградње, квантификацијом кинетичких параметара и идентификовањем интеракција између лекова, ово истраживање пружа драгоцене увиде за разумевање и побољшање дугорочне стабилности фиксних комбинација лекова. Овај холистички приступ, који комбинује робусне аналитичке методе које су еколошки прихватљиве са дубљим разумевањем стабилности лекова, веома је важан за подршку фармацеутској индустрији у погледу обезбеђивања квалитета и стабилности током целог рока трајања производа (94).

4.7 Утицај на развој лекова са комбинацијом фиксних доза

Резултати ове докторске дисертације имају важне импликације за развој лекова са КФД, посебно у контексту сложених вишекомпонентних формулација. КФД нуде значајне предности у погледу придржавања пацијената и побољшаних терапијских исхода, али њихов развој представља јединствене изазове везане за компатибилност и стабилност више активних фармацеутских састојака (12). Ово истраживање пружа практичан оквир за решавање ових изазова:

- Омогућавањем рационалног дизајна формулације: Детаљно разумевање профила разградње појединачних лекова и, што је још важније, сложених интеракција између лекова унутар КФД, омогућава рационалнији и научно заснован приступ дизајну формулације. Истраживачки тим одговоран за одабир најоптималније формулације

лека може доносити правилне одлуке у вези са избором помоћних супстанци, условима производње и начину и врсти паковања, како би ублажили путеве разградње идентификоване овим начином анализе (95). Уочени ефекти интеракција значајних фактора у бинарним и тернарним смешама показали су да се стабилност КФД не може поуздано закључити само из утицаја *one factor at the time* и из понашања појединачних АПИ у готовим производима. Неопходна је детаљна процена овог врло комплексног система – јасно дефинисати комплетан утицај свих фактора ризика у стварном комбинованом систему под релевантним условима стреса.

- Побољшање квалитета и безбедности: Обезбеђивањем валидиране, робусне и зелене аналитичке методе, студија подржава доследно праћење квалитета и чистоће КФД-а током производње и складиштења. Увиди у понашање и кинетику разградње доприносе процени квалитета производа идентификовањем услова повезаних са повећаном нестабилношћу и информисањем о одговарајућим разматрањима рока трајања и складиштења (96).
- Промовисање ефикасности и одрживости: Развој робусне метода вођен DoE и QbD-ом може смањити време и ресурсе који се обично повезују са развојем и валидацијом аналитичких метода. Заједно са проценом зеленила, ово истраживање промовише ефикаснији и еколошки одрживији приступ развоју КФД, усклађујући се са захтевима савремене фармацеутске индустрије за квалитет и друштвену одговорност предузећа.

Овим истраживањем настоји се да се попуни неколико постојећих празнина у досадашњим сазнањима у области фармацеутских истраживања. Иако постоје појединачне студије о стабилности ПЕР, АМЛ и ИНД, увек је недостајало свеобухватно истраживање њихове кинетике разградње унутар комбинације фиксних доза, посебно фокусирајући се на интеракције између лекова. Ова теза попуњава ту празнину пружањем детаљних кинетичких и термодинамичких података и механистичких увида у то како се ови лекови понашају када се коформулирају. Штавише, систематска интеграција AQbD и GAC принципа у развој аналитичке методе за ову специфичну КФД пружа вредну студију случаја која демонстрира практичне користи од ових модерних приступа у стварном фармацеутском контексту. Налази доприносе растућем знању о развоју КФД, нудећи практичне смернице за дизајн и контролу квалитета будућих вишекомпонентних лекова.

5. ЗАКЉУЧЦИ

Комбиновањем физичко-хемијског испитивања хроматографског понашања са кинетичком и термодинамичком анализом процеса деградације, у овој дисертацији је развијен интегрисани приступ за карактеризацију периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида, појединачно и у смешама. Одређивањем ретенционих и сепарационих параметара, реда реакције, константи брзине, енергије активације и привидних термодинамичких функција добијена је научно заснована слика о хроматографским својствима, температурној зависности и енергетским захтевима њихове деградације. Принципи квалитета по дизајну и зелене аналитичке хемије примењени су као методолошки оквир за оптимизацију хроматографског система и процену еколошке прихватљивости развијене методе.

Робусна RP-HPLC метода за истовремено одређивање периндоприл терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида успешно је развијена коришћењем приступа аналитичког квалитета по дизајну. Примена Експерименталног дизајна омогућила је систематску оптимизацију критичних параметара методе и дефинисање одговарајућег простора дизајна, што је резултирало методом са задовољавајућом селективношћу, линеарношћу, тачношћу, прецизношћу, осетљивошћу и робусношћу. Показало се да је развијена метода погодна за рутинску анализу (квалитативну и квантитативну), као и за детаљну студију стабилности испитиваних лекова и њихових смеша.

Еколошке перформансе аналитичке методе су такође успешно процењене коришћењем неколико комплементарних алата. Резултати су показали да је метода постигла повољан баланс између аналитичких перформанси и еколошке прихватљивости. Ово је потврдило да се робусна фармацеутска анализа и еколошка одговорност могу истовремено спроводити и да се зелени принципи могу смислено интегрисати у развој аналитичких метода за комбинације фиксних доза.

Студије форсиране деградације показале су да три испитивана АПИ поседују јасно диференциране профиле стабилности. Периндоприл терц-бутиламин је био најосетљивији на алкалну хидролизу, што је у складу са присуством естарске групе склоне хидролизе. Амлодипин бесилат је показао највећу осетљивост на базни и оксидативни стрес, што је у складу са познатом нестабилношћу дихидропиридинског прстенастог система. Индапамид је показао највећу фотосензитивност, потврђујући фотодеградацију као његову доминантну склоност ка деградацији под примењеним условима стреса. Ови налази су показали да се стабилност комбинације фиксних доза не може разумети посматрањем три једињења као хемијски еквивалентних, већ је потребна процена доминантних путева деградације специфична за сваку компоненту појединачно, али и у њиховој смеси.

Кинетичка и термодинамичка анализа је пружила квантитативну карактеризацију процеса деградације кроз одређивање реда реакције, константи брзине деградације, времена полураспада и вредности рока трајања. Резултати су показали да понашање деградације снажно зависи од АПИ, стресног агенса (медијума) и састава испитиване смеше. Док су многи хидролитички и оксидативни процеси пратили кинетику другог реда, понашање нултог реда је константно примењено за фотодеградацију под примењеним условима зрачења. Ови налази су потврдили да један кинетички модел није довољан да опише све путеве разградње и да је понашање разградње у вишекомпонентним системима снажно зависно од услова.

Убрзане (форсиране) студије стабилности на повишеним температурама омогућиле су израчунавање енергија активације и термодинамичких параметара прелазног стања, пружајући дубљи увид у енергетику разградње. Добијени Аренијусови и Ејрингови параметри показали су да су брзине разградње под снажним утицајем температуре, али да се величина

овог ефекта разликује у зависности од АПИ, медијума и састава смеше. Позитивне вредности енталпије активације и Гибсове слободне енергије потврдиле су постојање активационих баријера за разградњу, док су претежно негативне вредности ентропије указивале на формирање уређенијих прелазних стања у многим испитиваним процесима. Ови налази подржали су механистичко тумачење понашања разградње и ојачали основу за процену стабилности под дефинисаним условима стреса.

Један од најважнијих доприноса ове дисертације било је детаљно истраживање бинарних и тернарних интеракција лекова. Резултати су показали да су ефекти коформулације у великој мери зависни од стресног окружења. Под неким условима, посебно под алкалним стресом и у одабраним оксидативним или фотолитичким системима, бинарне и тернарне смеше показале су стабилизујуће ефекте и смањене брзине разградње. Под другим условима стреса, посебно у киселим и неутралним медијумима, комбинације би уместо тога могле да подстакну дестабилизацију. Ове анализе су показале да се стабилност комбинације фиксних доза не може поуздано предвидети само на основу понашања појединачних активних фармацеутских састојака, већ се она мора проценити у стварном вишекомпонентном систему обухватајући заједнички утицај и АПИ и стрес агенса.

Са практичне перспективе, дисертација пружа користан оквир за рационално дизајнирање формулација комбинација фиксних доза које садрже ове антихипертензивне агенсе. Резултати указују да су контрола рН вредности и управљање температуром посебно важни за системе који садрже периндоприл, да су антиоксидативна заштита и стратегије ограничавања кисеоника релевантне за формулације које садрже амлодипин, и да је паковање које успешно штити од светлости неопходно за производе који садрже индапамид. У ширем смислу, студија показује да стратегије формулације и складиштења за вишекомпонентне производе треба да се заснивају на интегрисаној евалуацији аналитичких перформанси, кинетике разградње, термодинамичког понашања и ефеката интеракције.

Ова докторска дисертација је показала да интеграција развоја метода заснованих на DoE и AQbD (за развој нове робусне методе), GAC принципа (за зелену аналитичку процену) и свеобухватних студија стабилности, пружа снажну научну основу за успешан развој једне брзе, квалитетне и поуздане, еколошки прихватљиве методе за фармацеутску анализу АМЛ, ПЕР и ИНД у готовом производу као фиксној комбинацији. Резултати доприносе бољем разумевању стабилности вишекомпонентних лекова и пружају практичне смернице за будући развој формулација, фармацеутску анализу и оптимизацију складиштења сложених фармацеутских производа.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. Kario, K.; Okura, A.; Hoshida, S.; Mogi, M. The WHO Global Report 2023 on Hypertension Warning the Emerging Hypertension Burden in Globe and Its Treatment Strategy. *Hypertens. Res.* 2024, 47, 1099–1102.
2. Bonow, R.O.; Mann, D.L.; Zipes, D.P.; Libby, P. Braunwald's Heart Disease e-Book: A Textbook of Cardiovascular Medicine; Elsevier Health Sciences, 2011; ISBN 1-4377-2770-0.
3. Harrison, T.R. Principles of Internal Medicine. In Principles of internal medicine; 1954; pp. 1703–1703.
4. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *Eur Heart J.* 2018 Sep 1;39(33):3021–104. doi:10.1093/eurheartj/ehy339
5. Sarafidis PA, Bakris GL. Resistant Hypertension. *JACC.* 2008 Nov 25;52(22):1749–57. doi:10.1016/j.jacc.2008.08.036
6. An J, Derington CG, Luong T, Olson KL, King JB, Bress AP, et al. Fixed-Dose Combination Medications for Treating Hypertension: A Review of Effectiveness, Safety, and Challenges. *Curr Hypertens Rep.* 2020 Oct 14;22(11):95. doi:10.1007/s11906-020-01109-2
7. Lee HJ, Jang SI, Park EC. Effect of adherence to antihypertensive medication on stroke incidence in patients with hypertension: a population-based retrospective cohort study. *BMJ Open.* 2017;7(6):e014486.
8. Gradman AH, Basile JN, Carter BL, Bakris GL, Group AS of HW. Combination therapy in hypertension. *J Clin Hypertens.* 2011;13(3):146–54.
9. Carey RM, Whelton PK, Committee* 2017 ACC/AHA Hypertension Guideline Writing. Prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: synopsis of the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association Hypertension Guideline. *Ann Intern Med.* 2018;168(5):351–8.
10. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, et al. 2020 International Society of Hypertension global hypertension practice guidelines. *Hypertension.* 2020;75(6):1334–57.
11. List Co. WHO MOdel List Of Essential MediCine5.
12. Wilkins CA, Hamman H, Hamman JH, Steenekamp JH. Fixed-dose combination formulations in solid oral drug therapy: advantages, limitations, and design features. *Pharmaceutics.* 2024;16(2):178.
13. Sengupta P, Chatterjee B, Tekade RK. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *Int J Pharm.* 2018 May 30;543(1):328–44. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.04.007

14. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, et al. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.* 2014 Jul;16(4):771–83. doi:10.1208/s12248-014-9598-3 PubMed PMID: 24854893; PubMed Central PMCID: PMC4070262.
15. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. *Introduction to modern liquid chromatography.* John Wiley & Sons; 2011.
16. Ahuja S. Overview: Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. *Sep Sci Technol.* 2005;6:1–17.
17. Dong MW. *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists.* John Wiley & Sons; 2019.
18. Wiley.com [Internet]. [cited 2025 Aug 13]. HPLC: A Practical User's Guide, 2nd Edition | Wiley. Available from: <https://www.wiley.com/en-us/HPLC%3A+A+Practical+User's+Guide%2C+2nd+Edition-p-9780471754015>
19. Dolan JW, Snyder LR. *Troubleshooting LC Systems* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 1989 [cited 2025 Aug 13]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-640-9> doi:10.1007/978-1-59259-640-9
20. D'Atri V, Barrientos RC, Losacco GL, Rudaz S, Delobel A, Regalado EL, et al. Trends in Pharmaceutical Analysis: The Evolving Role of Liquid Chromatography. *Anal Chem.* 2025;97(9):4706–27.
21. Weitzel J, Pappa H, Banik GM, Barker AR, Bladen E, Chirmule N, et al. Understanding quality paradigm shifts in the evolving pharmaceutical landscape: perspectives from the USP quality advisory group. *AAPS J.* 2021;23(6):112.
22. Research C for DE and. Q8(R2) Pharmaceutical Development [Internet]. FDA; 2020 [cited 2025 May 7]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q8r2-pharmaceutical-development>
23. Lotlikar M. Quality risk management (QRM): A review. *J Drug Deliv Ther.* 2013;3(2):149–54.
24. Lionberger RA, Lee SL, Lee L, Raw A, Yu LX. Quality by design: concepts for ANDAs. *AAPS J.* 2008;10(2):268–76.
25. Grangeia HB, Silva C, Simões SP, Reis MS. Quality by design in pharmaceutical manufacturing: A systematic review of current status, challenges and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020 Feb 1;147:19–37. doi:10.1016/j.ejpb.2019.12.007
26. N. Politis S, Colombo P, Colombo G, M. Rekkas D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017 Jun 3;43(6):889–901. doi:10.1080/03639045.2017.1291672
27. Vogt FG, Kord AS. Development of quality-by-design analytical methods. *J Pharm Sci.* 2011;100(3):797–812.
28. Mandić-Kovačević N, Kasagić-Vujanović I, Popović Bijelić A. Analysis of Fixed-Dose Combination of Three Antihypertensive Drugs by a Green and Quality by Design Approach. *J Chromatogr Sci.* 2023 Mar 1;61(3):256–68. doi:10.1093/chromsci/bmac044

29. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira C dos S, Saviano AM, Lourenço FR. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). *Braz J Pharm Sci.* 2018;54:e01006.
30. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. Green analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2008;27(6):497–511.
31. Koel M. Developments in analytical chemistry initiated from green chemistry. *Sustain Chem Environ.* 2024;5:100078.
32. Anastas PT, Kirchhoff MM. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc Chem Res.* 2002;35(9):686–94.
33. Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta.* 2018 May 1;181:204–9. doi:10.1016/j.talanta.2018.01.013 PubMed PMID: 29426502.
34. Kannaiah KP, Sugumaran A, Chanduluru HK, Rathinam S. Environmental impact of greenness assessment tools in liquid chromatography—A review. *Microchem J.* 2021;170:106685.
35. Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends Anal Chem.* 2012;37:61–72.
36. Sc S. Martindale: the complete drug reference. London: pharmaceutical press; 2009.
37. Greenstein GR. The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Emerald Group Publishing Limited; 2007.
38. British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2024.
39. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Arter Hypertens.* 2013;17(2):69–168.
40. Syed YY. Perindopril/indapamide/amlodipine in hypertension: a profile of its use. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2022;22(2):219–30.
41. El-Bagary RI, Elkady EF, Mowaka S, Attallah MA. A validated HPLC method for simultaneous determination of perindopril arginine, amlodipine, and indapamide: application in bulk and in different pharmaceutical dosage forms. *J AOAC Int.* 2017;100(4):992–9.
42. Patel K, Chhalotiya U, Kachhiya H, Patel J, Shah D, Nagda D. Simultaneous quantification of perindopril erbumine, indapamide and amlodipine besylate in newer combination of anti-hypertensive drugs in pharmaceutical dosage form by thin layer chromatography method. *Sep Sci Plus.* 2020;3(5):175–84.
43. Patel KP, Chhalotiya UK, Kachhiya HM, Patel JK. A new RP–HPLC method for simultaneous quantification of perindopril erbumine, indapamide, and amlodipine besylate in bulk and pharmaceutical dosage form. *Future J Pharm Sci.* 2020;6(1):80.
44. Saleh SS, Lotfy HM, Tiris G, Erk N, Rostom Y. Analytical tools for greenness assessment of chromatographic approaches: Application to pharmaceutical combinations of Indapamide, Perindopril and Amlodipine. *Microchem J.* 2020;159:105557.

45. Maggio RM, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;49:57–70.
46. Guideline I. Stability testing of new drug substances and products. Q1A R2 Curr Step. 2003;4(1–24).
47. González-González O, Ramirez IO, Ramirez BI, O’Connell P, Ballesteros MP, Torrado JJ, et al. Drug Stability: ICH versus Accelerated Predictive Stability Studies. *Pharmaceutics.* 2022 Nov;14(11):11. doi:10.3390/pharmaceutics14112324
48. Kaya SI, Ozcelikay-Akyildiz G, Ozkan SA. Green metrics and green analytical applications: A comprehensive outlook from developing countries to advanced applications. *Green Anal Chem.* 2024;11:100159.
49. Cetinkaya A, Kaya SI, Ozkan SA. An overview of the current progress in green analytical chemistry by evaluating recent studies using greenness assessment tools. *TrAC Trends Anal Chem.* 2023;168:117330.
50. Irshad K, Akash MSH, Rehman K, Imran I. Principles of Pharmaceutical Analysis in Drug Stability and Chemical Kinetics. In: *Drug Stability and Chemical Kinetics.* Springer; 2020. p. 1–18.
51. Loftsson T. Drug stability for pharmaceutical scientists. Academic press; 2014.
52. Atkins PW, De Paula J, Keeler J. Atkins’ physical chemistry. Oxford university press; 2023.
53. González-González O, Ramirez IO, Ramirez BI, O’Connell P, Ballesteros MP, Torrado JJ, et al. Drug stability: ICH versus accelerated predictive stability studies. *Pharmaceutics.* 2022;14(11):2324.
54. Gumieniczek A, Galeza J, Berecka A, Mroczek T, Wojtanowski K, Lipska K, et al. Chemical stability and interactions in a new antihypertensive mixture containing indapamide and dihydralazine using FT-IR, HPLC and LC-MS methods. *RSC Adv.* 2018;8(63):36076–89.
55. Duda-Seiman C, Vlase T, Vlase G, Duda-Seiman D, Albu P, Doca N. Thermal analysis study of amlodipine as pure compound and in binary mixture. *J Therm Anal Calorim.* 2011;105(2):677–83.
56. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *J Pharm Anal.* 2014;4(3):159–65.
57. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B.* 2009;877(23):2224–34.
58. Kazakevich YV, Lobrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. John Wiley & Sons; 2006.
59. Peris-Vicente J, Esteve-Romero J, Carda-Broch S. Validation of analytical methods based on chromatographic techniques: An overview. *Anal Sep Sci.* 2015;1757–808.
60. Dong MW. Modern HPLC for Practicing Scientists: John Wiley & Sons. Inc Hoboken N J. 2006;17-46.10.
61. 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(5–6):723–53.
62. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation

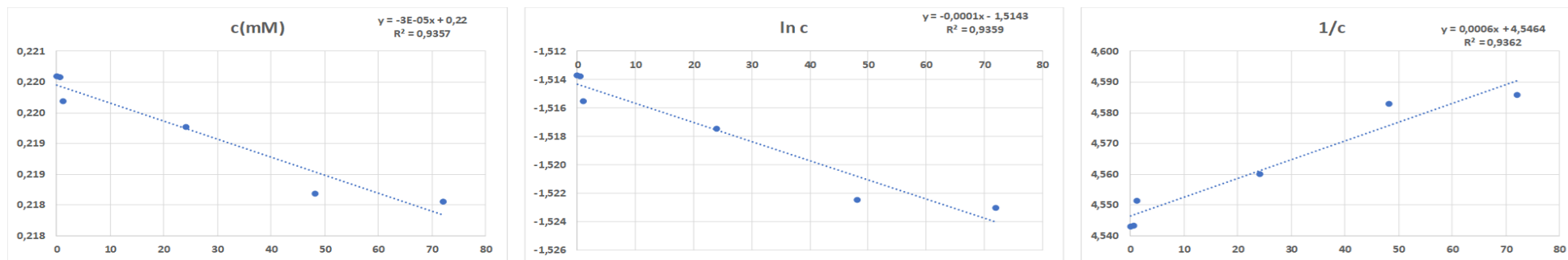
- requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A*. 2003;987(1–2):57–66.
63. Celia C, Di Marzio L, Locatelli M, Ramundo P, D'Ambrosio F, Tartaglia A. Current trends in simultaneous determination of Co-administered drugs. *Separations*. 2020;7(2):29.
 64. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem*. 2013;50:78–84.
 65. Keith LH, Gron LU, Young JL. Green Analytical Methodologies. *Chem Rev*. 2007 Jun 1;107(6):2695–708. doi:10.1021/cr068359e
 66. Tobiszewski M, Marć M, Gałuszka A, Namieśnik J. Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules*. 2015;20(6):10928–46.
 67. Nowak PM, Wietecha-Posłuszny R, Pawliszyn J. White analytical chemistry: an approach to reconcile the principles of green analytical chemistry and functionality. *TrAC Trends Anal Chem*. 2021;138:116223.
 68. Sheldon RA. The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chem*. 2017;19(1):18–43.
 69. Tobiszewski M, Namieśnik J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environ Pollut*. 2012;162:110–9.
 70. de la Guardia M, Garrigues S. Handbook of green analytical chemistry. Vol. 794. Wiley Online Library; 2012.
 71. Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 2005 Apr 11;293(1):101–25. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.12.013
 72. Baertschi SW, Alsante KM, Reed RA. Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation. CRC Press; 2016.
 73. Temussi F, Cermola F, DellaGreca M, Iesce MR, Passananti M, Previtera L, et al. Determination of photostability and photodegradation products of indomethacin in aqueous media. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;56(4):678–83. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.07.005
 74. De Luca M, Ioele G, Ragno G. 1, 4-Dihydropyridine antihypertensive drugs: Recent advances in photostabilization strategies. *Pharmaceutics*. 2019;11(2):85.
 75. Triggle DJ. 1, 4-Dihydropyridines as calcium channel ligands and privileged structures. *Cell Mol Neurobiol*. 2003;23(3):293–303.
 76. Vossen AC van der, Velde I van der, Smeets OSM, Postma DJ, Vermes A, Koch BCP, et al. Design and stability study of an oral solution of amlodipine besylate for pediatric patients. *Eur J Pharm Sci*. 2016;92:220–3. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.019
 77. Mandić-Kovacević N, Kasagić-Vujanović I, Gatarić B, Škrbić R, Popović Bijelić A. Study of the Acidic, Basic, and Thermal Degradation Kinetics of Three Antihypertensive Drugs—Individually and in Combination. *Pharmaceutics*. 2024 Nov;16(11):1410. doi:10.3390/pharmaceutics16111410
 78. Tonnesen HH. Photostability of drugs and drug formulations. CRC Press; 2004.

79. Kim DW, Weon KY. Pharmaceutical application and development of fixed-dose combination: Dosage form review. *J Pharm Investig.* 2021;51(5):555–70.
80. Chadha R, Bhandari S. Drug–excipient compatibility screening—role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;87:82–97.
81. Veronica N, Heng PWS, Liew CV. Ensuring Product Stability—Choosing the Right Excipients. *J Pharm Sci.* 2022;111(8):2158–71.
82. Aulton ME, Taylor K. *Aulton’s Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines.* Elsevier Health Sciences; 2013. 909 p.
83. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of pharmaceutical excipients.* 6. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.
84. Rhodes C. *Drug Stability, Revised, And Expanded: Principles and Practices.* 2000.
85. Connors KA, Amidon GL, Stella VJ. *Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists.* John Wiley & Sons; 1986.
86. Waterman KC, Carella AJ, Gumkowski MJ, Lukulay P, MacDonald BC, Roy MC, et al. Improved protocol and data analysis for accelerated shelf-life estimation of solid dosage forms. *Pharm Res.* 2007;24(4):780–90.
87. Yoshioka S, Stella VJ. *Stability of drugs and dosage forms.* Springer; 2002.
88. Buda, V.; Andor, M.; Ledeti, A.; Ledeti, I.; Vlase, G.; Vlase, T.; Cristescu, C.; Voicu, M.; Suciu, L.; Tomescu, M.C. Comparative Solid-State Stability of Perindopril Active Substance vs. Pharmaceutical Formulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 164. <https://doi.org/10.3390/ijms18010164>
89. Xu, J.; Zhou, S.; Du, E.; Sha, Y.; Zheng, L.; Peng, M.; Ling, L. Kinetics, Mechanism, and Toxicity of Amlodipine Degradation by the UV/Chlorine Process. *Water* 2020, 12, 3150. <https://doi.org/10.3390/w12113150>
90. Gumieniczek, A.; Galeza, J.; Berecka, A.; Mroczek, T.; Wojtanowski, K.; Lipska, K.; Skarbek, J., Chemical stability and interactions in a new antihypertensive mixture containing indapamide and dihydralazine using FT-IR, HPLC and LC-MS methods. *RSC Advances* 2018, 8 (63), 36076-36089. <https://doi.org/10.1039/c8ra06707d>
91. Abbas, K.; Hussain, M. A.; Bukhari, S. N. A.; Amin, M.; Tahir, M. N.; Bhosale, S. V., Flurbiprofen conjugates based on hydroxyethylcellulose: Synthesis, characterization, pharmaceutical and pharmacological applications. *Arabian Journal of Chemistry* 2020, 13 (1), 2101-2109. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.03.011>
92. Sathuluri K, Bakam R, Jain R, Dande A, Gajbhiye R, Ravichandiran V, et al. Analytical quality by design (AQbD) in the ICHQ14 guidelines for analytical procedure development. *Accreditation Qual Assur.* 2025;30(1):1–14.
93. Mehta M, Mehta D, Mashru R. Recent application of green analytical chemistry: eco-friendly approaches for pharmaceutical analysis. *Future J Pharm Sci.* 2024;10(1):83.
94. Maggio RM, Vignaduzzo SE, Kaufman TS. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;49:57–70.

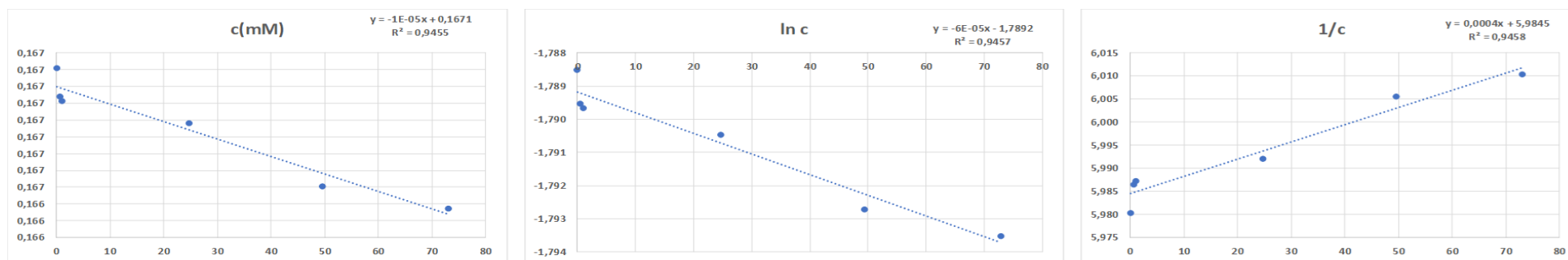
95. Zhao Y, Li B, Zhang W, Zhang L, Zhao H, Wang S, et al. Recent advances in sustainable antimicrobial food packaging: Insights into release mechanisms, design strategies, and applications in the food industry. *J Agric Food Chem*. 2023;71(31):11806–33.
96. Bhangare D, Rajput N, Jadav T, Sahu AK, Tekade RK, Sengupta P. Systematic strategies for degradation kinetic study of pharmaceuticals: an issue of utmost importance concerning current stability analysis practices. *J Anal Sci Technol*. 2022;13(1):7.

7. ПРИЛОЗИ

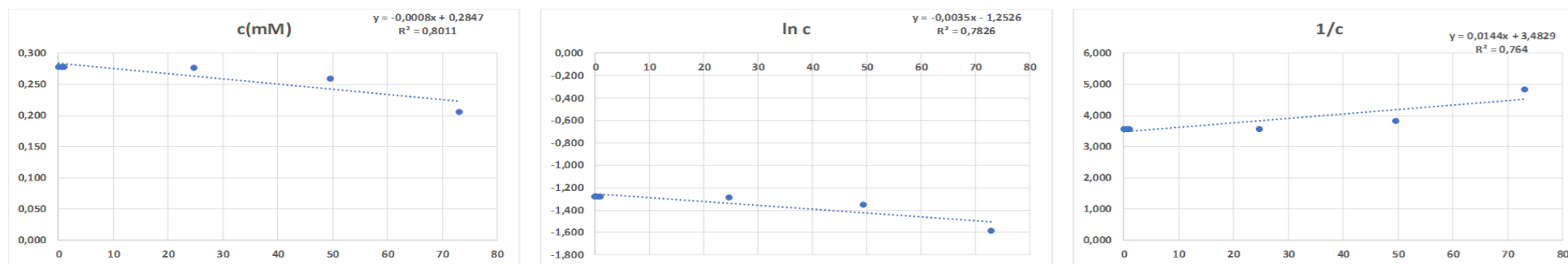
Прилог 1. Кинетички графици коришћени за одређивање реда реакције и константи брзине разградње периндорпил терц-бутиламина, амлодипин бесилата и индапамида појединачно и у бинарним (ПЕР+АМЛ; ПЕР+ИНД; АМЛ+ИНД) и тернарним (ПЕР+АМЛ+ИНД) смешама под утицајем 1М HCL, 0,001М NaOH, 3% H₂O₂, H₂O и УВ/ВИС светлости на собној температури и на 45°C и 65°C.



Слика П1. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М HCl) периндоприл-терц бутиламина

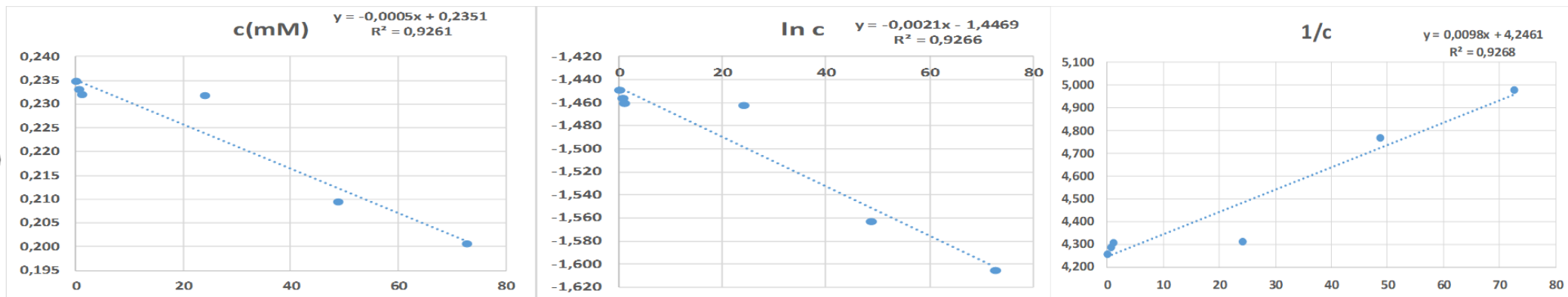


Слика П2. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М HCl) амлодипин бесилата

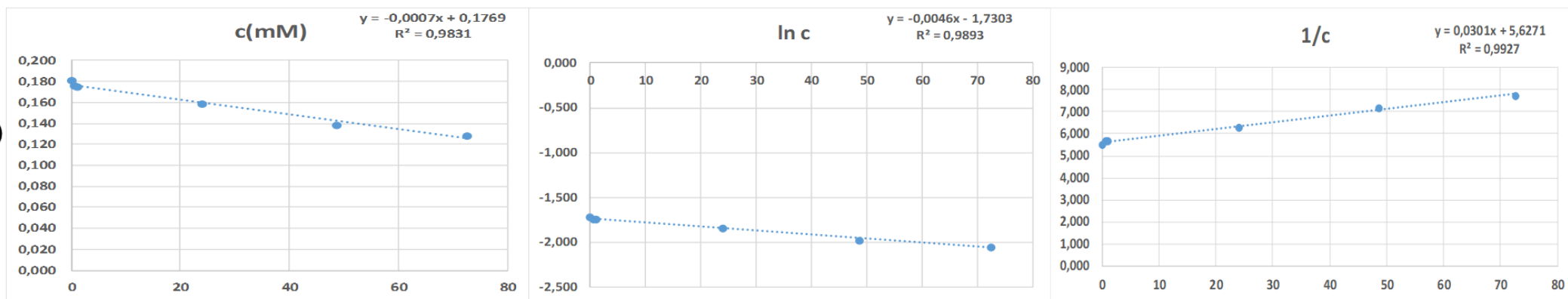


Слика П3. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М HCl) индапамида

а)

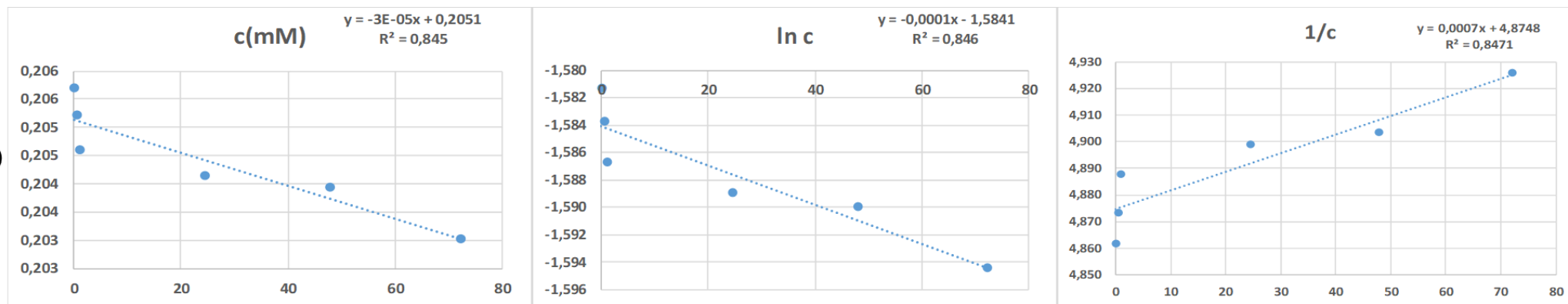


б)

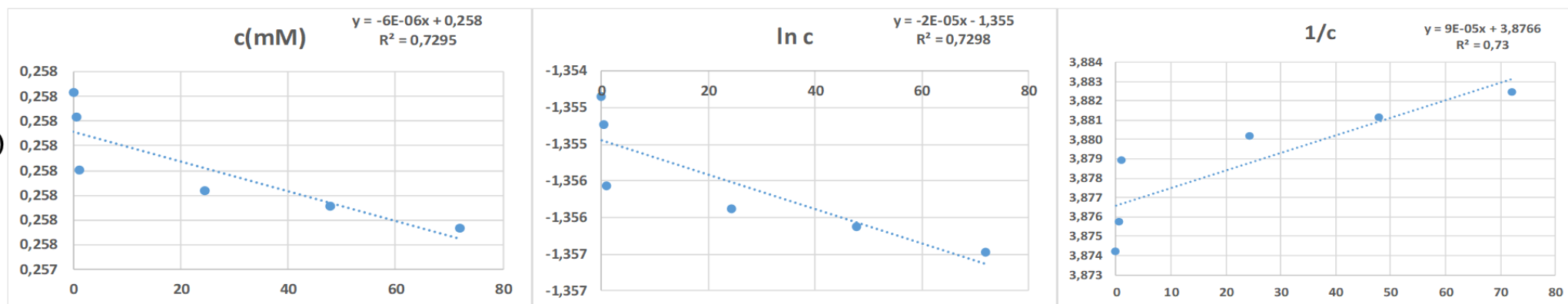


Слика П4. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) а) периндоприл-терц бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеши

a)

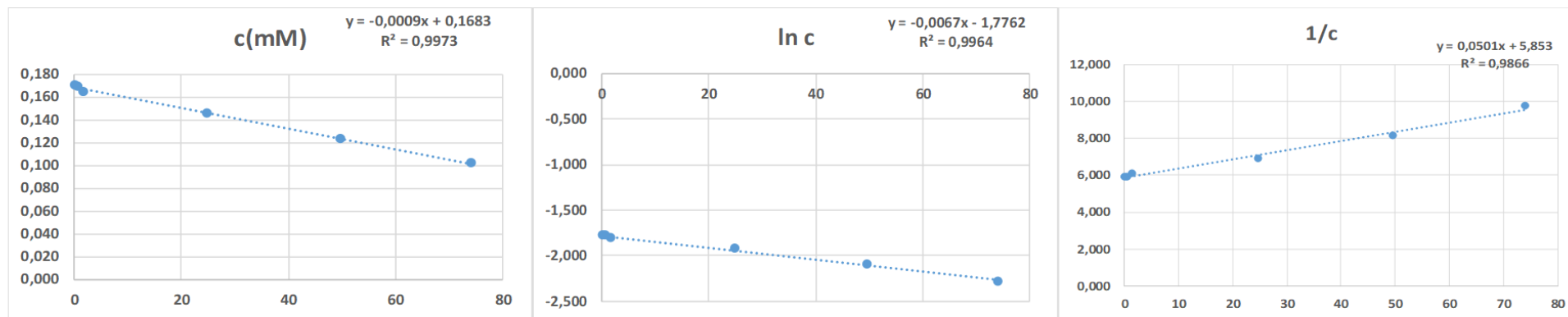


б)

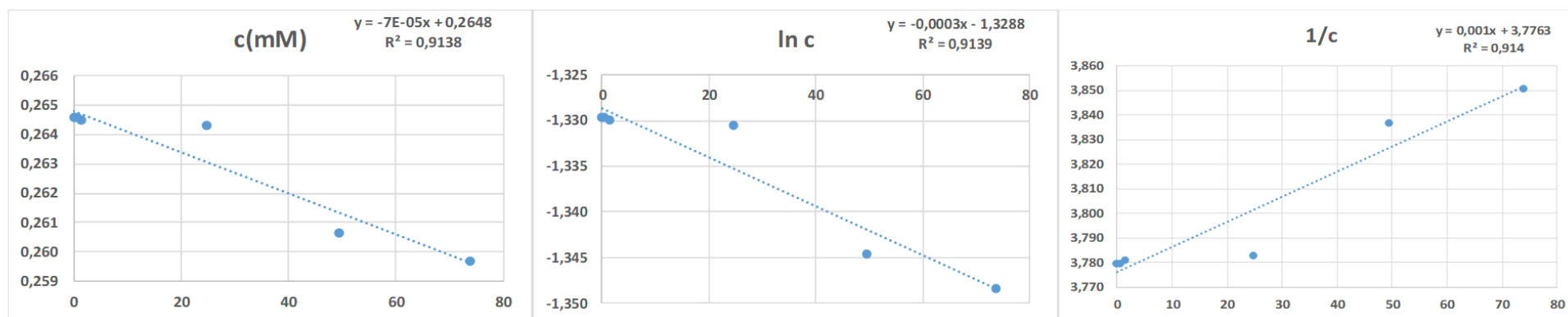


Слика П5. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) а) периндоприл-терц бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

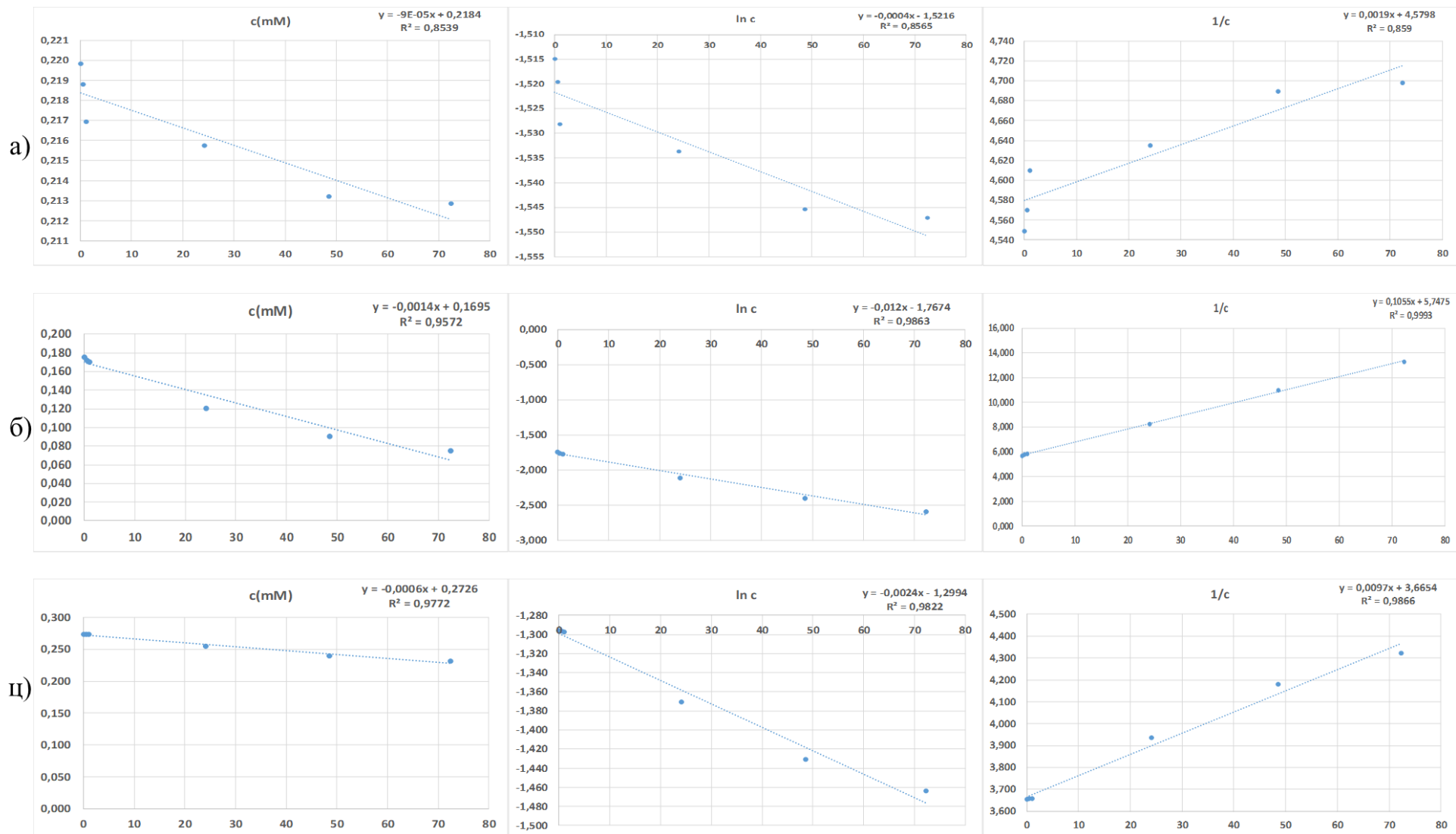
а)



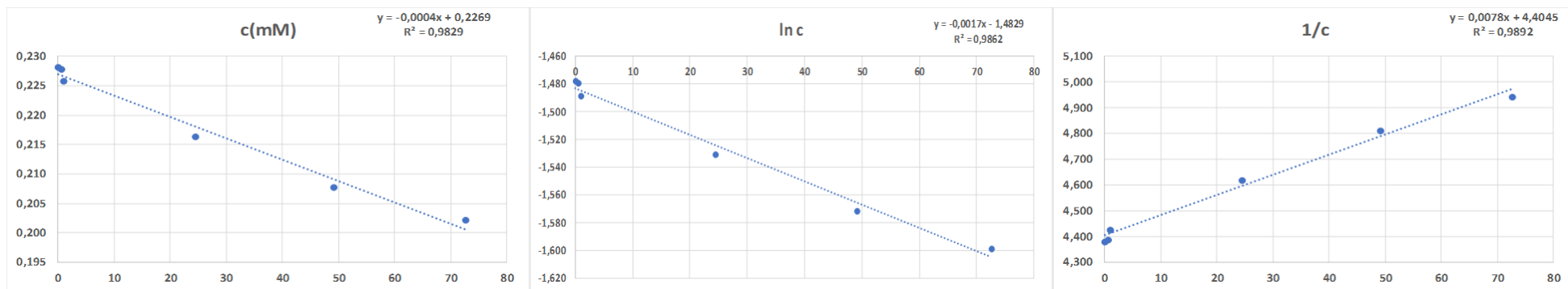
б)



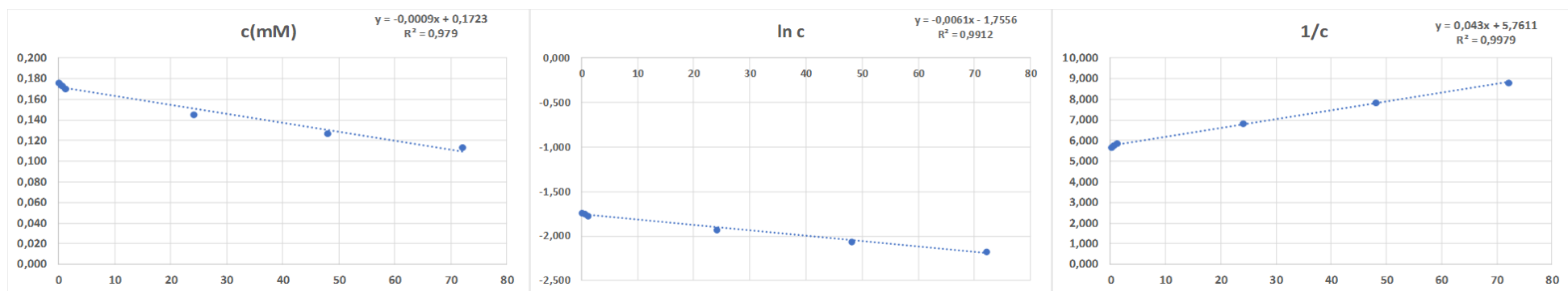
Слика П6. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеши



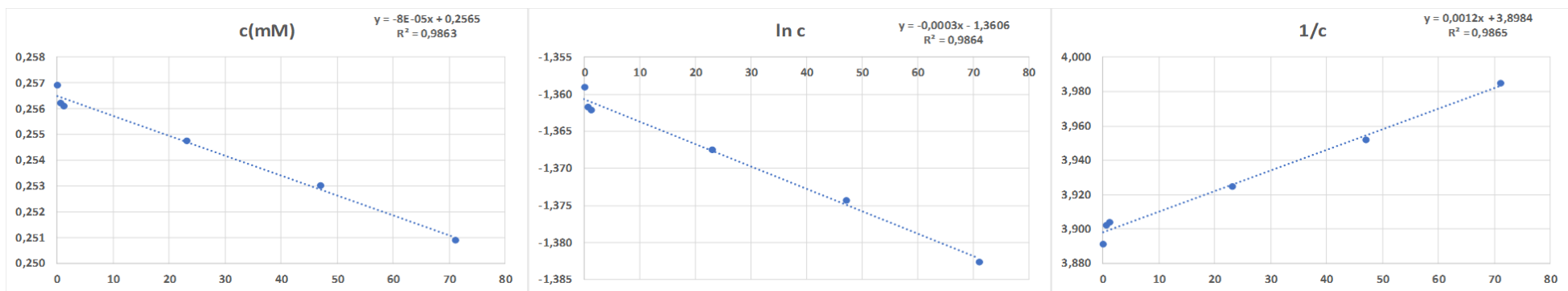
Слика П7. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) а) периндоприл-терц бутиламина, б) амлодипин бесилата и в) индапамида у тернарној смеси



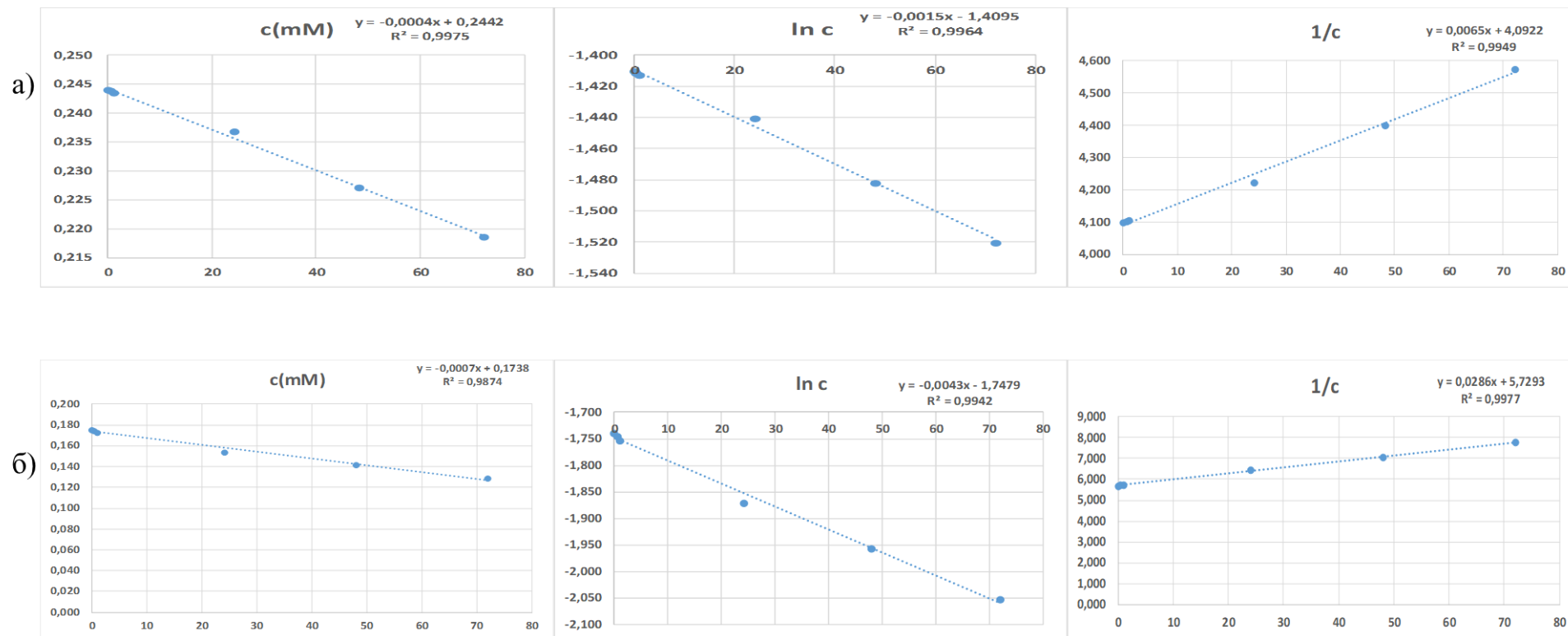
Слика П8. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) периндоприл-терц бутиламина



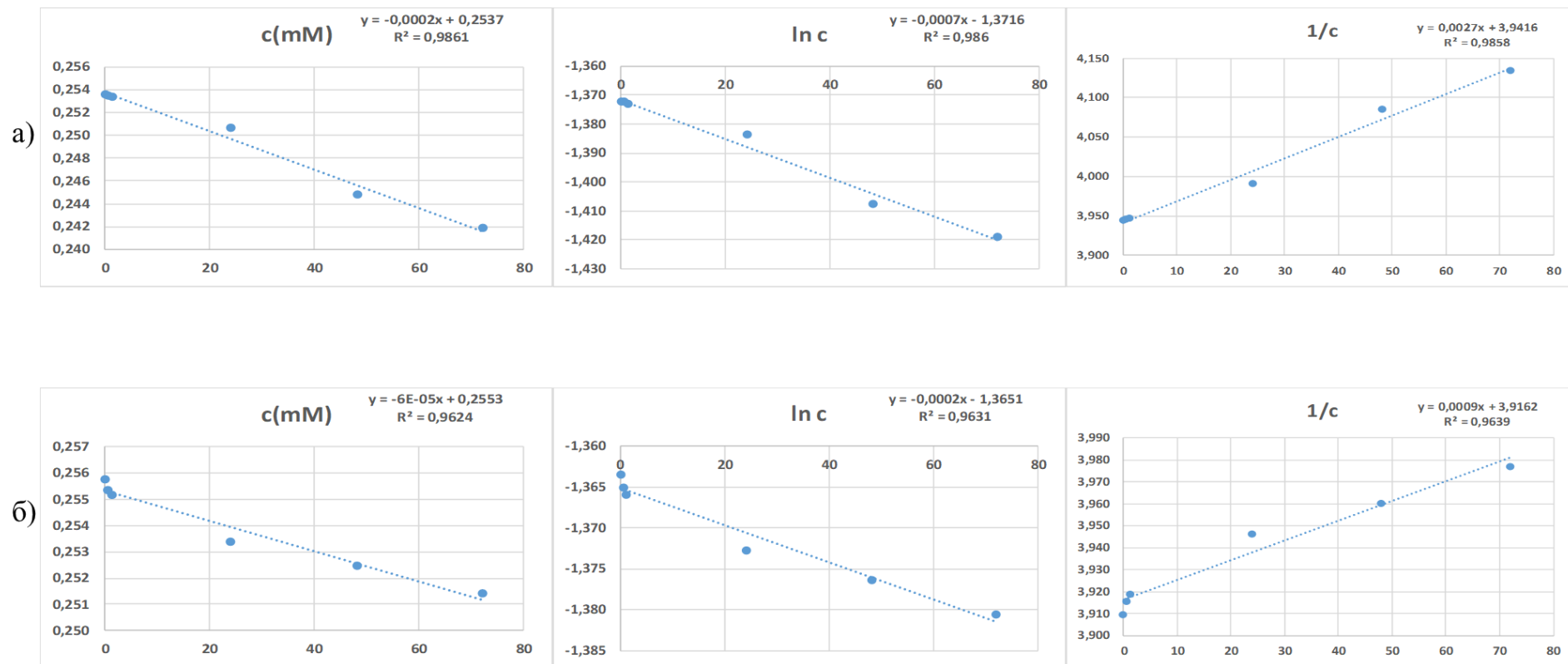
Слика П9. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) амлодипин бесилата



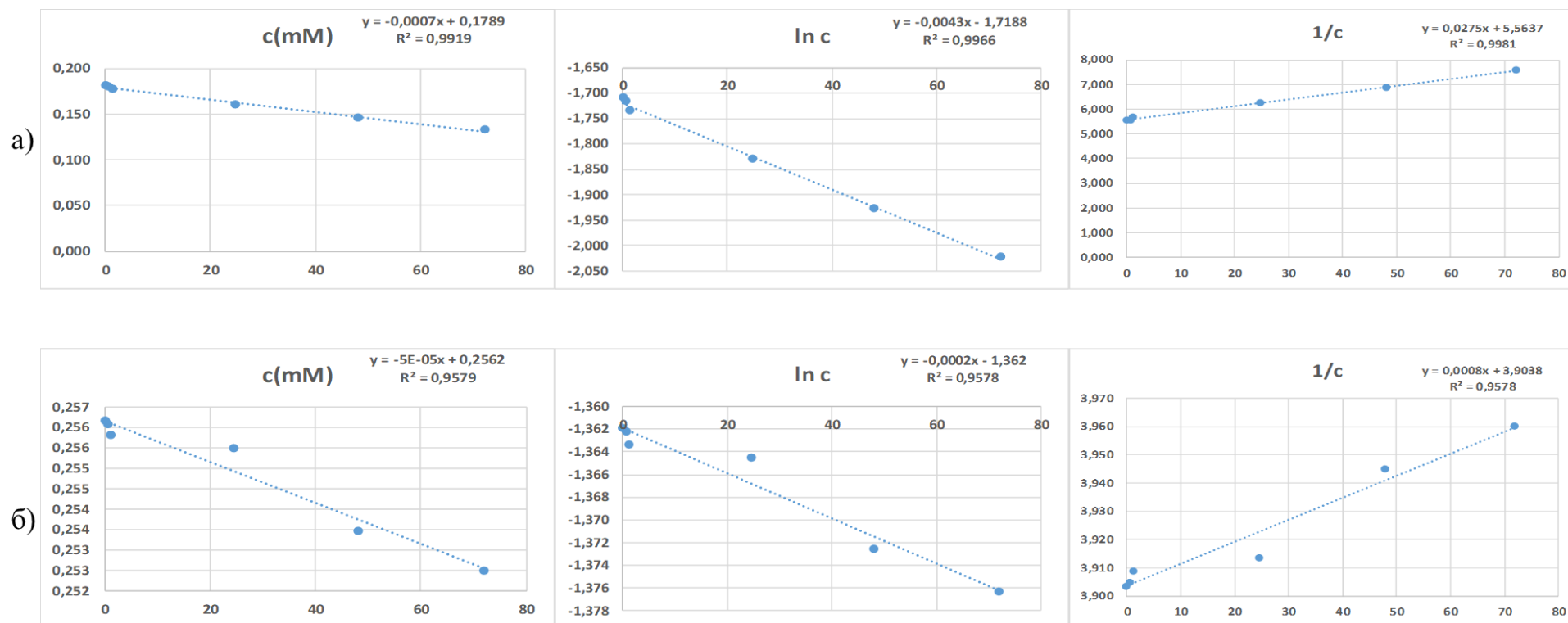
Слика П10. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) индапамида



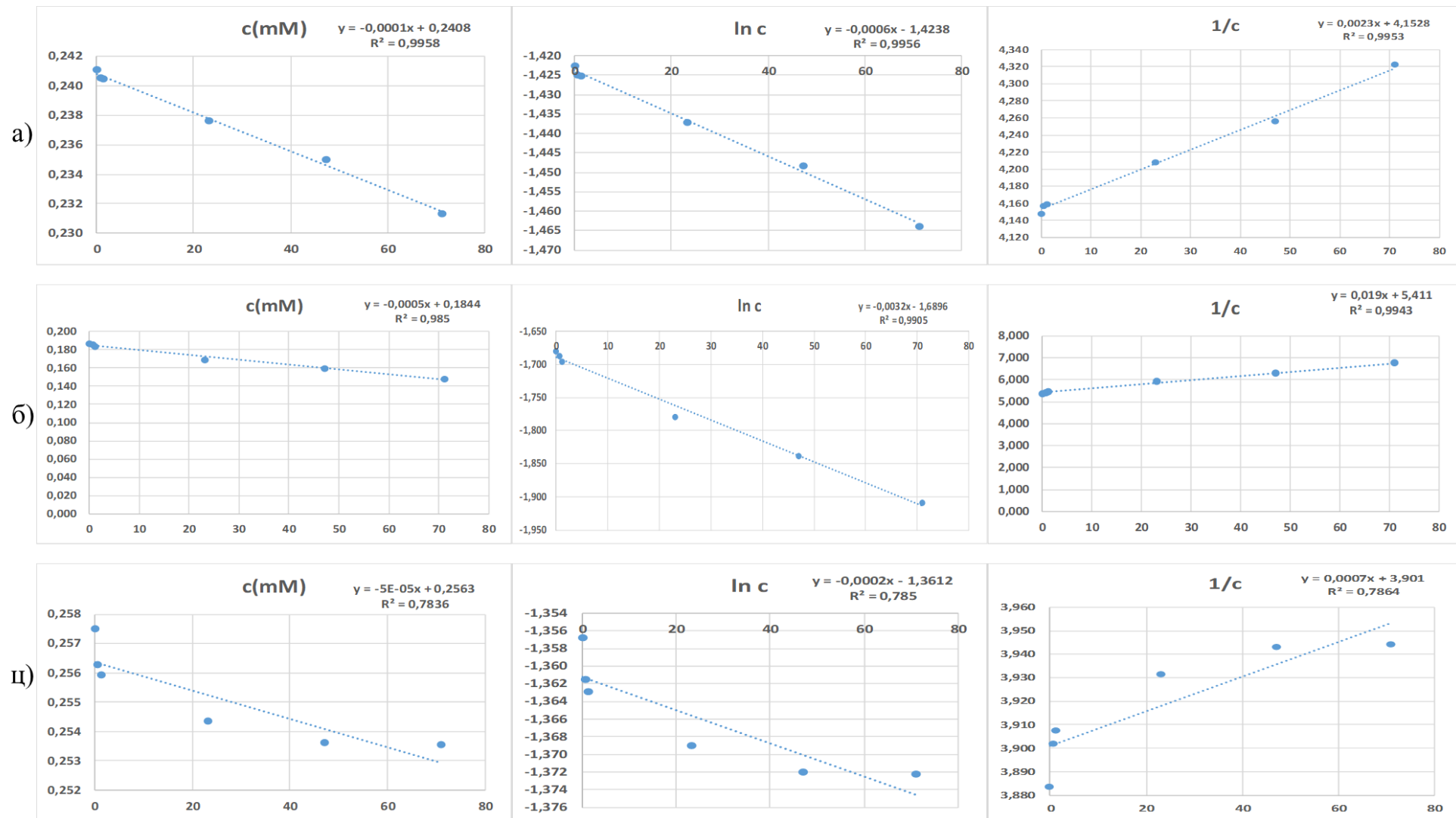
Слика П11. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеши



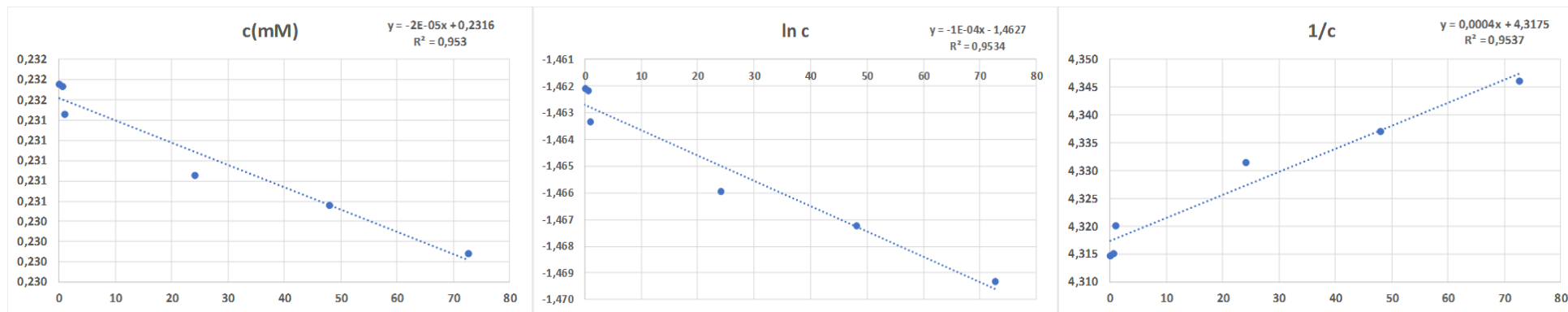
Слика П12. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси



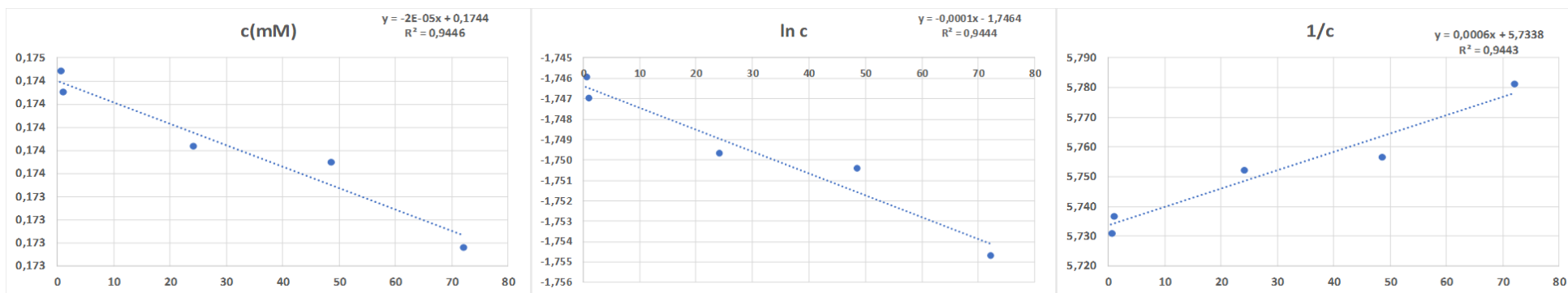
Слика П13. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 M NaOH) а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеси



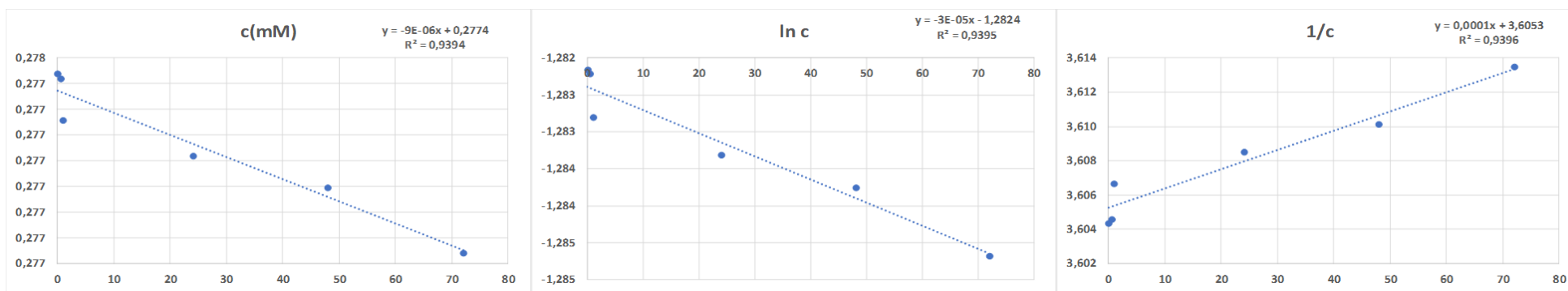
Слика П14. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) а) периндоприл-терц бутиламина, б) амлодипин бесилата и в) индапамида у тернарној смеси



Слика П15. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) периндоприл-терц бутиламина

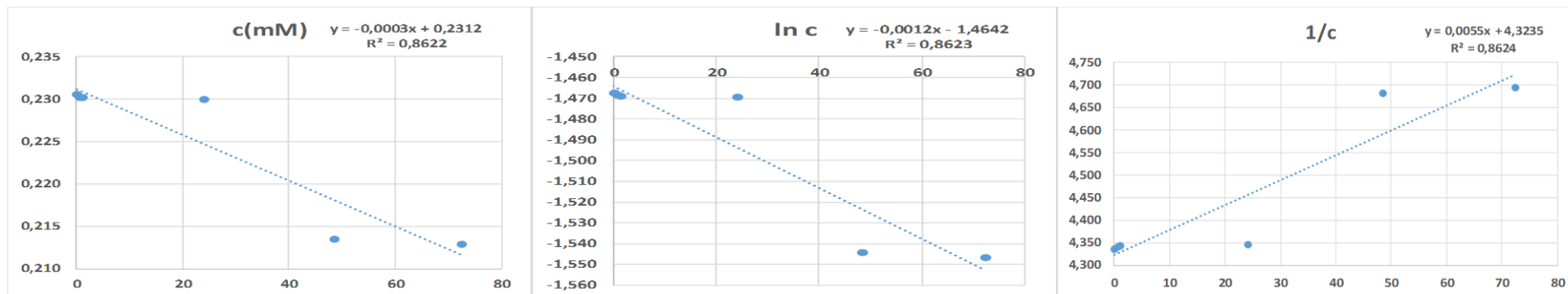


Слика П16. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) амлодипин бесилата

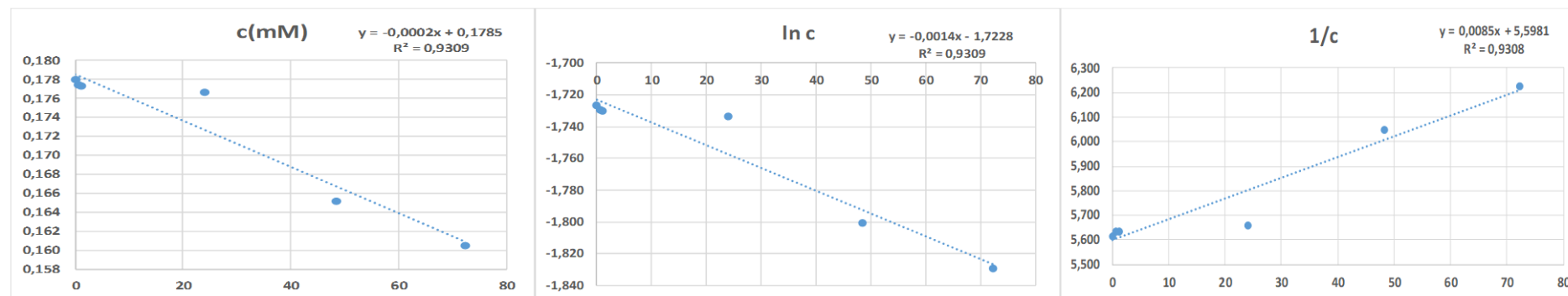


Слика П17. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) индапамида

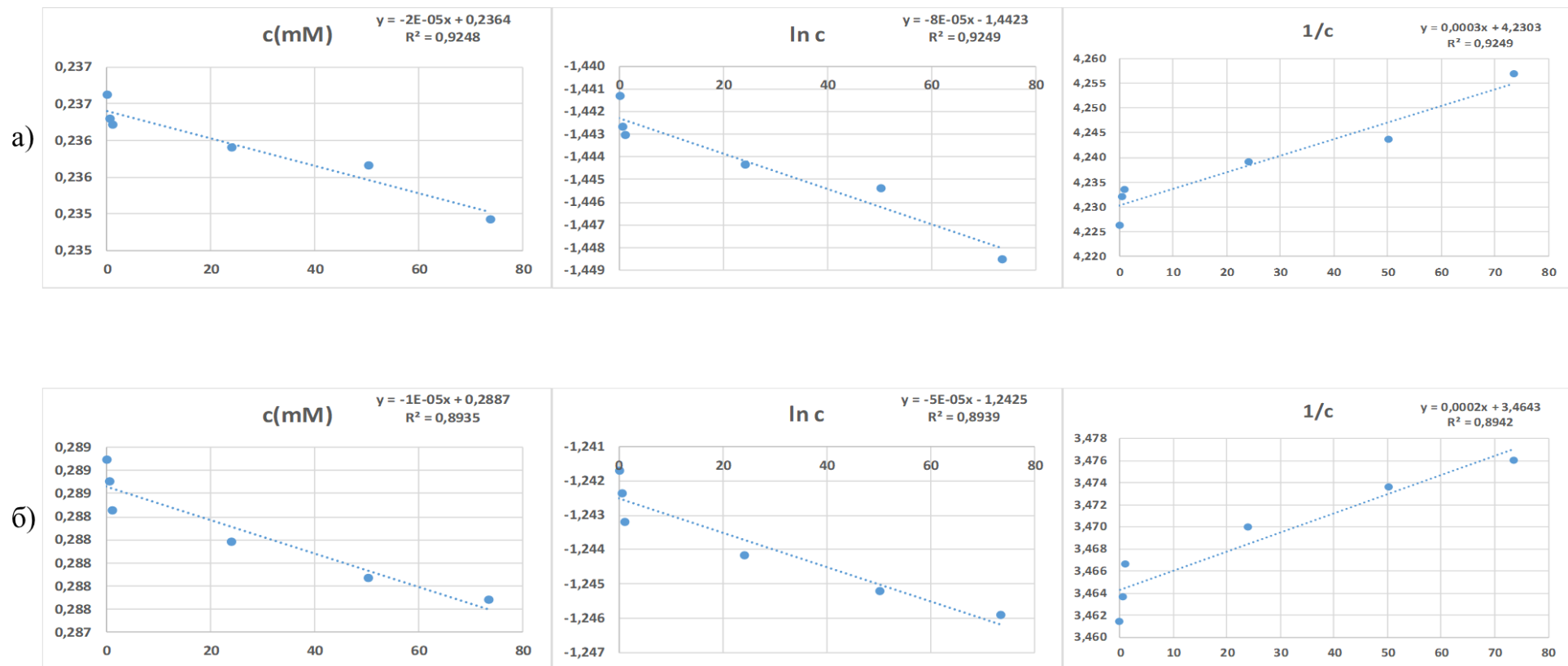
а)



б)

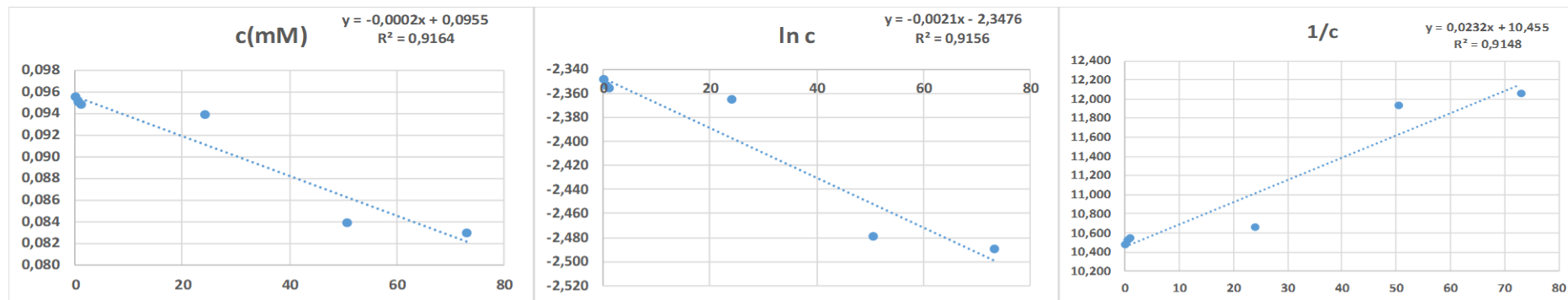


Слика П18. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеши

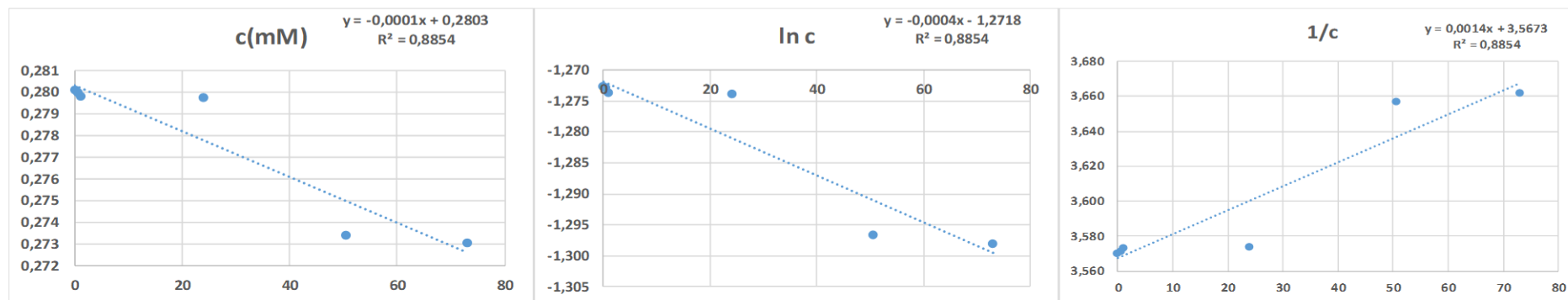


Слика П19. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

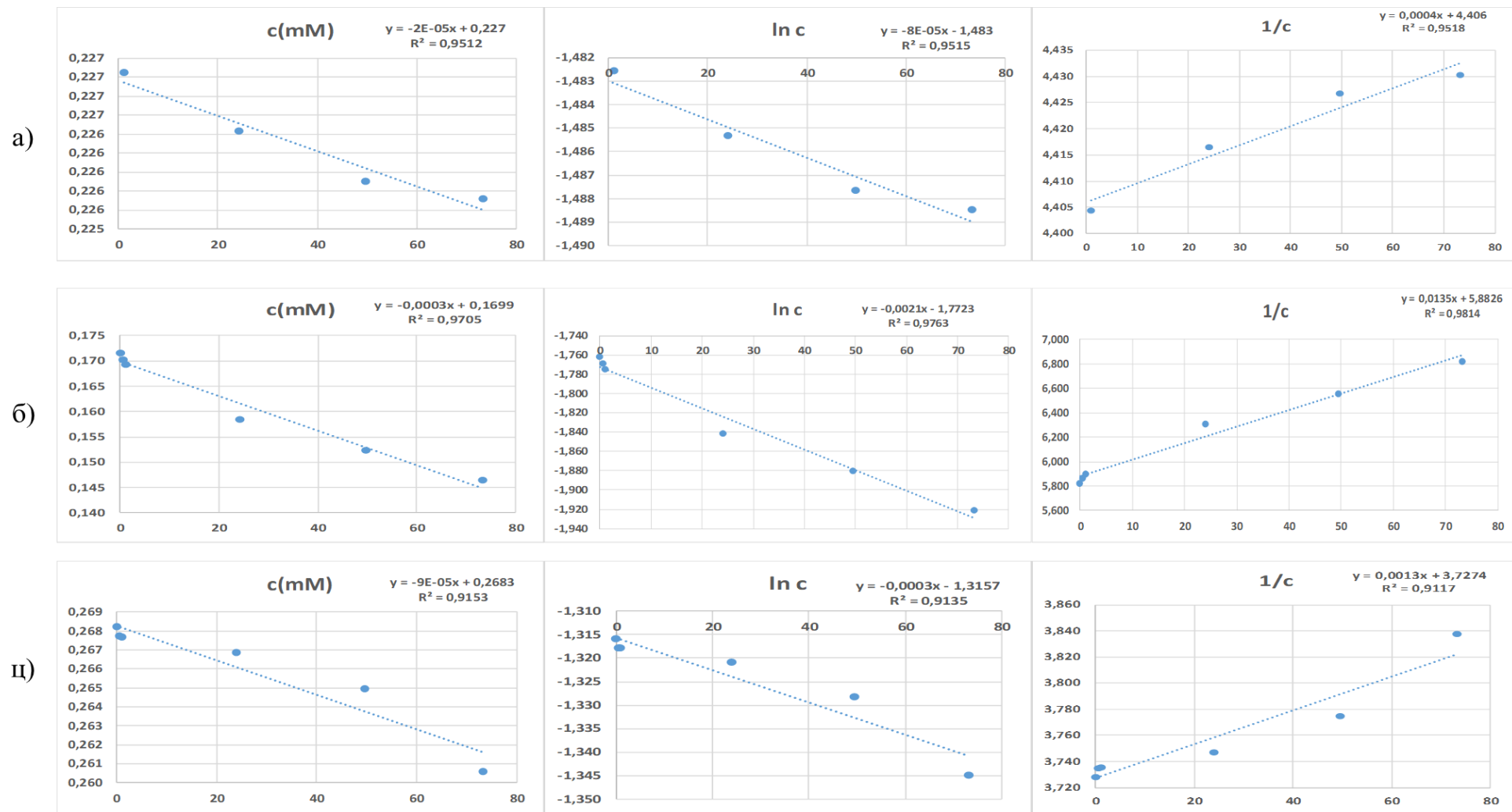
а)



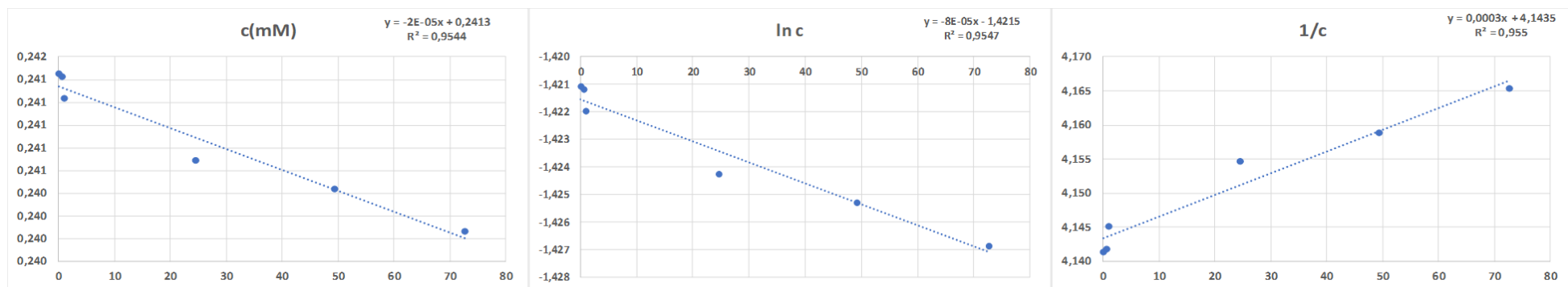
б)



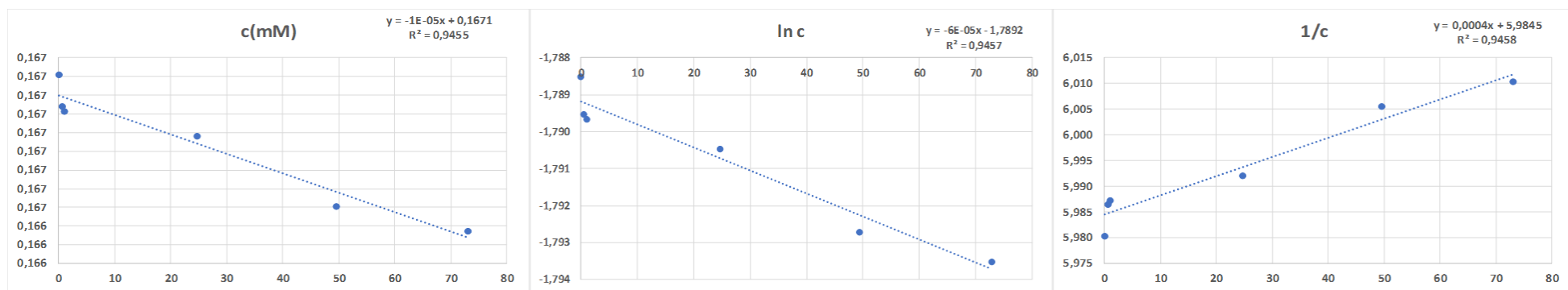
Слика П20. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеси



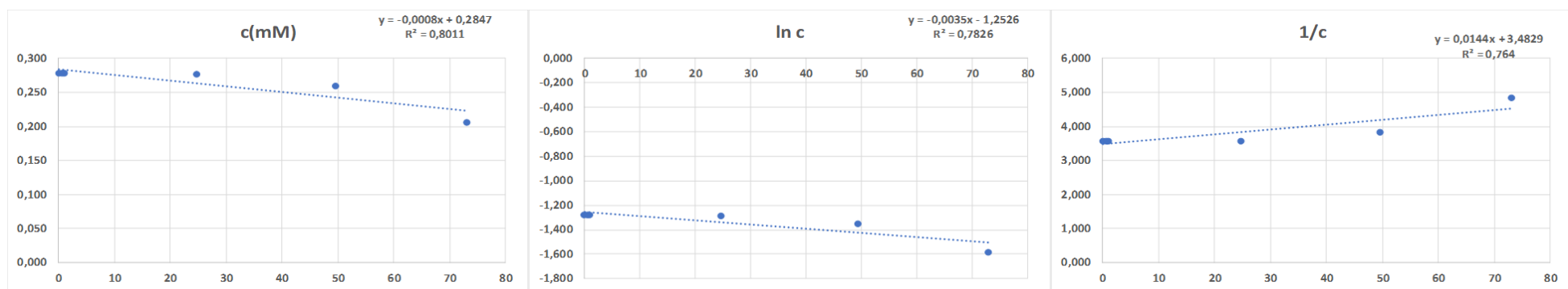
Слика П21. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) а) периндоприл-терц бутиламина, б) амлодипин бесилата и ц) индапамида у тернарној смеси



Слика П22. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције фотолизе периндоприл-терц бутиламина

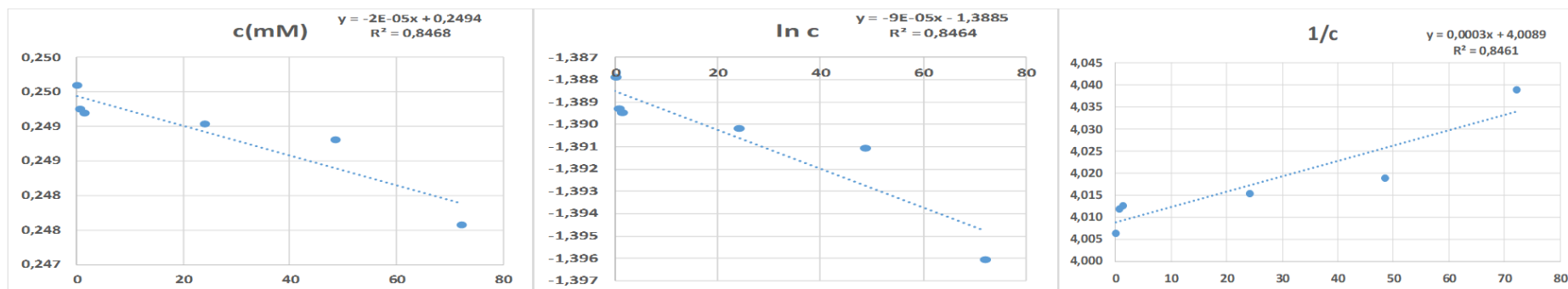


Слика П23. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције фотолизе амлодипин бесилата

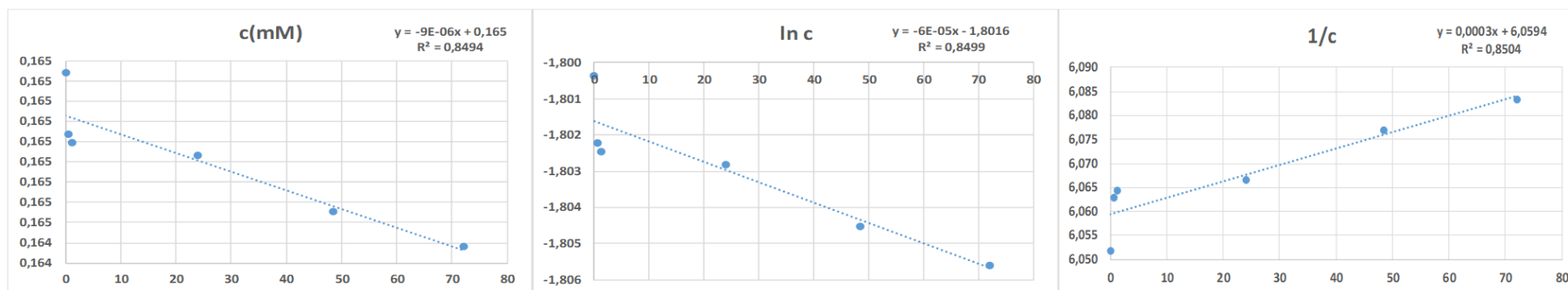


Слика П24. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције фотолизе индапамида

a)

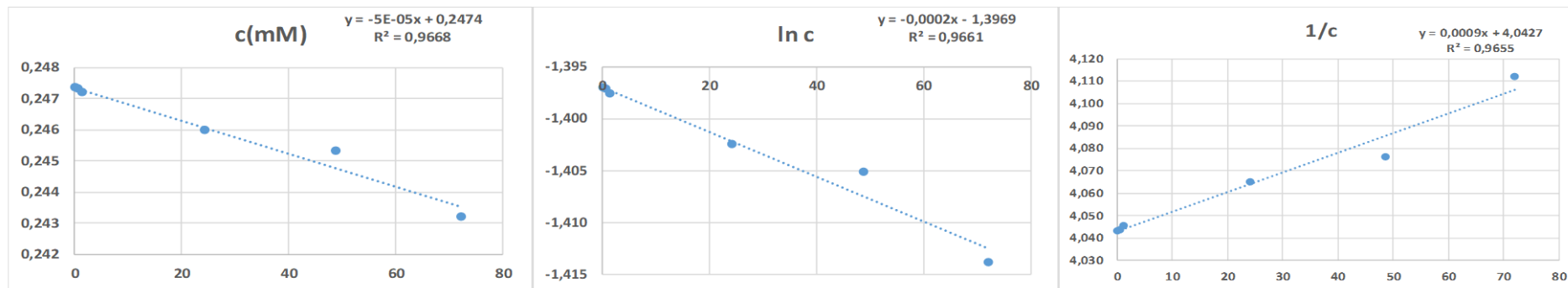


б)

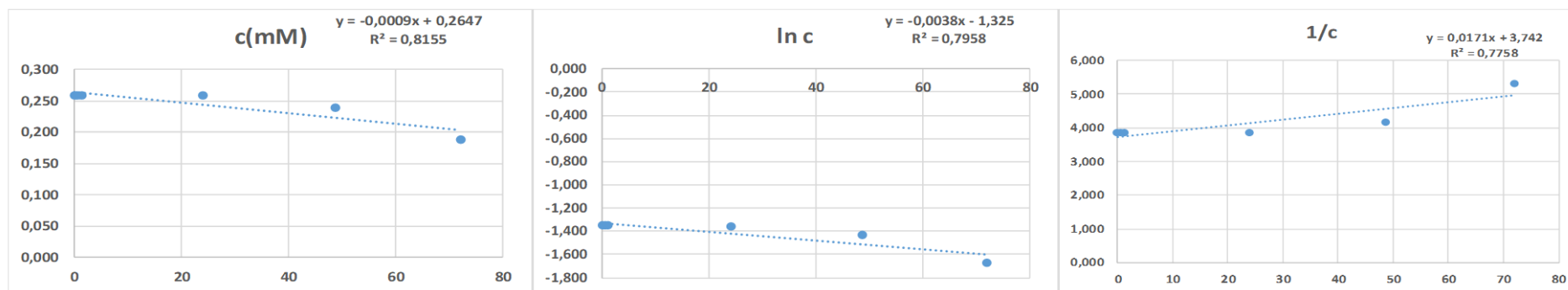


Слика П25. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције фотолизе а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеши

а)

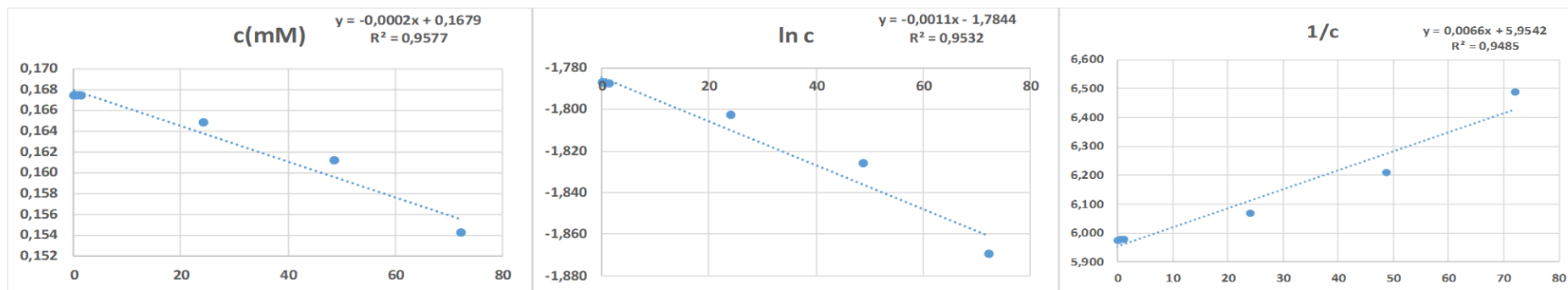


б)

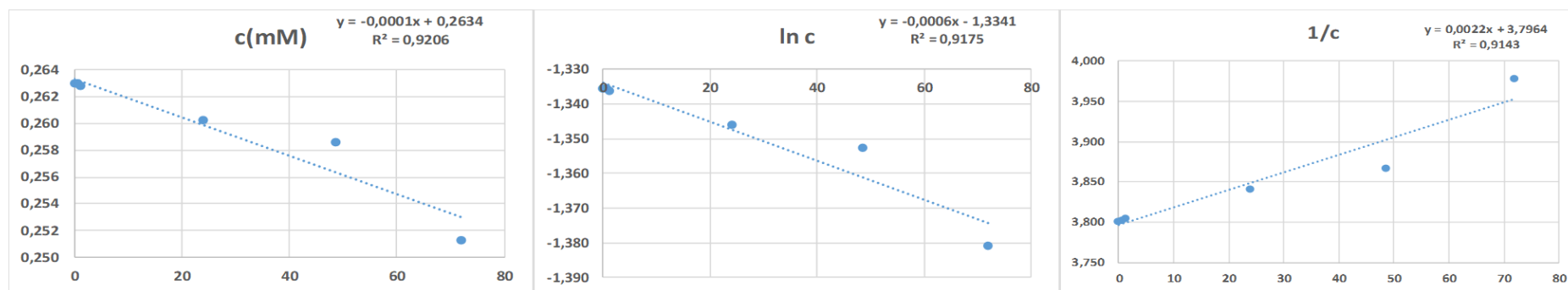


Слика П26. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције фотолизе а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

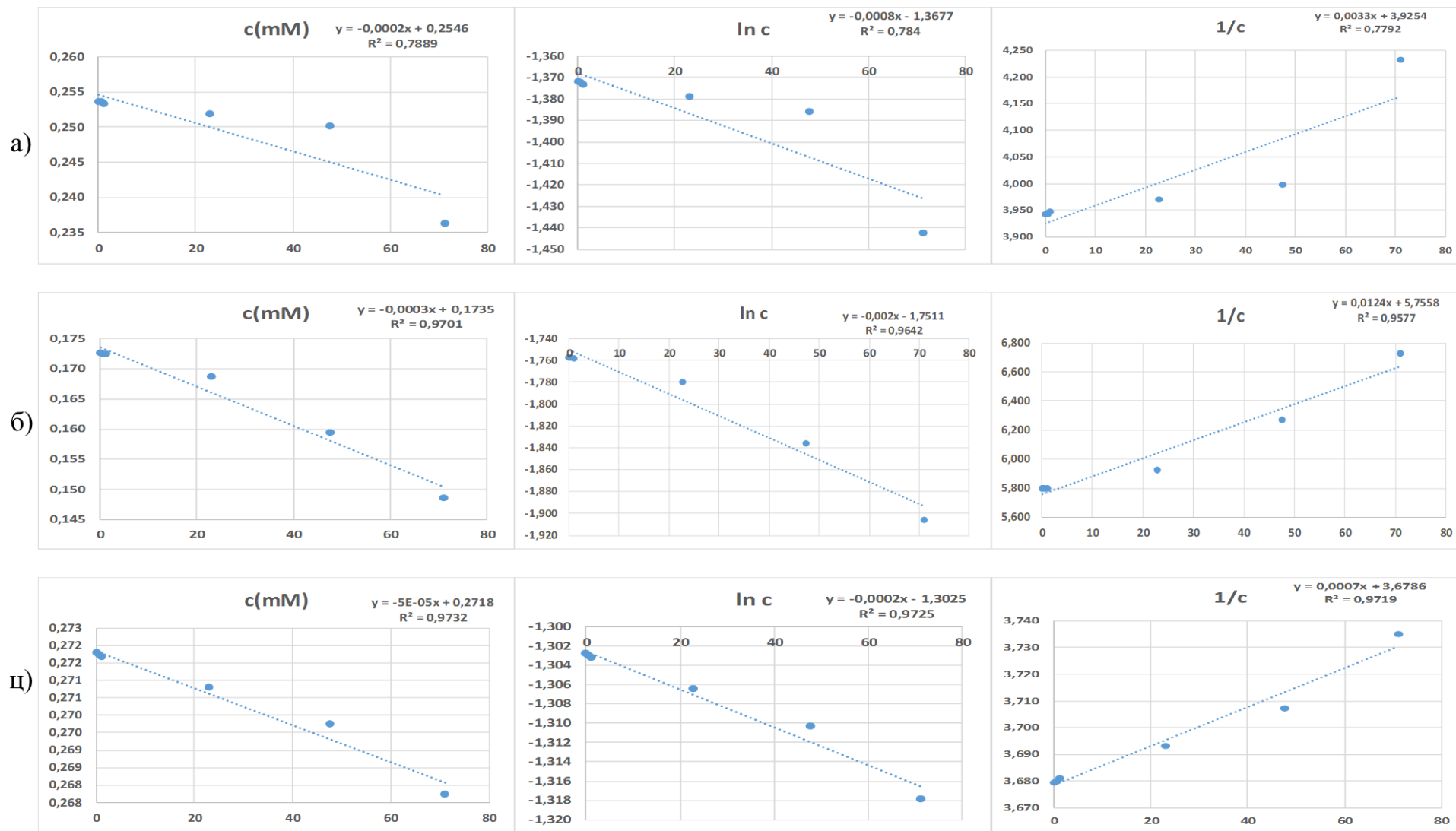
а)



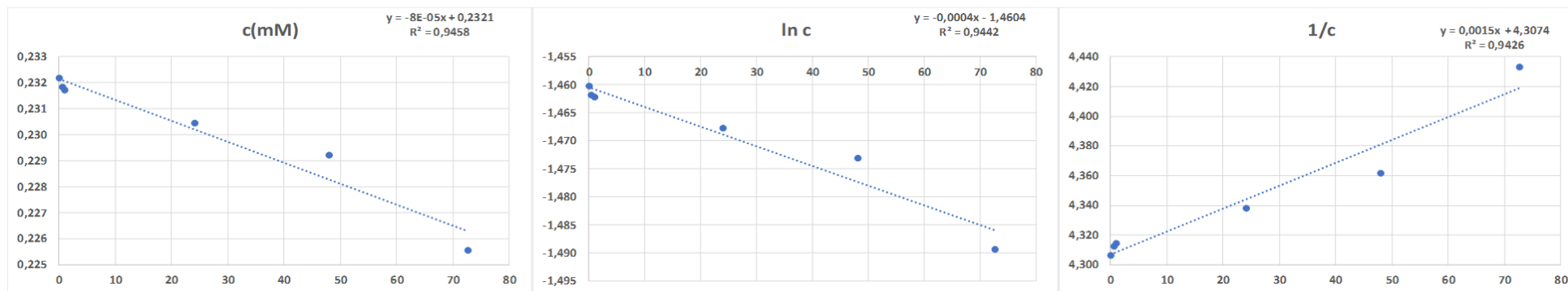
б)



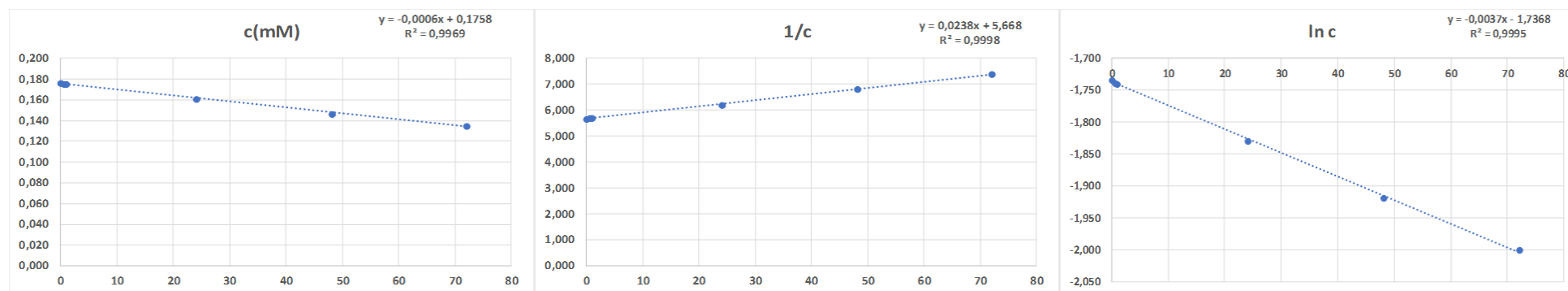
Слика П27. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције фотолизе а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеши



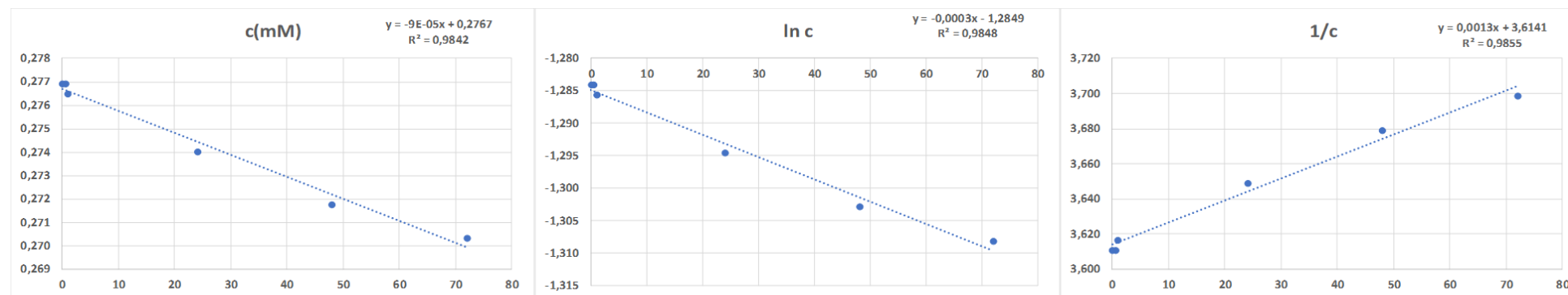
Слика П28. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције фотолизе а) периндоприл-терц бутиламина, б) амлодипин бесилата и в) индапамида у тернарној смеси



Слика П29. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције оксидације (3% H_2O_2) периндоприл-терц бутиламина

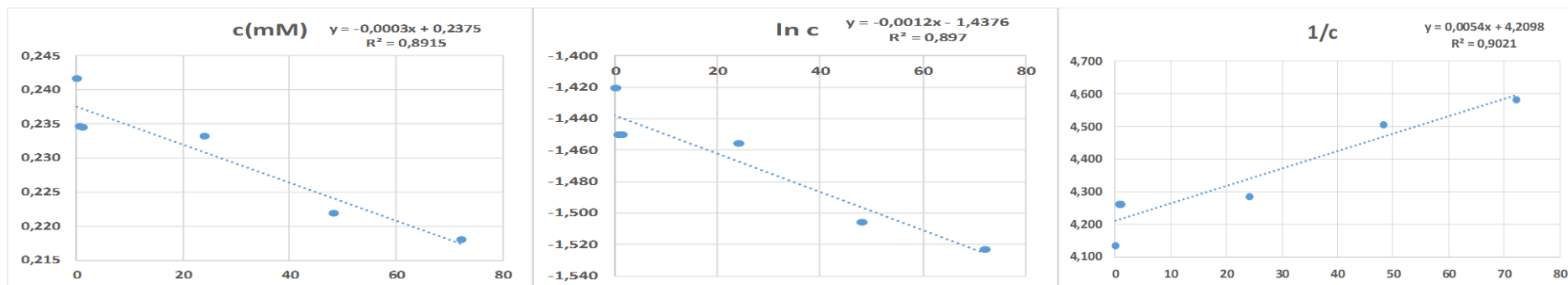


Слика П30. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције оксидације (3% H_2O_2) амлодипин бесилата

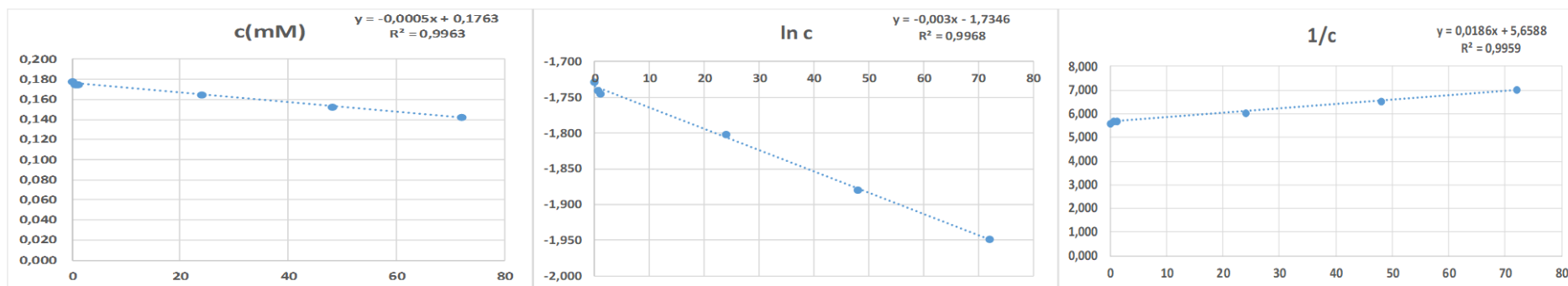


Слика П31. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције оксидације (3% H_2O_2) индапамида

а)

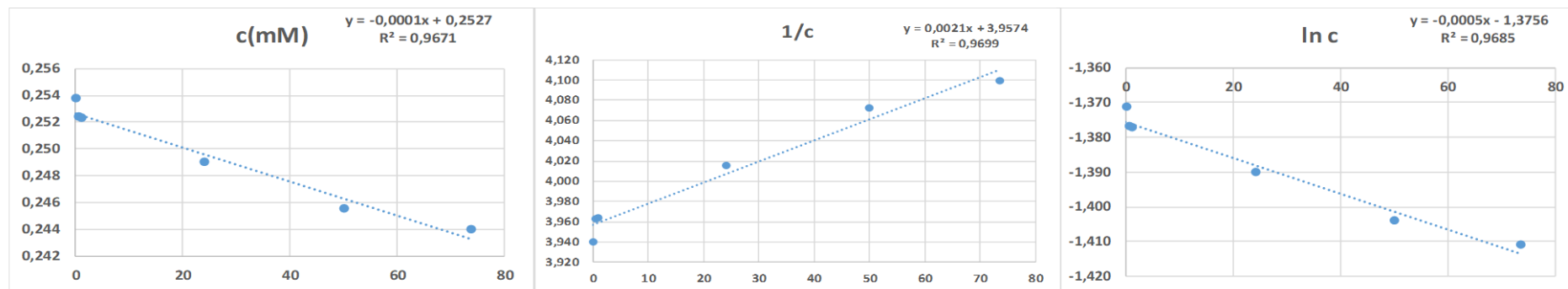


б)

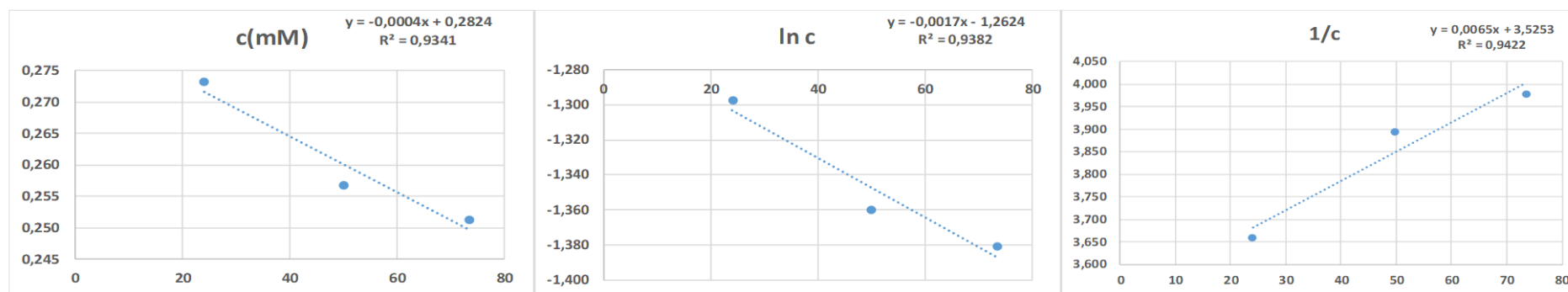


Слика П32. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције оксидације (3% H_2O_2) а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеси

а)

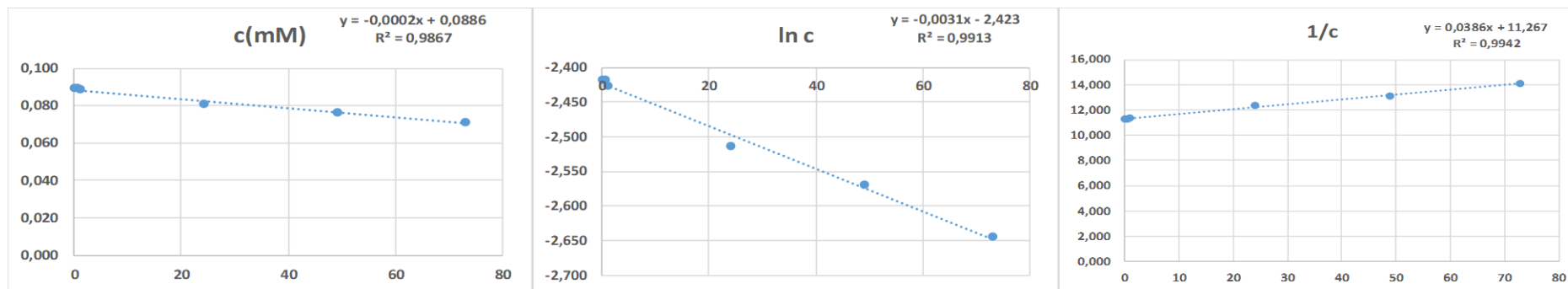


б)

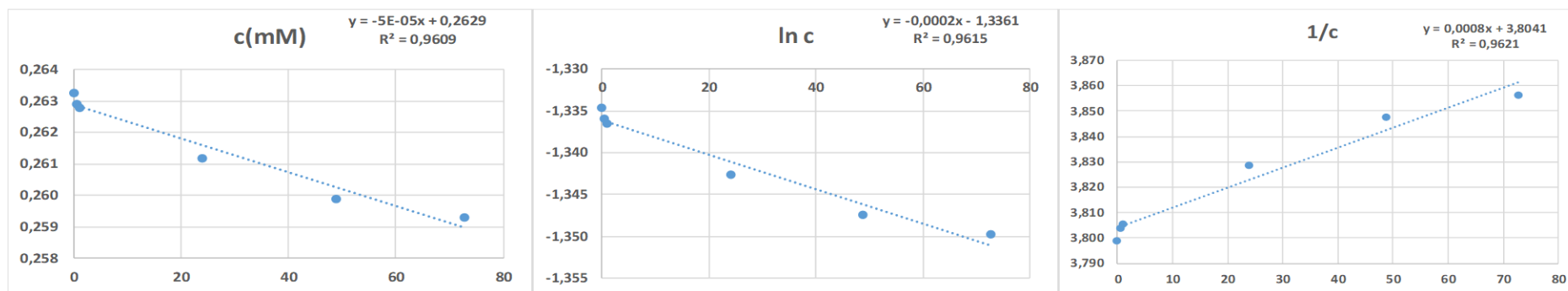


Слика П33. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције оксидације (3% H_2O_2) а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

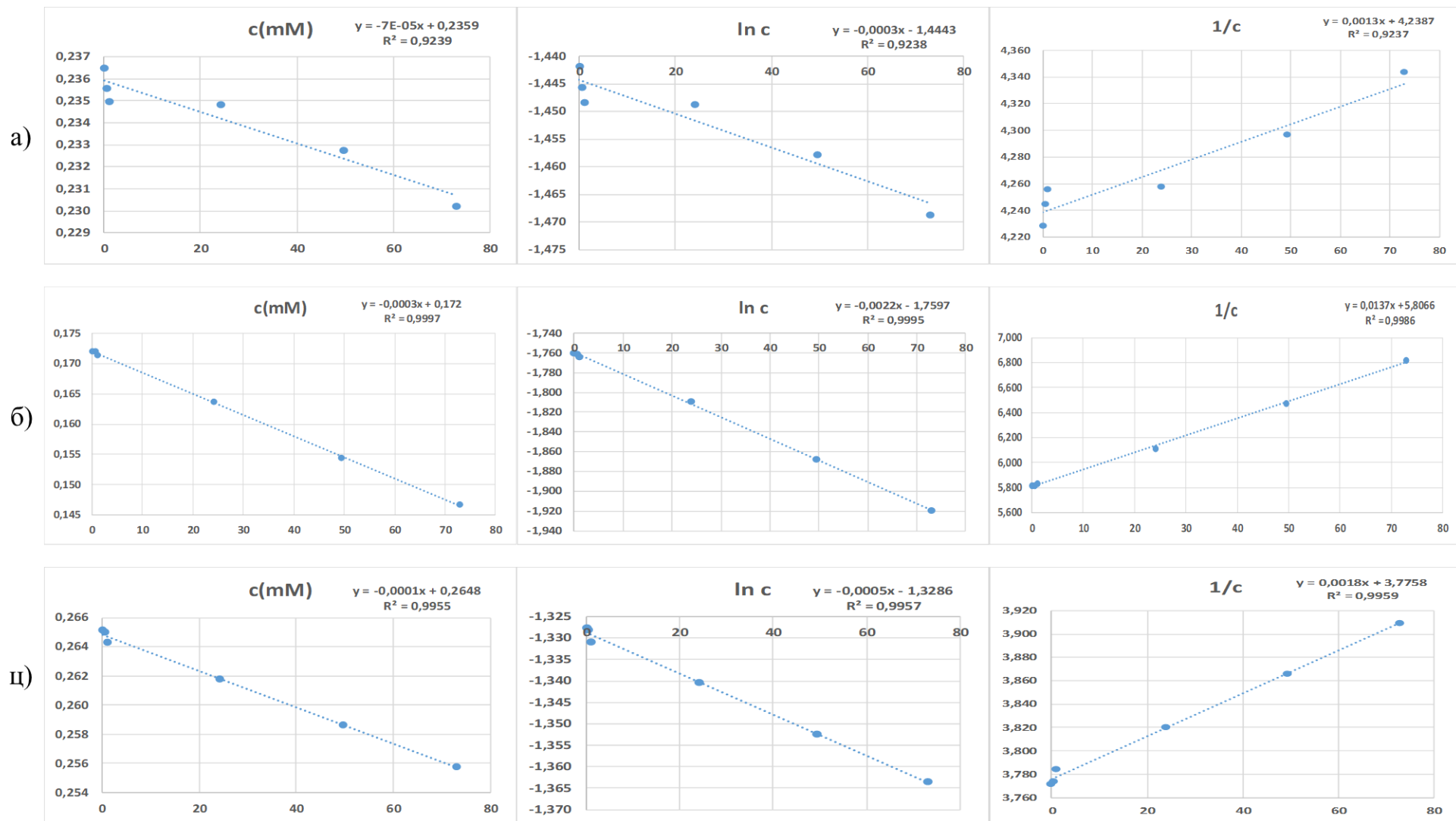
а)



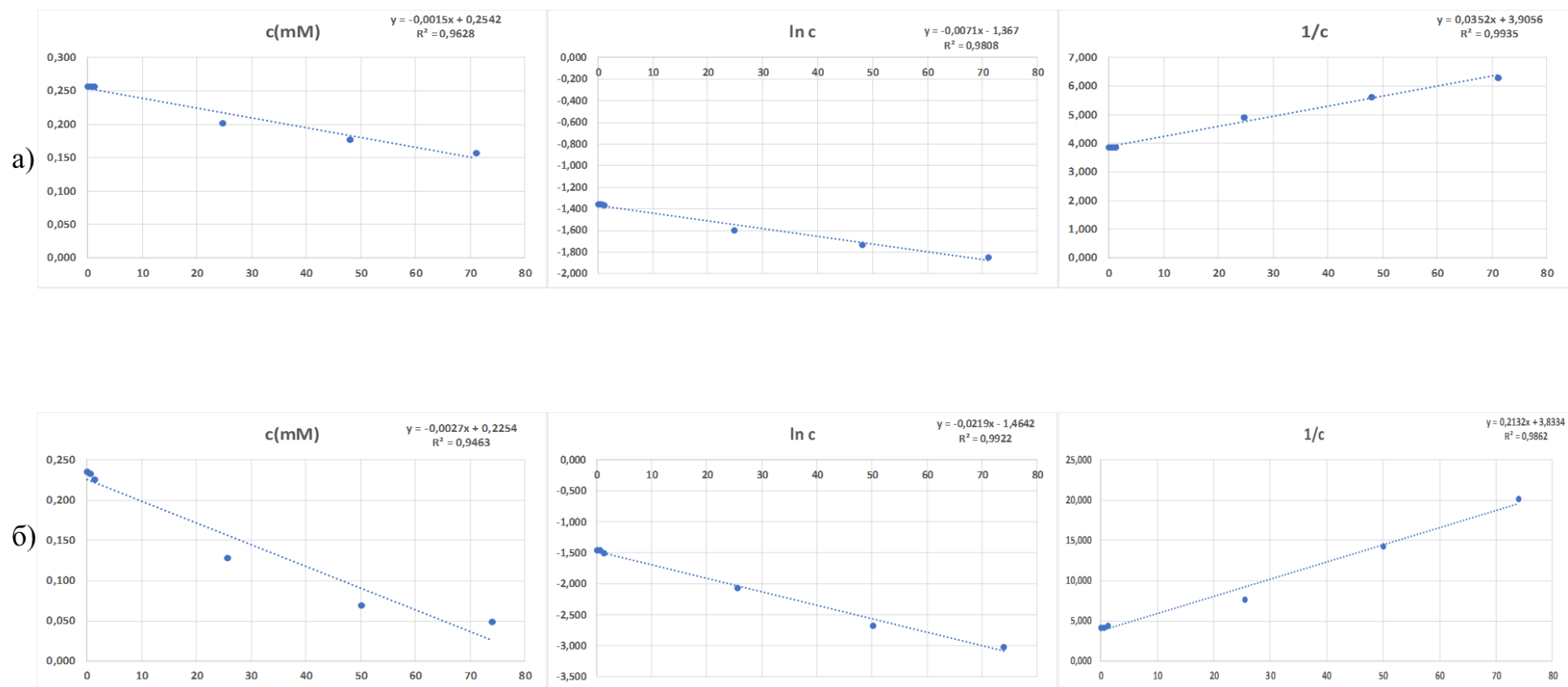
б)



Слика П34. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције оксидације (3% H_2O_2) а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеси

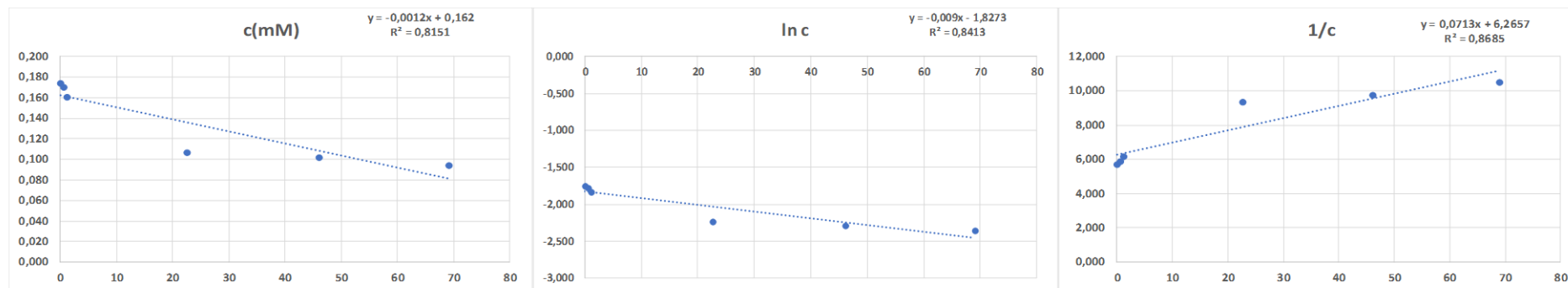


Слика П35. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције оксидације (3% H₂O₂) а) периндоприл-терц бутиламина, б) амлодипин бесилата и ц) индапамида у тернарној смеси

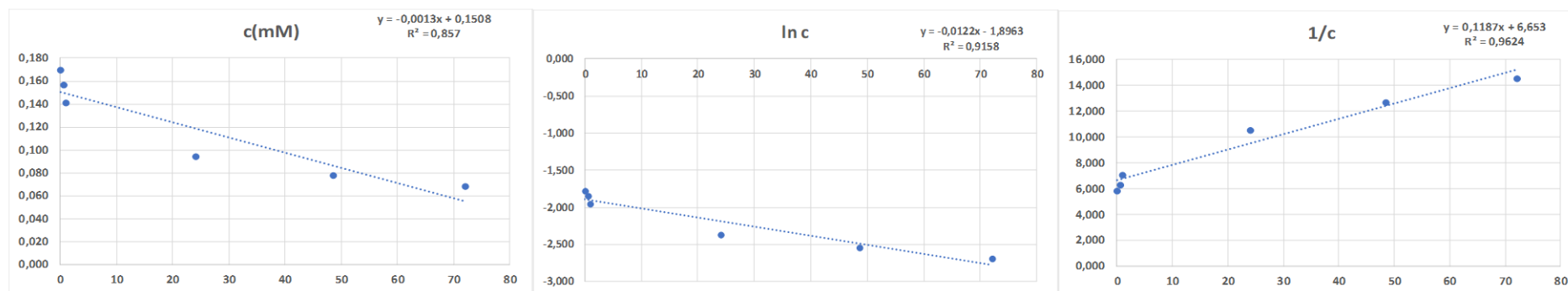


Слика П36. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) периндоприл терц-бутиламина на а) 45°C и б) 65°C

а)

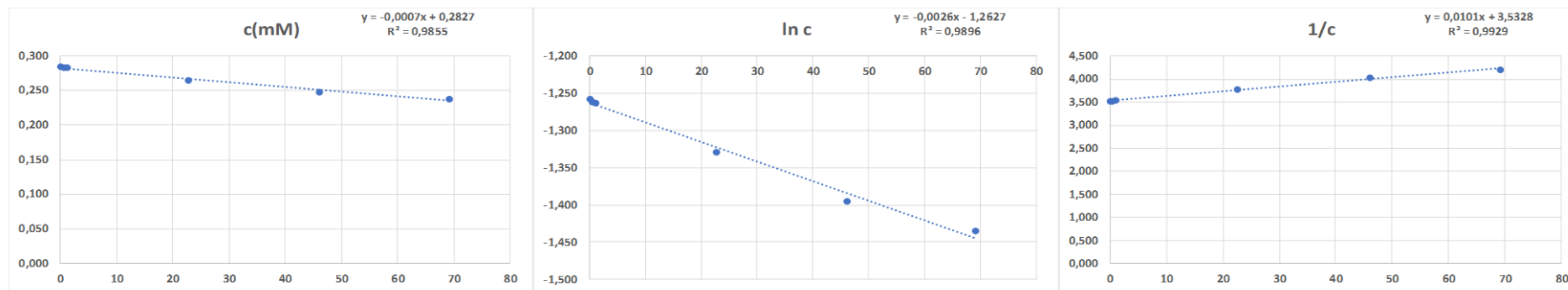


б)

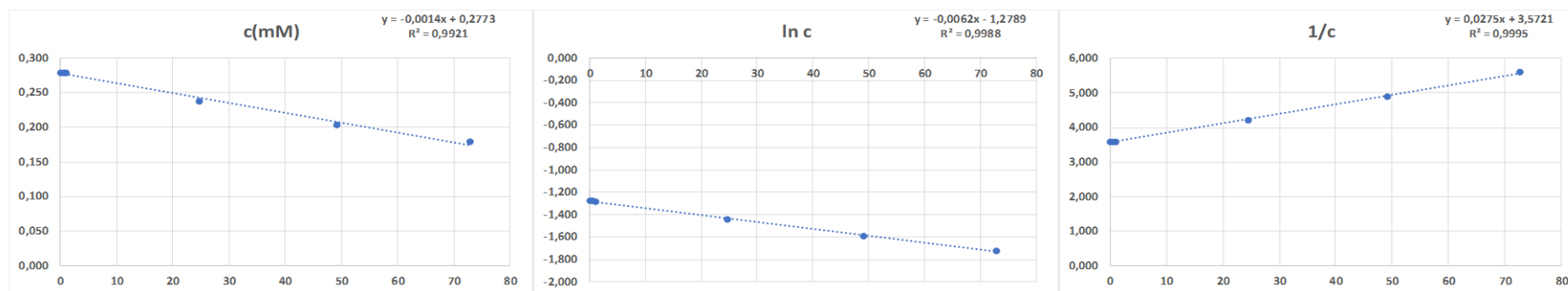


Слика П37. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) амлодипин бесилата на а) 45°C и б) 65°C

а)

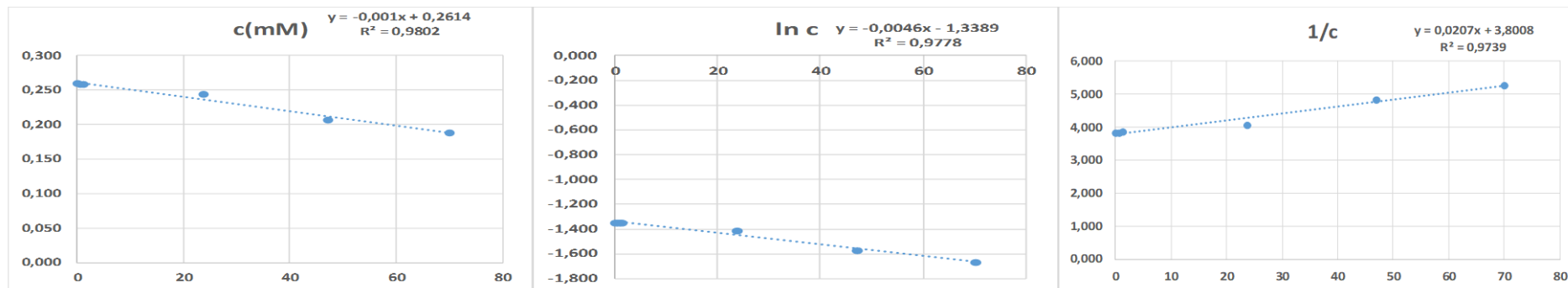


б)

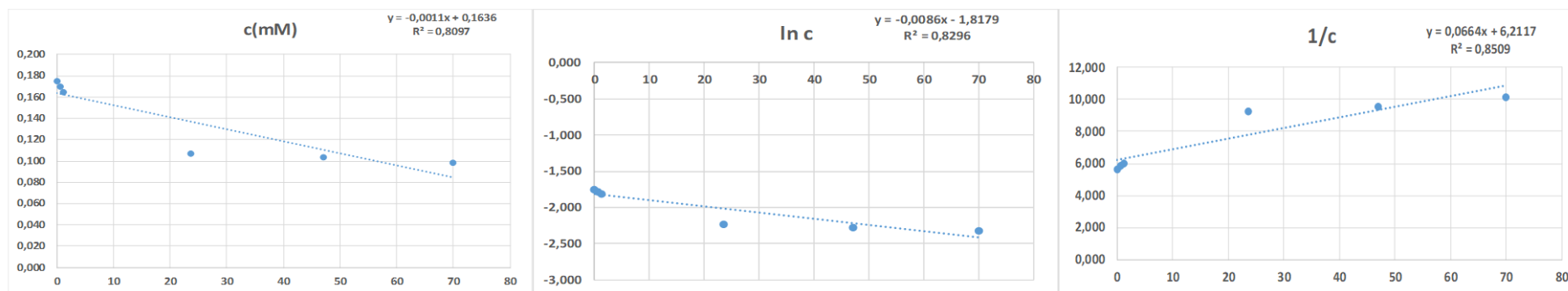


Слика П38. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) индапамида на а) 45°C и б) 65°C

а)

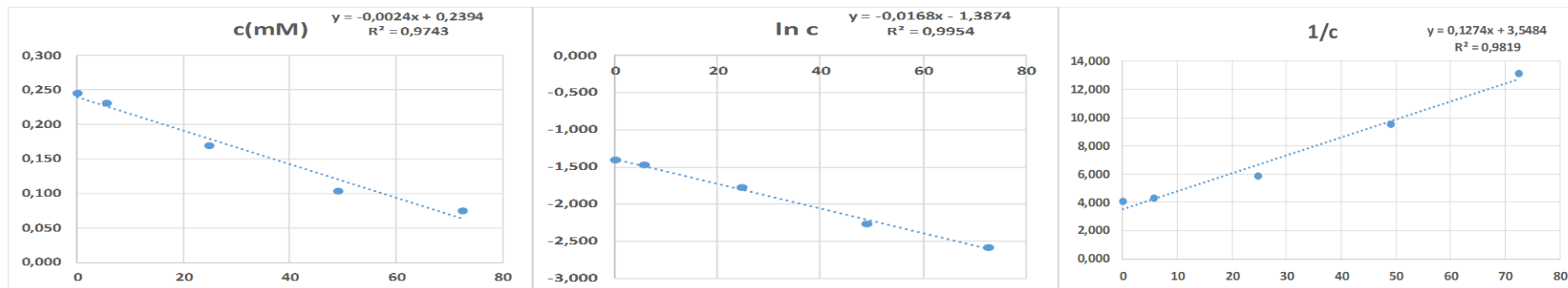


б)

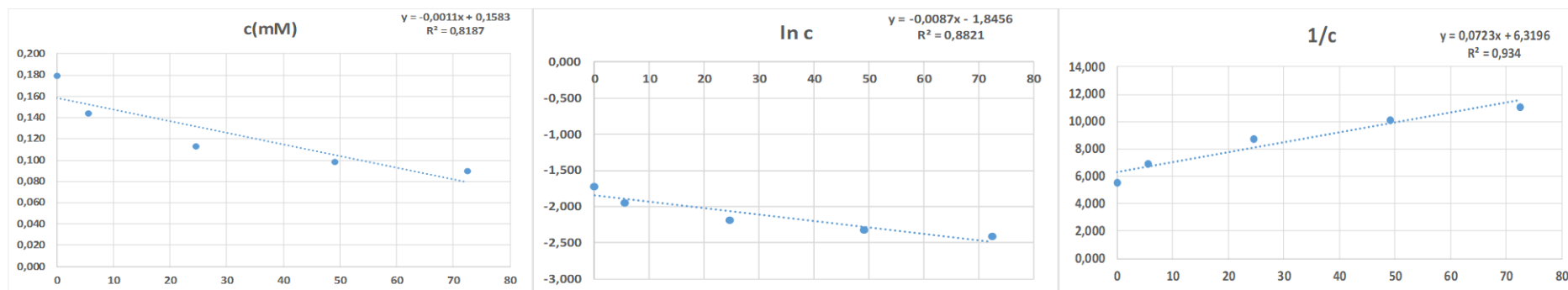


Слика П39. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеси

а)

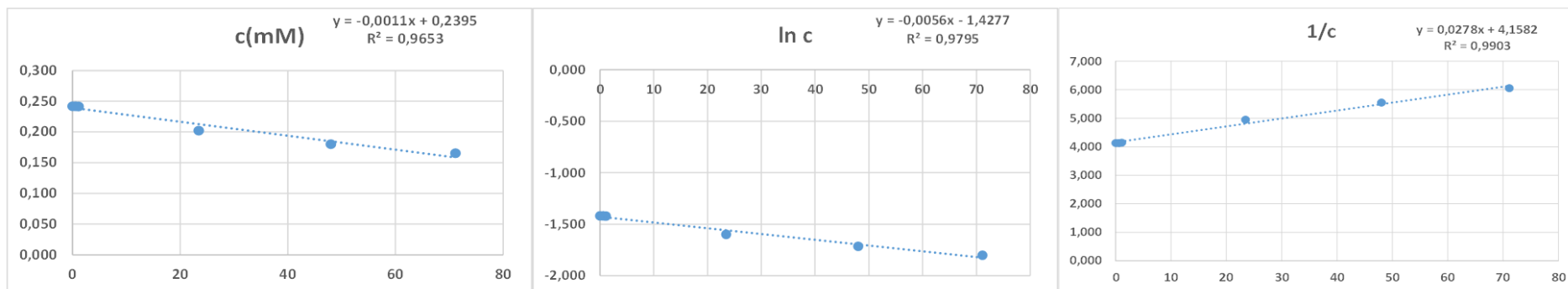


б)

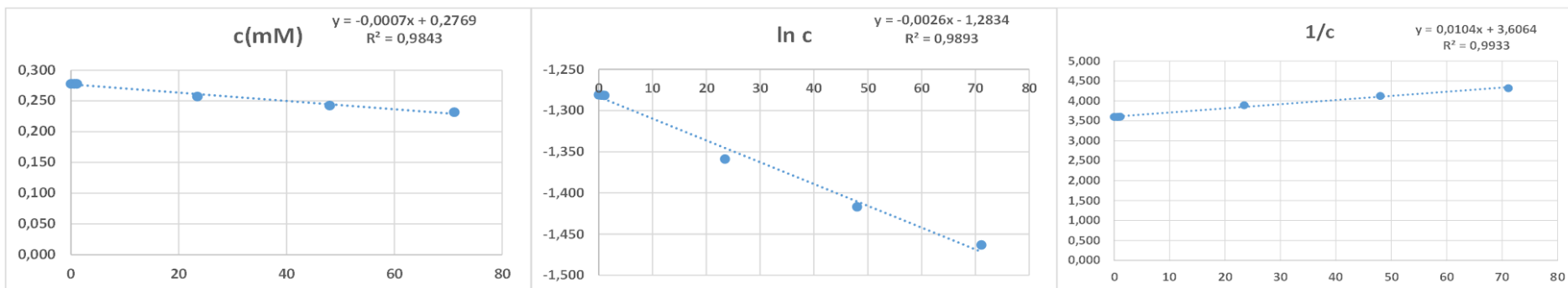


Слика П40. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеси

а)

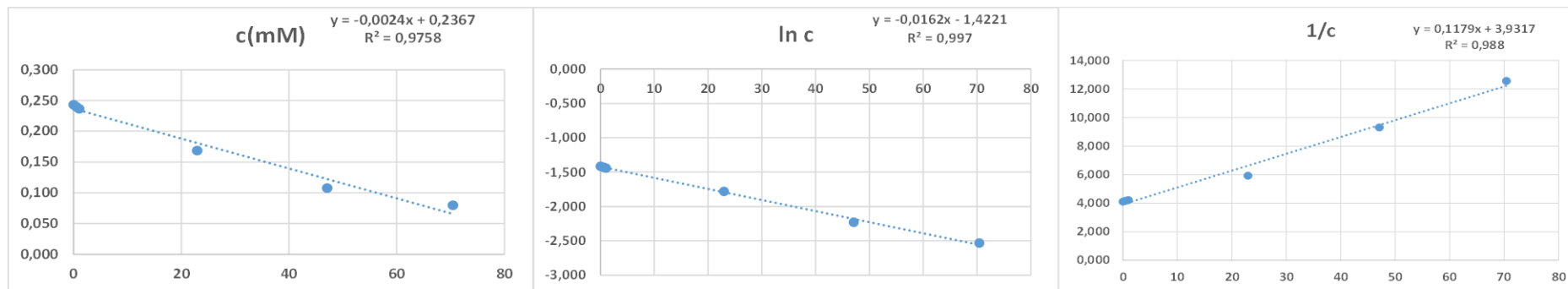


б)

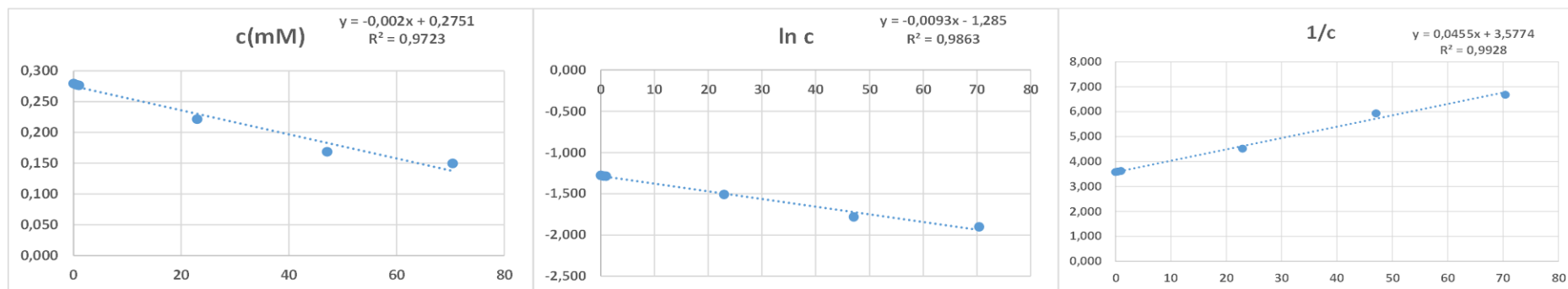


Слика П41. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

а)

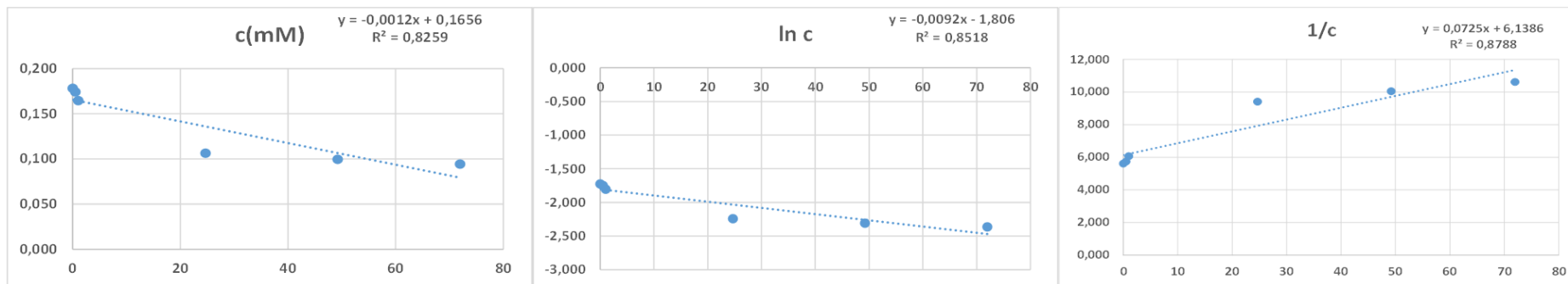


б)

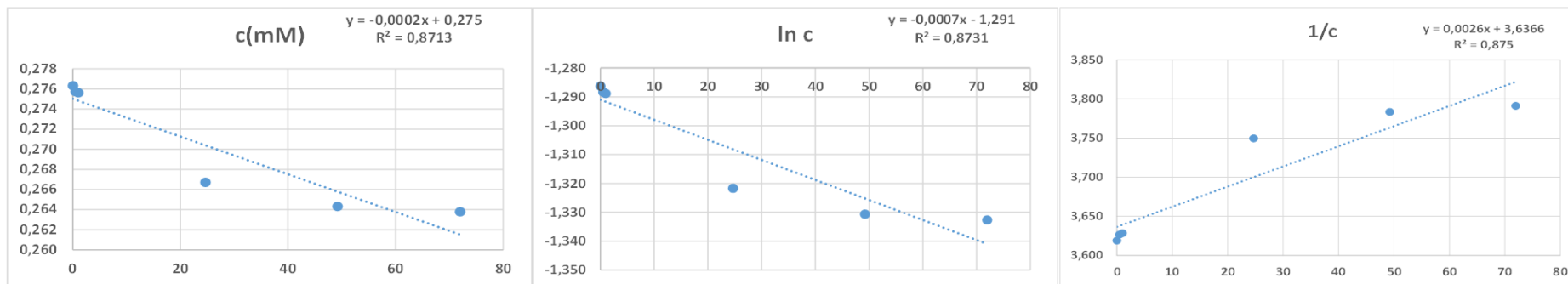


Слика П42. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

а)

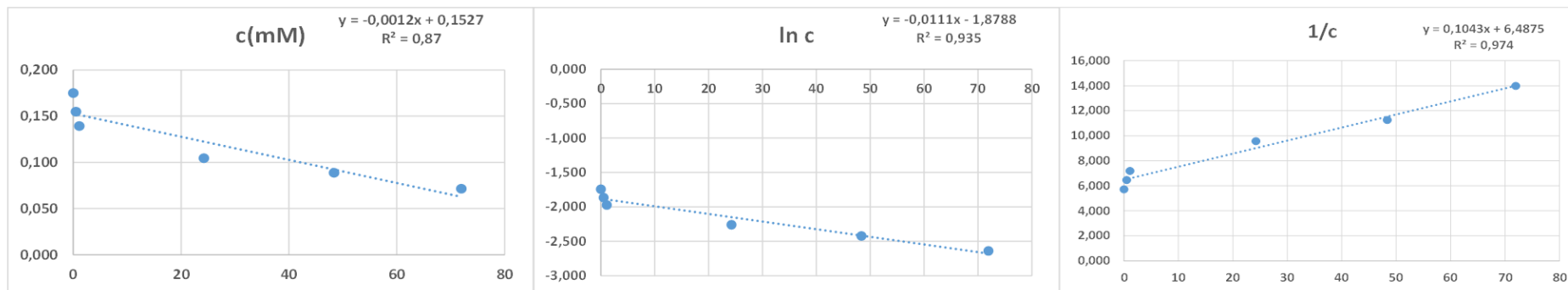


б)

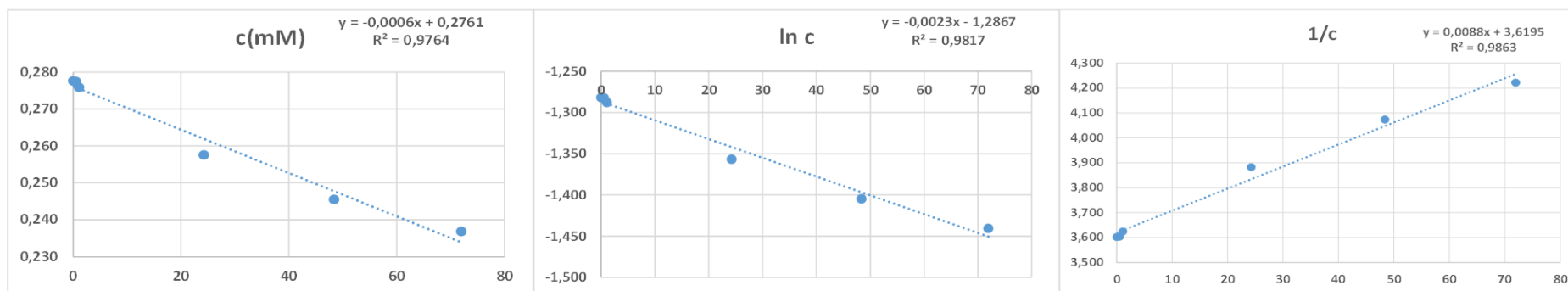


Слика П43. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 45°C а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеси

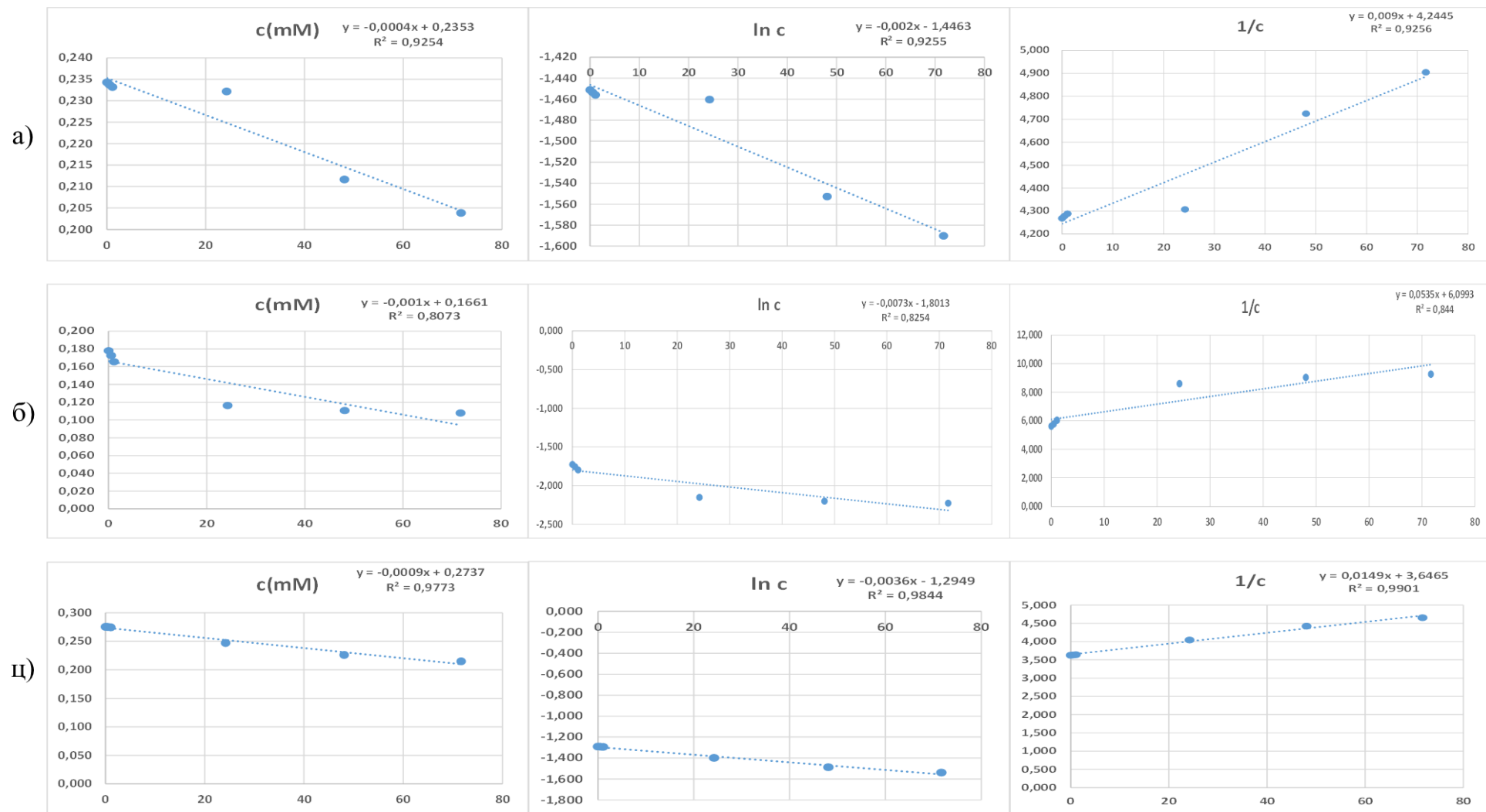
а)



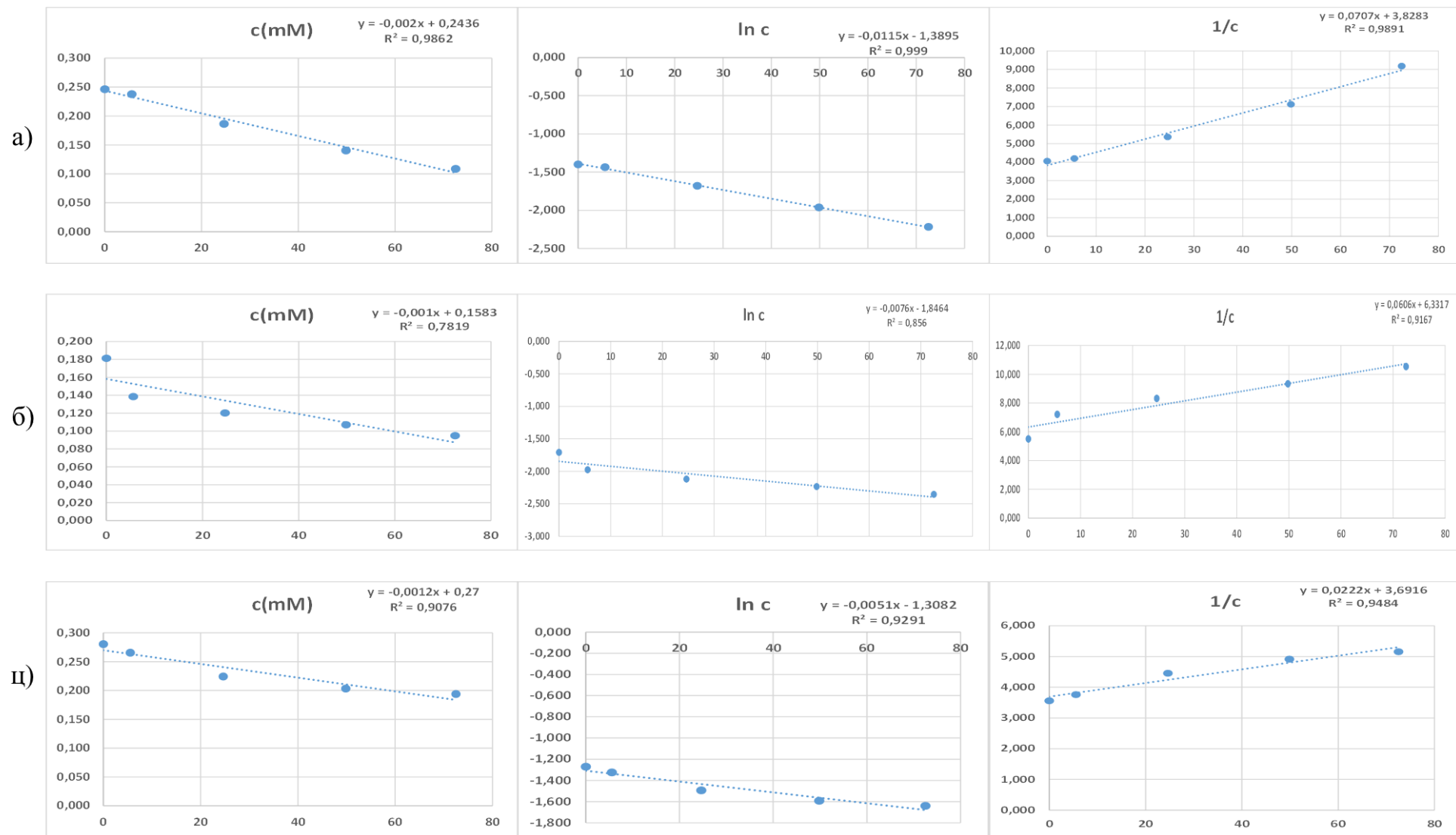
б)



Слика П44. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 65°C а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеси

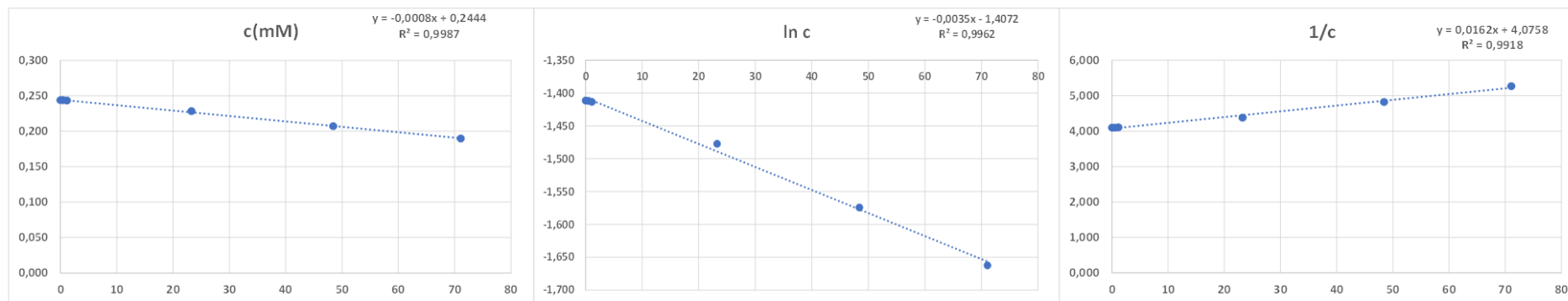


Слика П45. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина, б) амлодипин бесилата и ц) индапамида у тернарној смеси

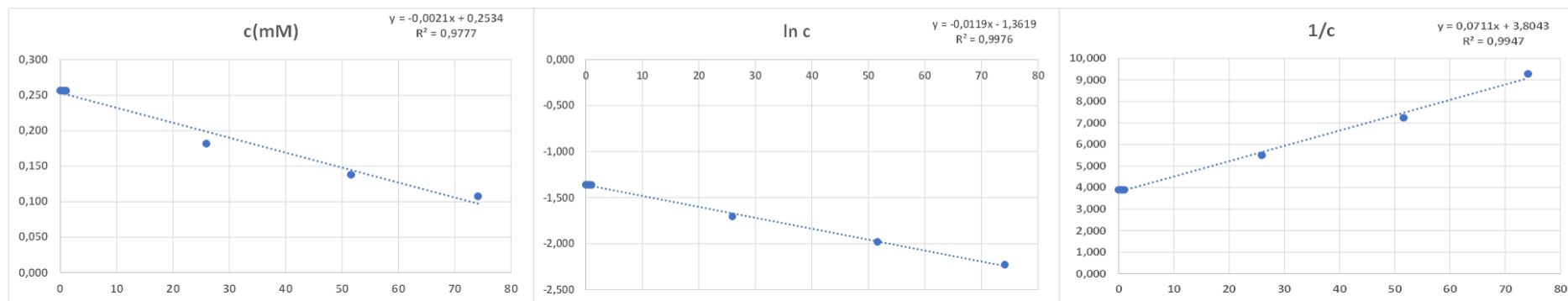


Слика П46. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције базне хидролизе (0,001 М NaOH) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина, б) амлодипин бесилата и в) индапамида у тернарној смеси

а)

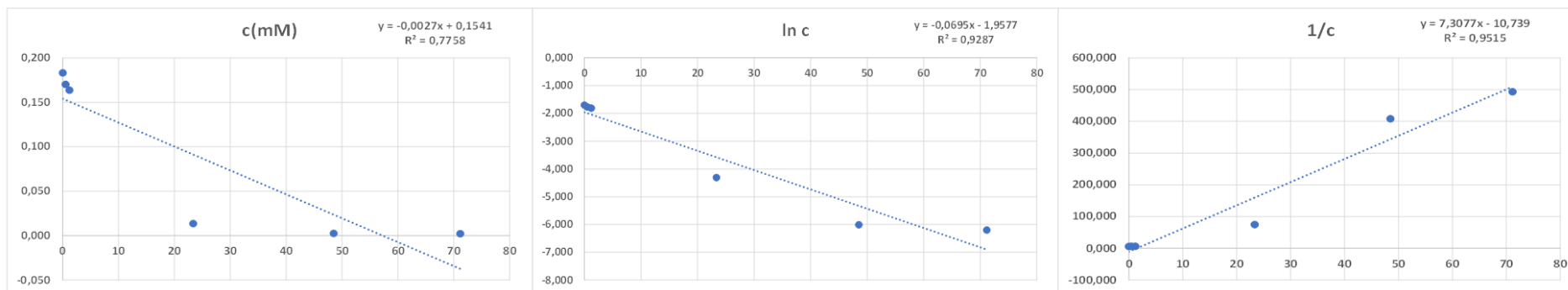


б)

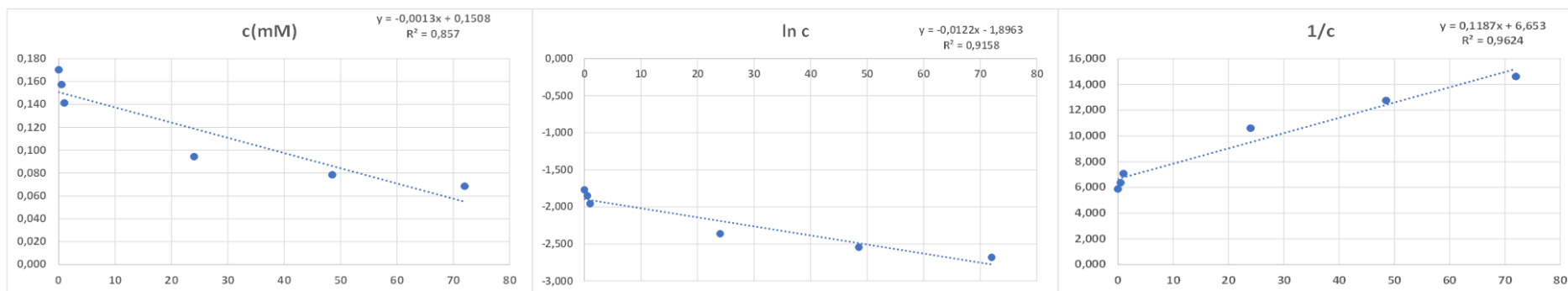


Слика П47. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) периндоприл терц-бутиламина на а) 45°C и б) 65°C

а)

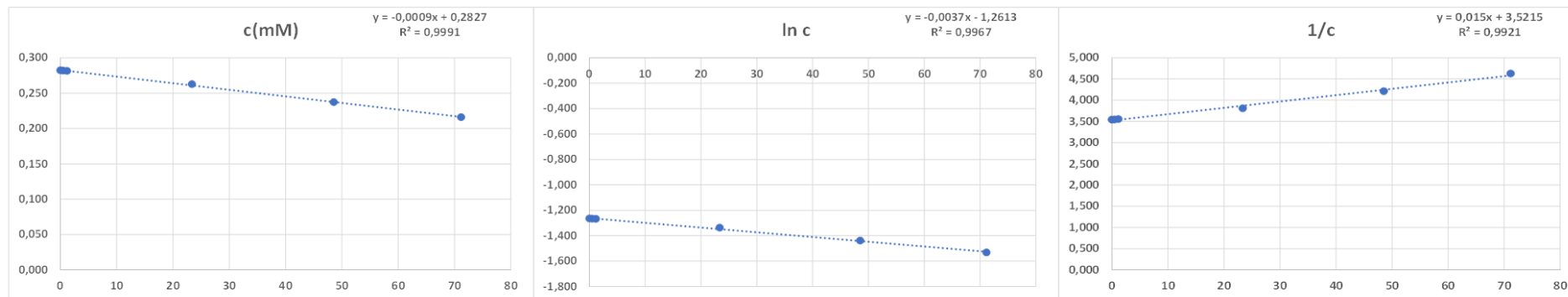


б)

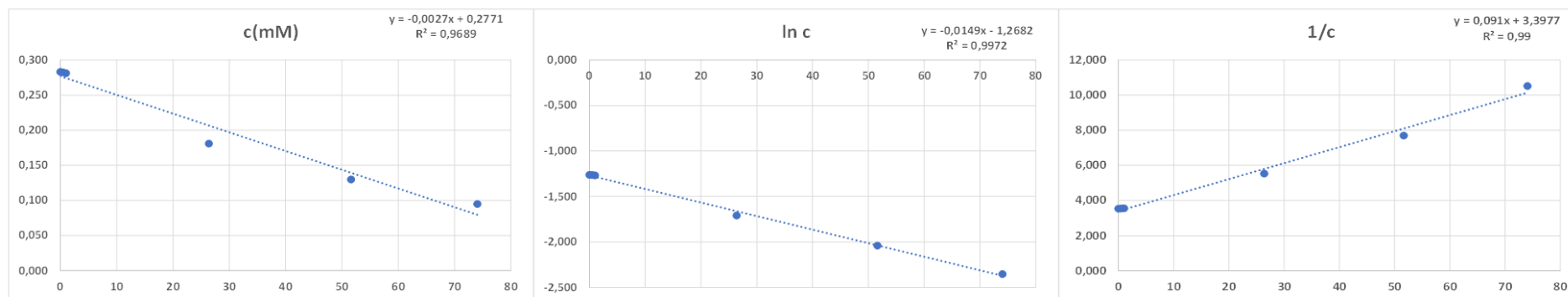


Слика П48. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) амлодипин бесилата на а) 45°C и б) 65°C

а)

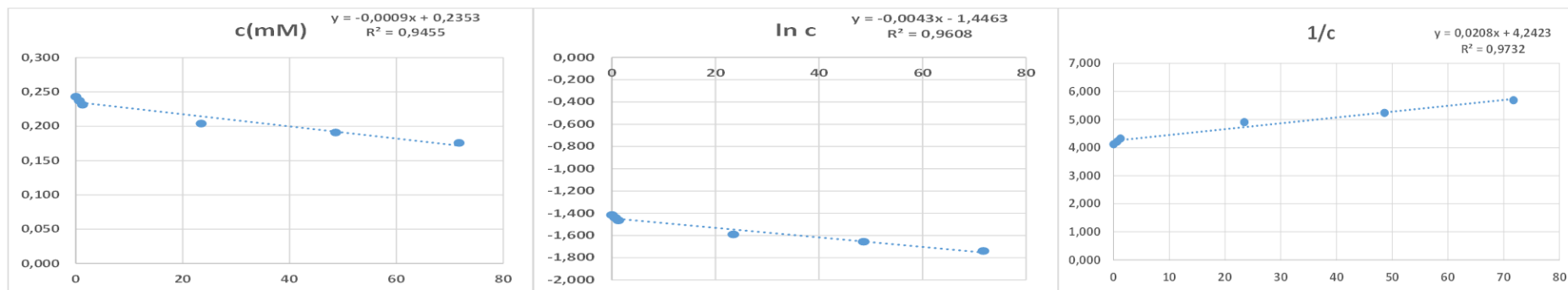


б)

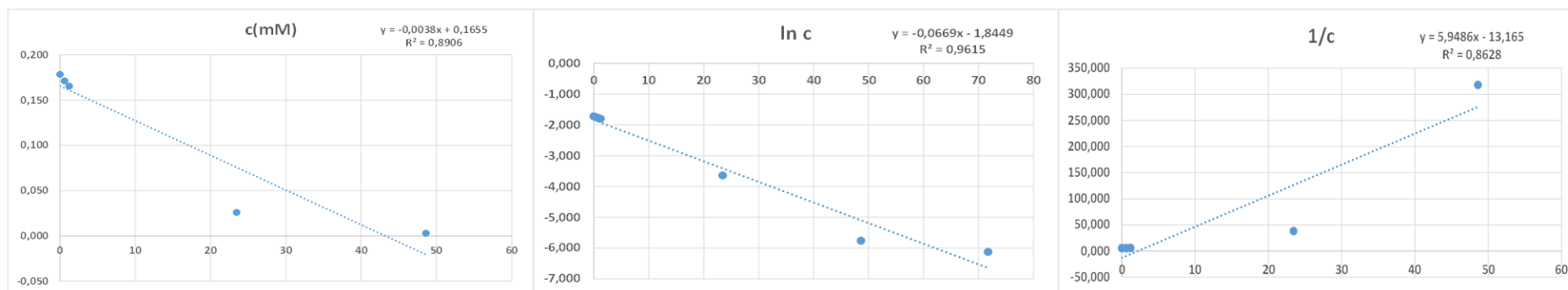


Слика П49. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) индапамида на а) 45°C и б) 65°C

а)

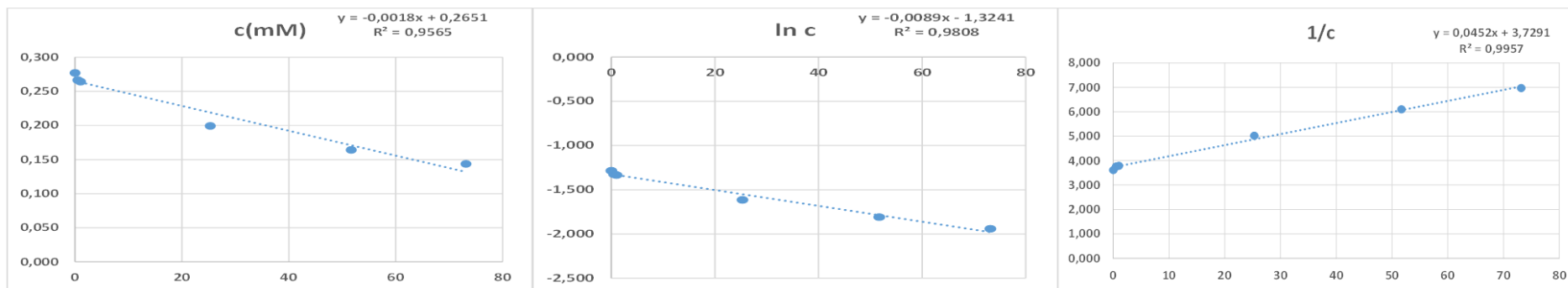


б)

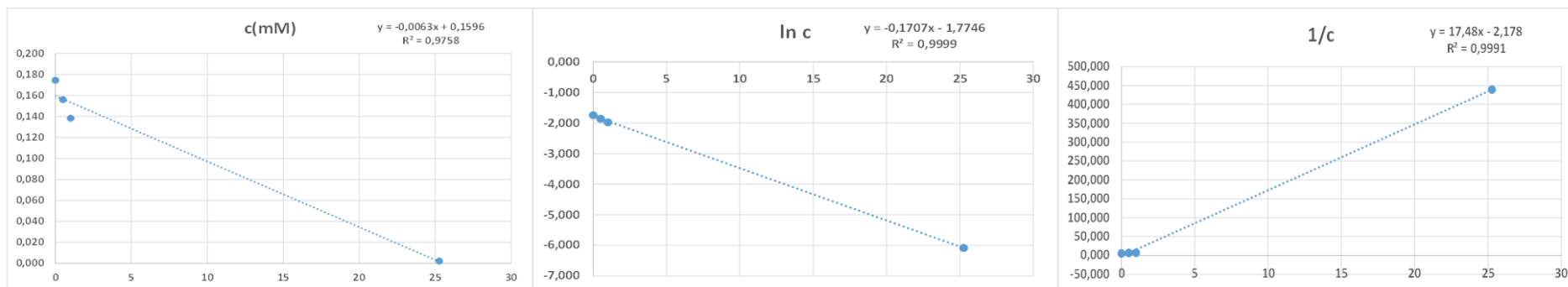


Слика П50. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М HCl) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеси

а)

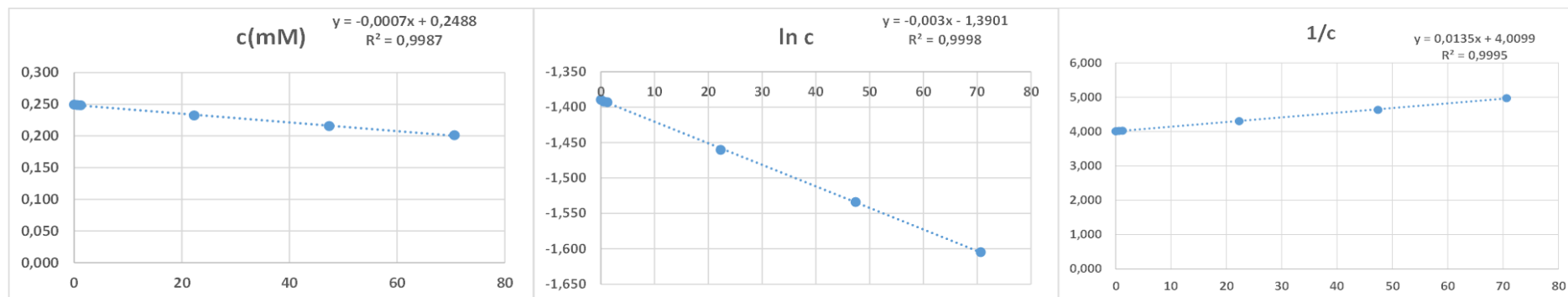


б)

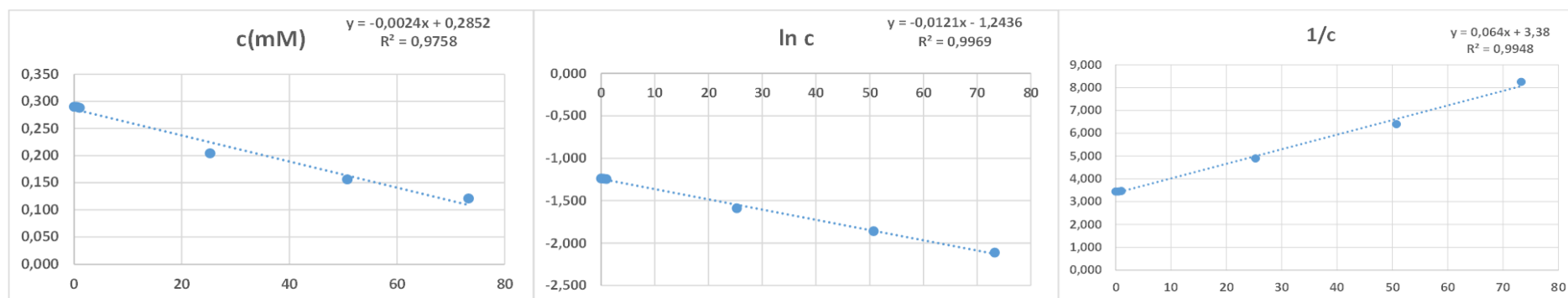


Слика П51. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М HCl) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеси

а)

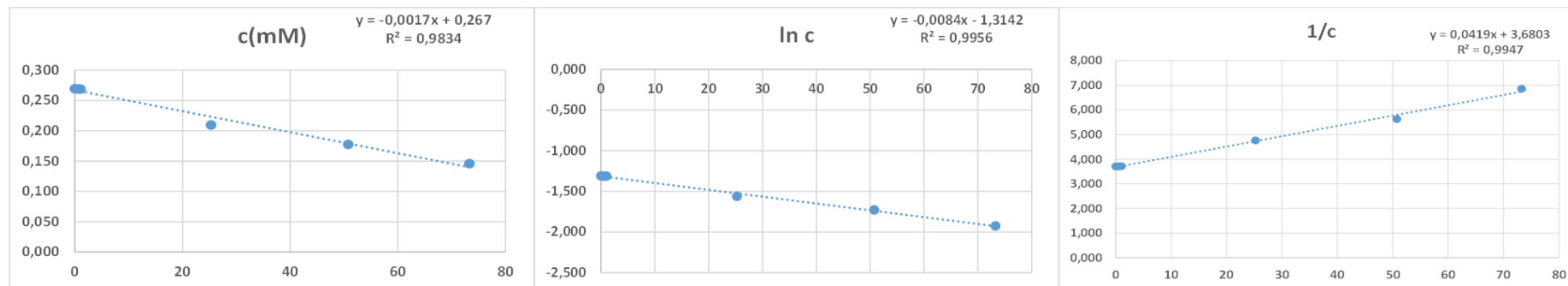


б)

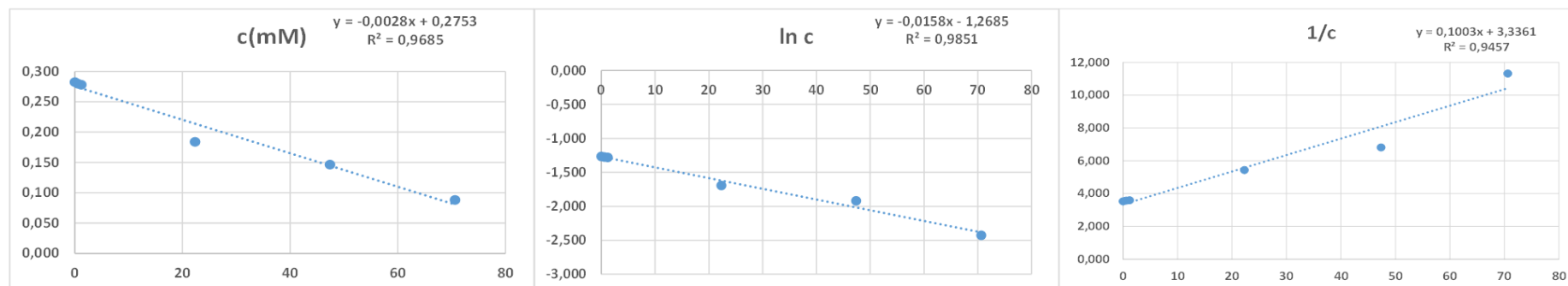


Слика П52. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М HCl) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

а)

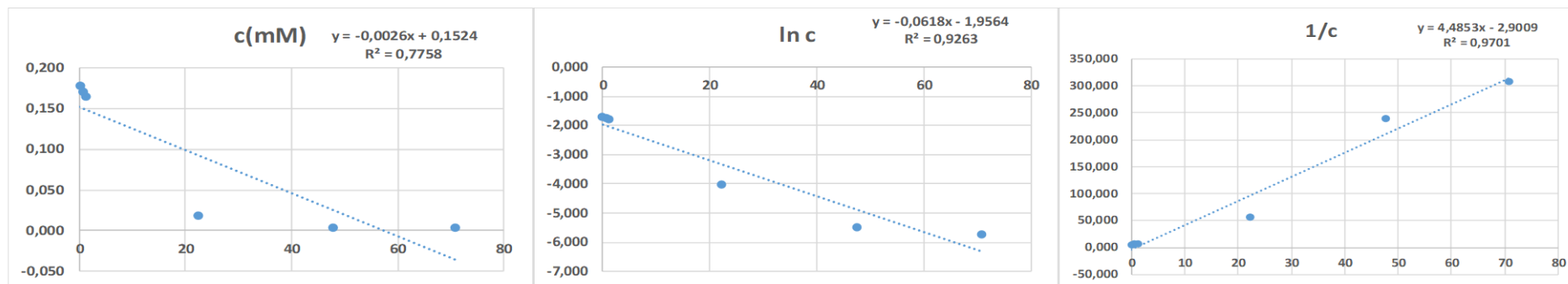


б)

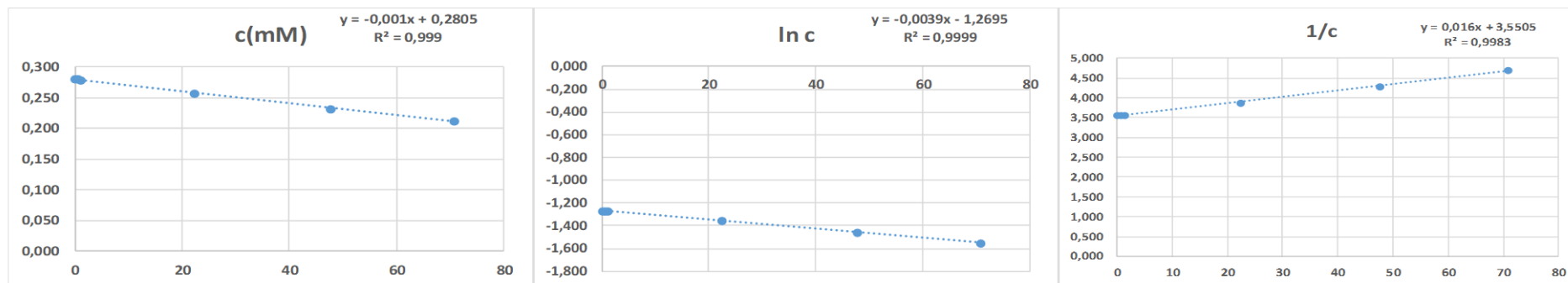


Слика П53. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М HCl) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

а)

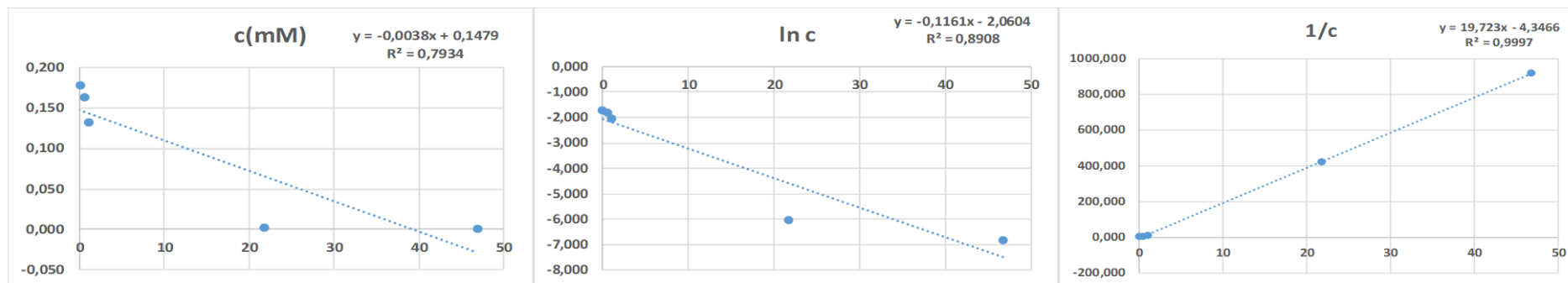


б)

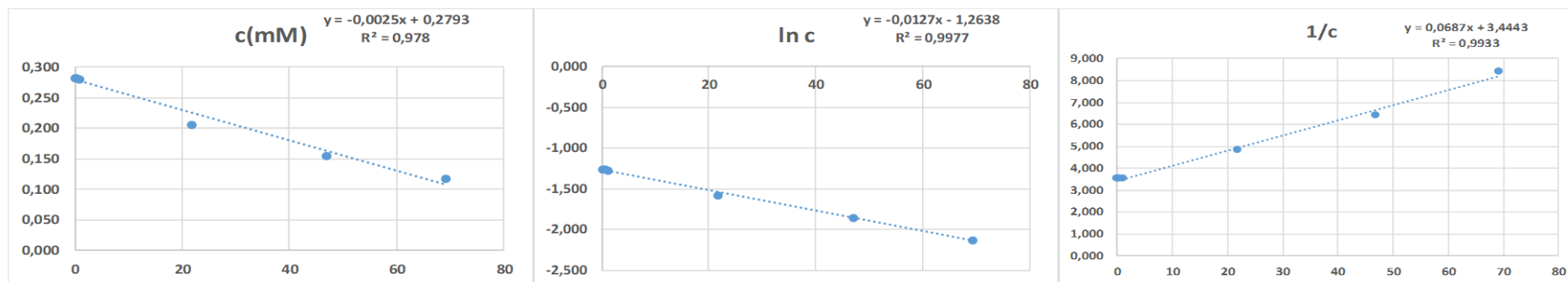


Слика П54. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) на 45°C а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеси

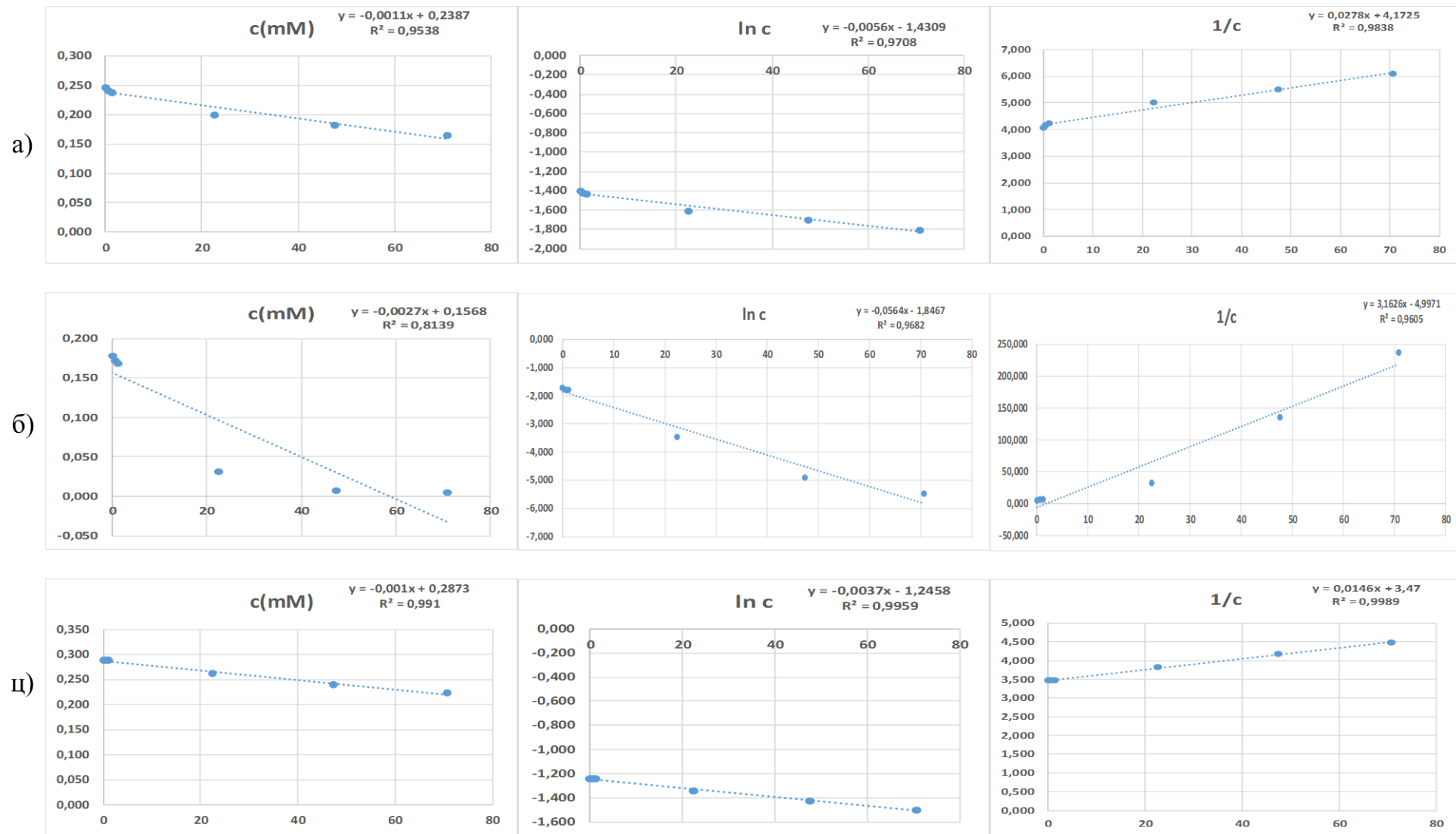
а)



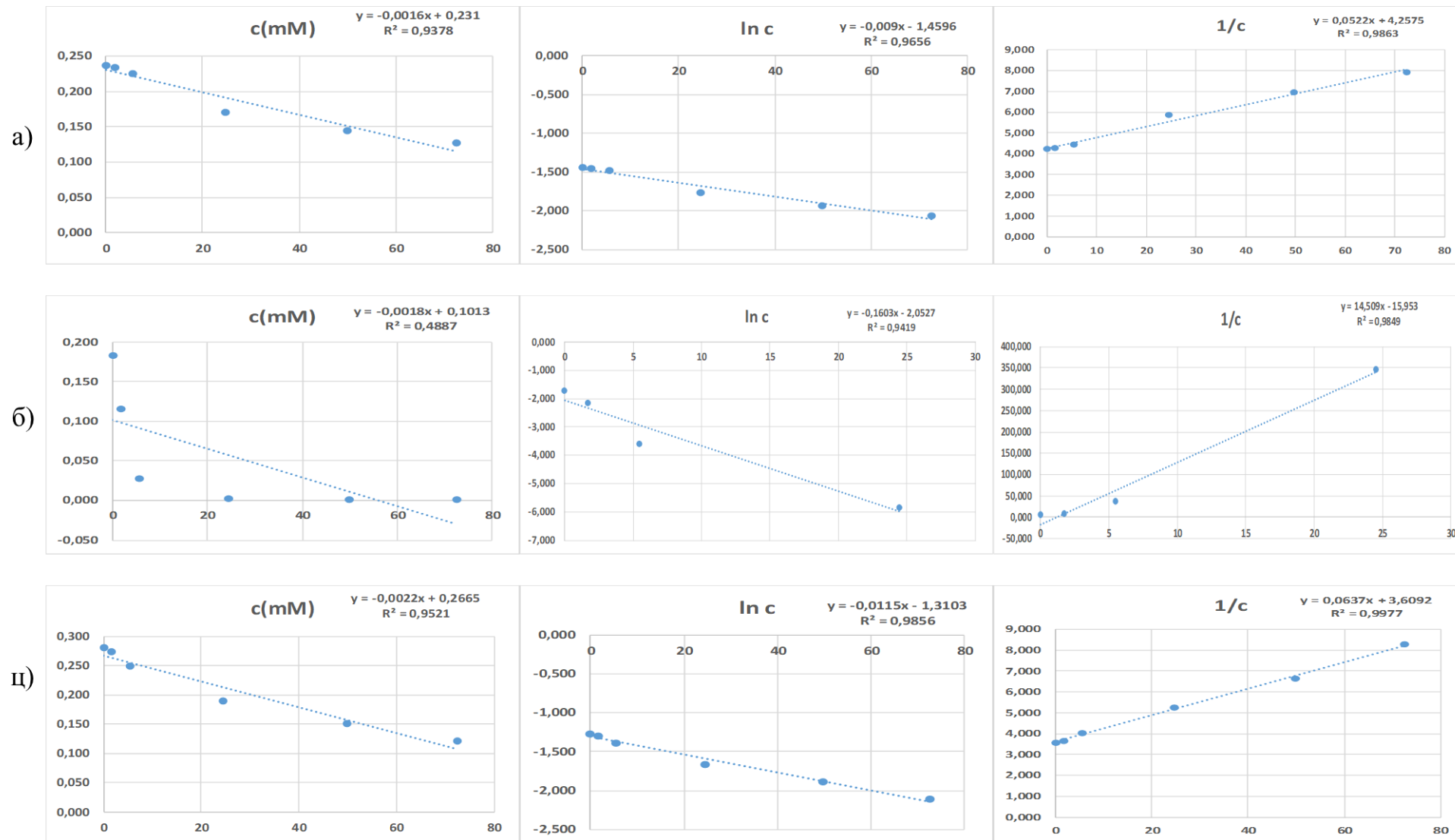
б)



Слика П55. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) на 65°C а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеши

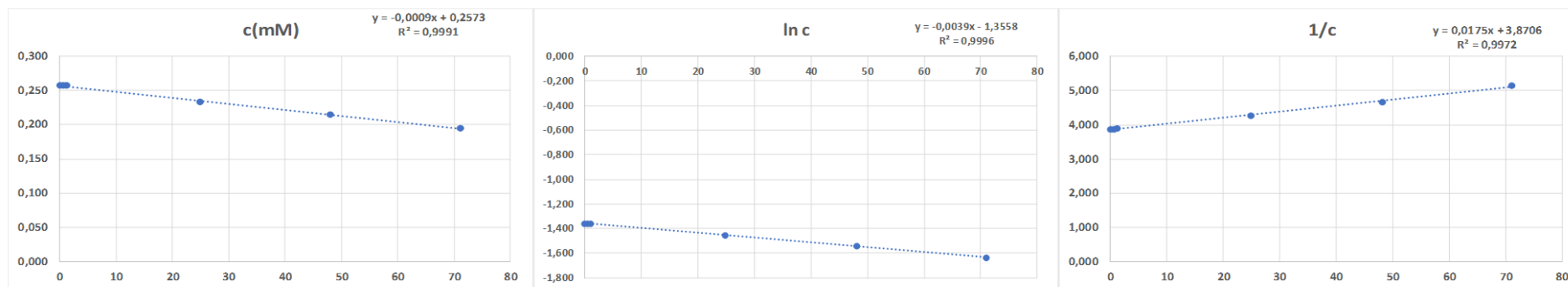


Слика П56. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина, б) амлодипин бесилата и в) индапамида у тернарној смеши

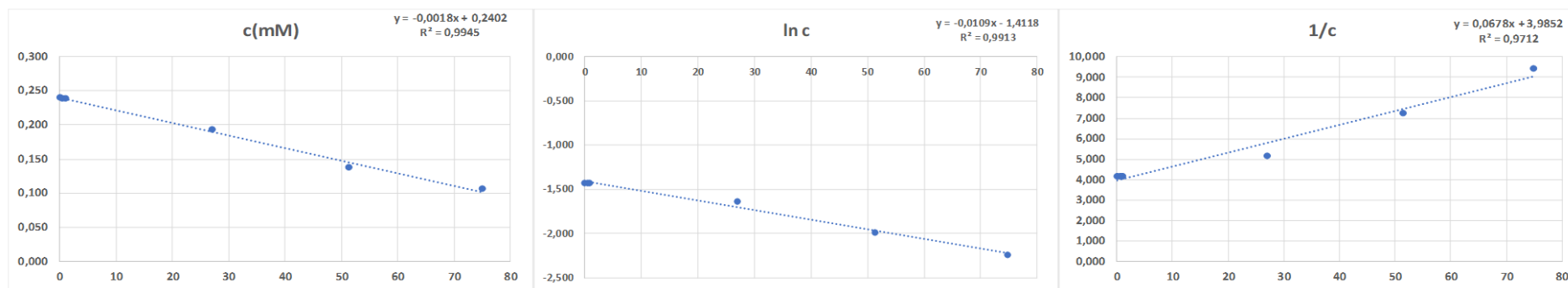


Слика П57. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције киселе хидролизе (1 М НСl) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина, б) амлодипин бесилата и ц) индапамида у тернарној смеши

а)

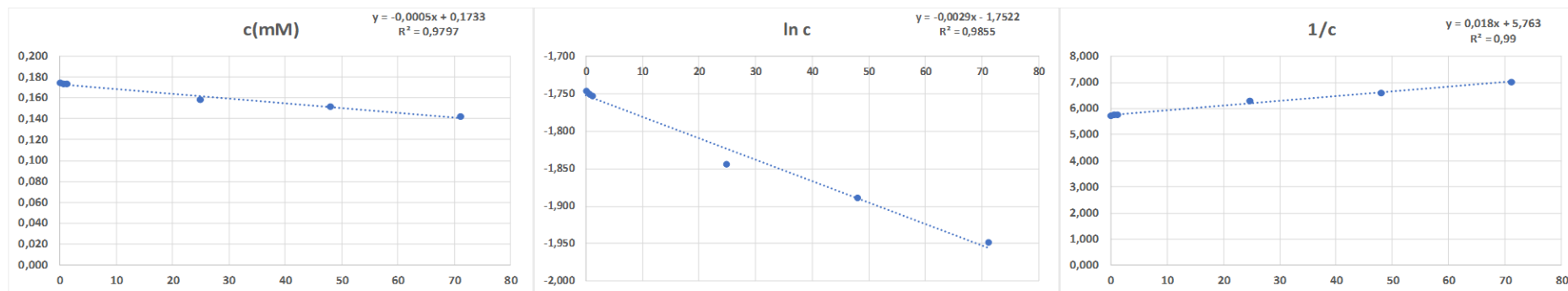


б)

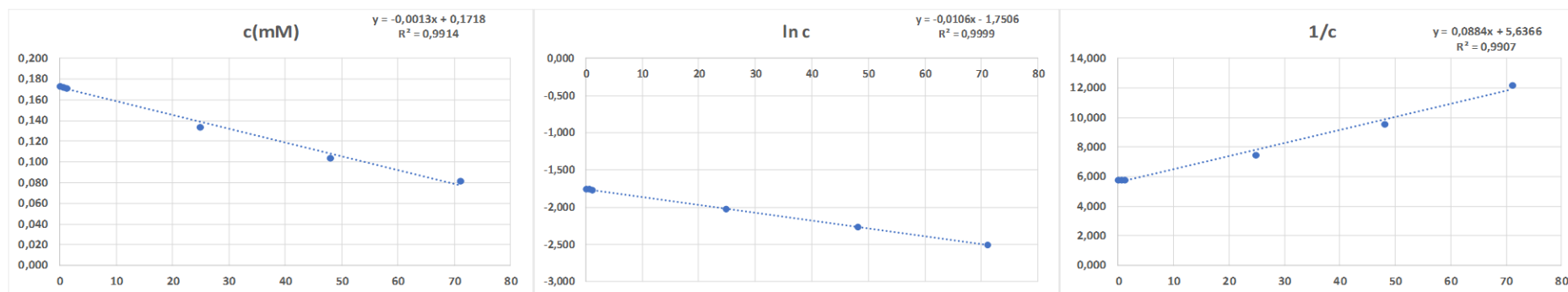


Слика П58. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) периндоприл терц-бутиламина на а) $45^\circ C$ и б) $65^\circ C$

а)

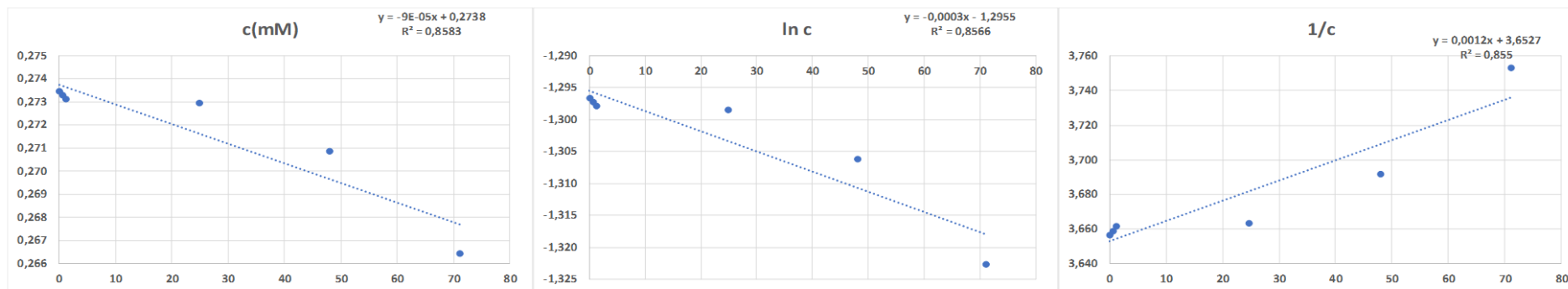


б)

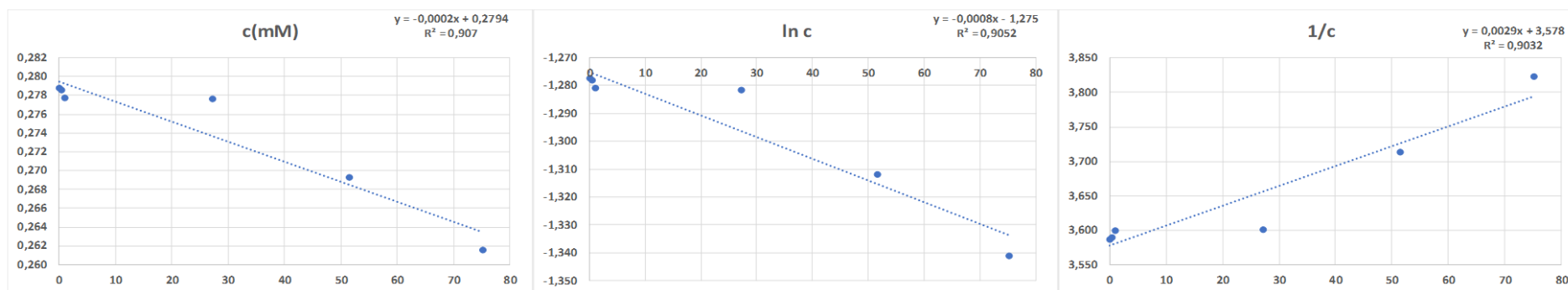


Слика П59. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) амлодипин бесилата на а) 45°C и б) 65°C

а)

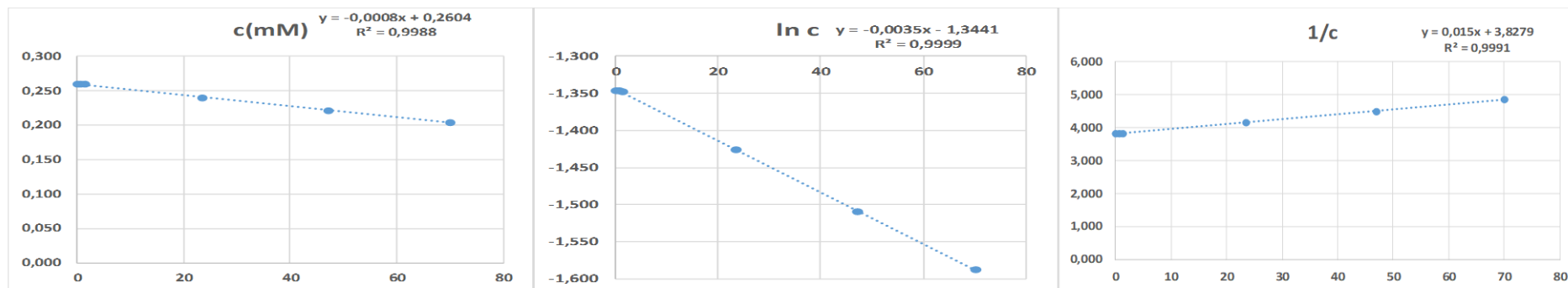


б)

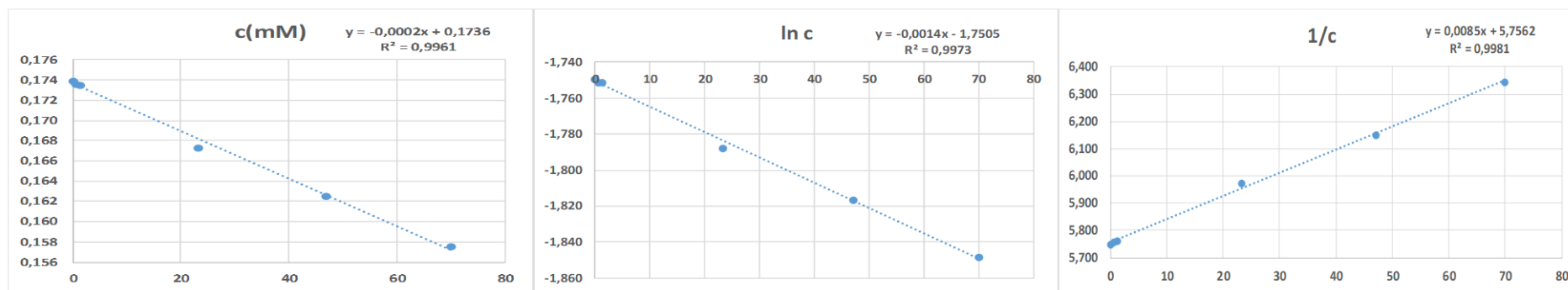


Слика П60. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H₂O) индапамида на а) 45°C и б) 65°C

а)

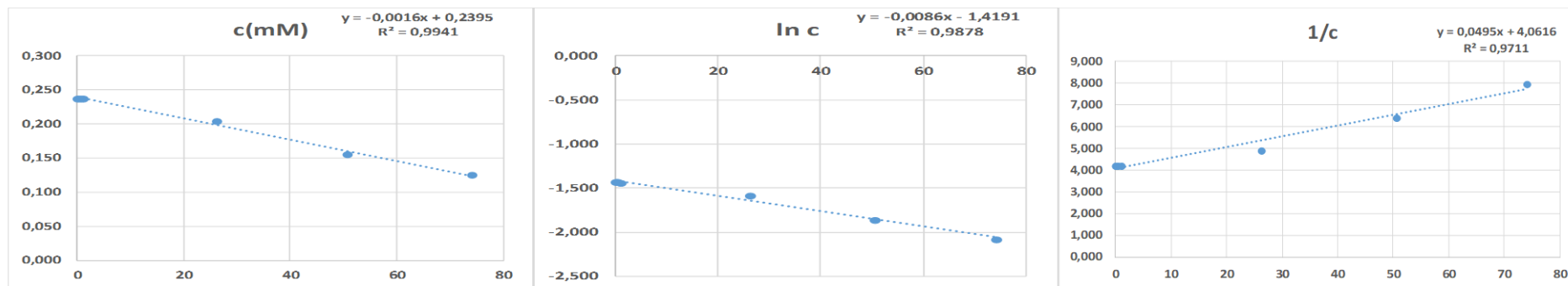


б)

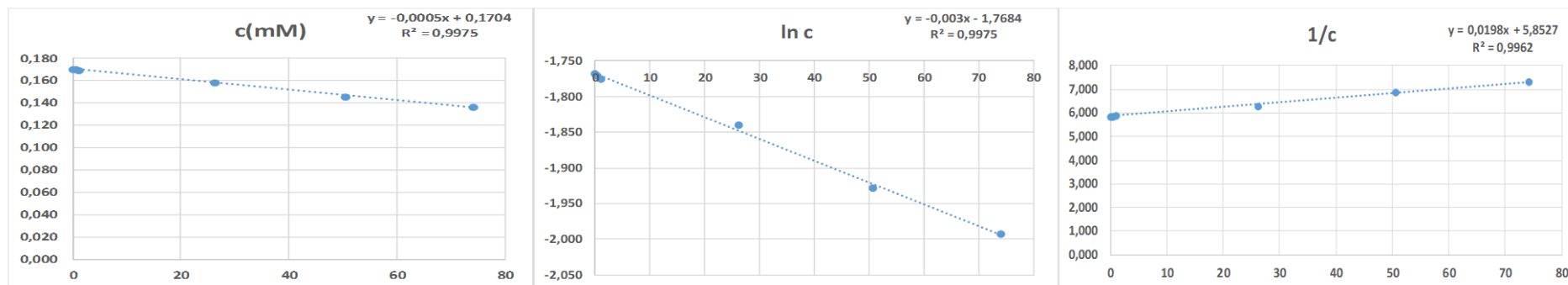


Слика П61. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеси

а)

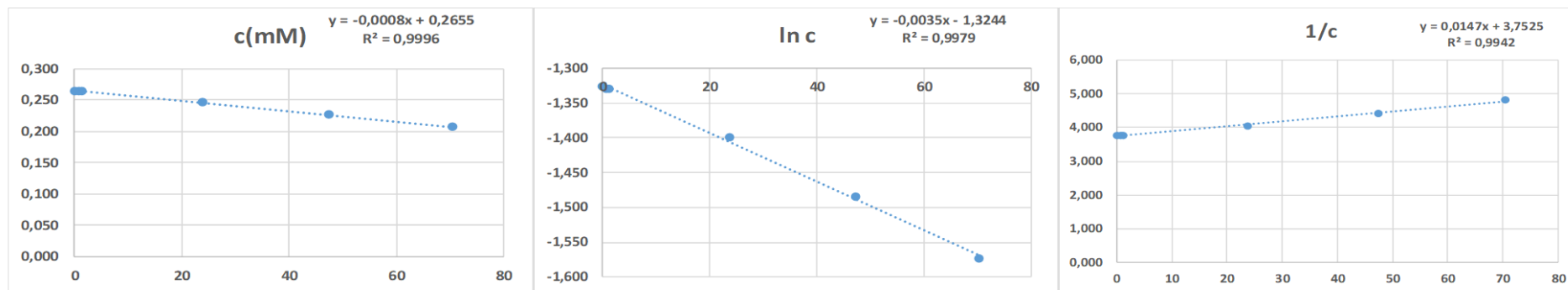


б)

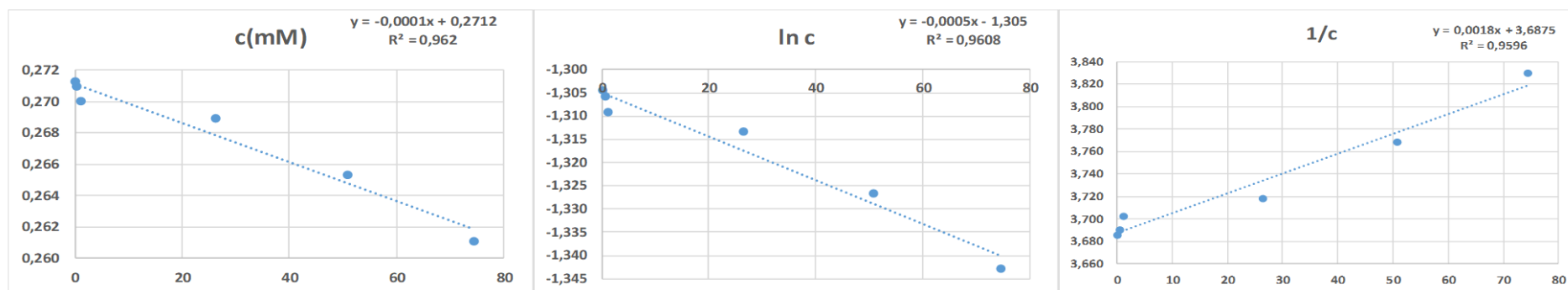


Слика П62. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) амлодипин бесилата у бинарној смеси

а)

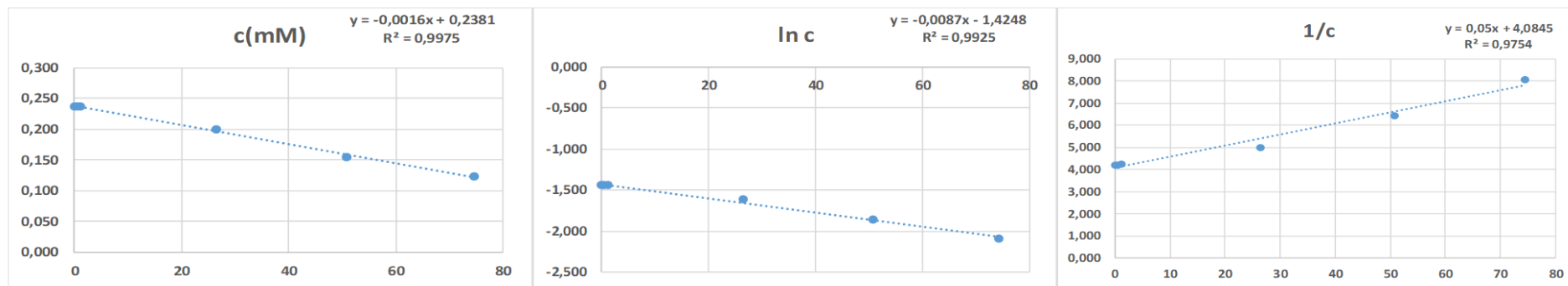


б)

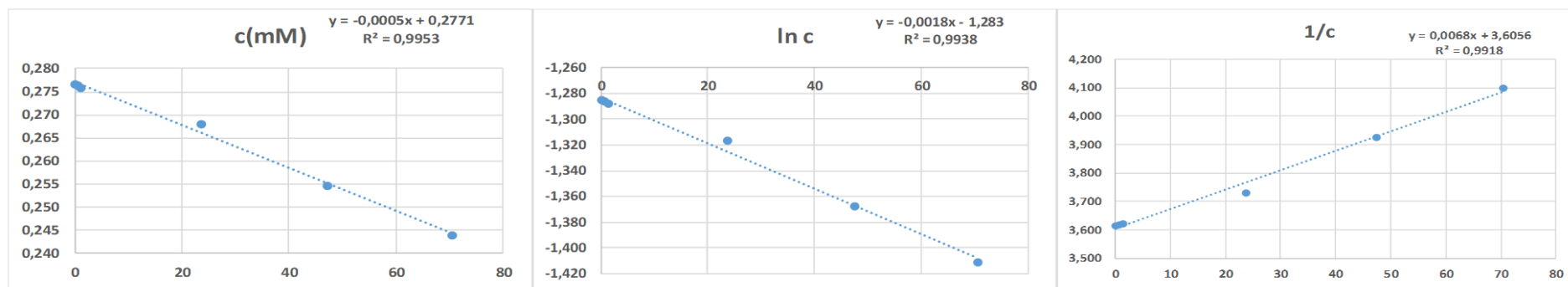


Слика П63. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на 45°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

а)

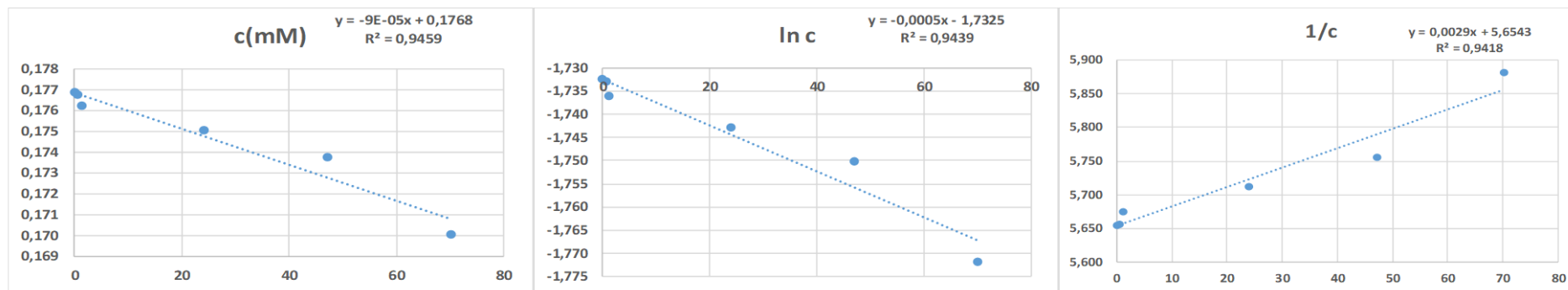


б)

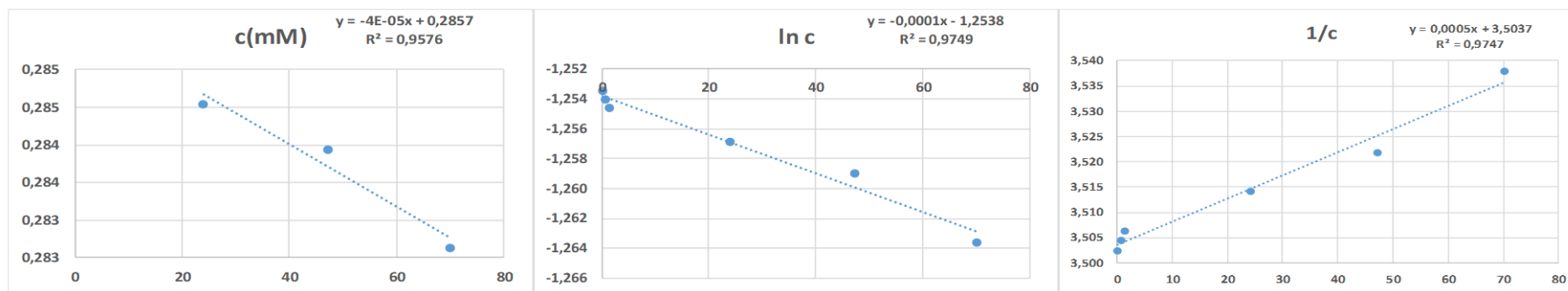


Слика П64. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина и б) индапамида у бинарној смеси

а)

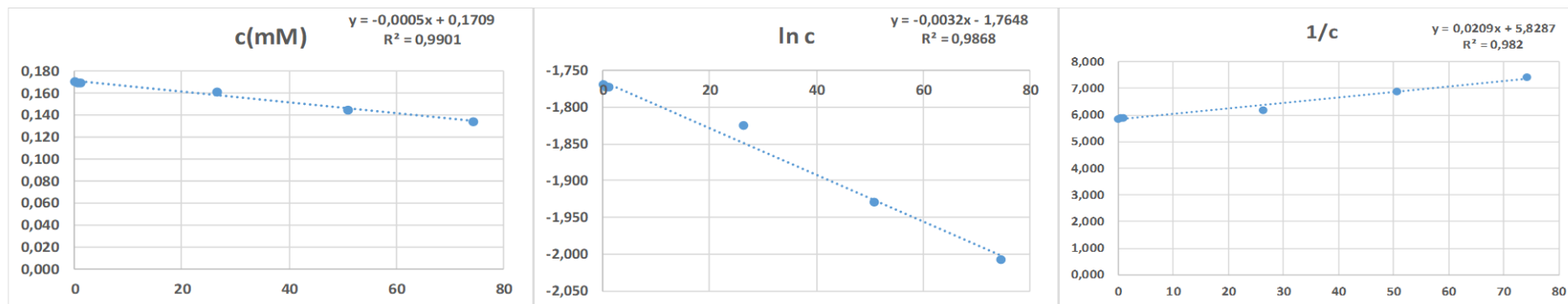


б)

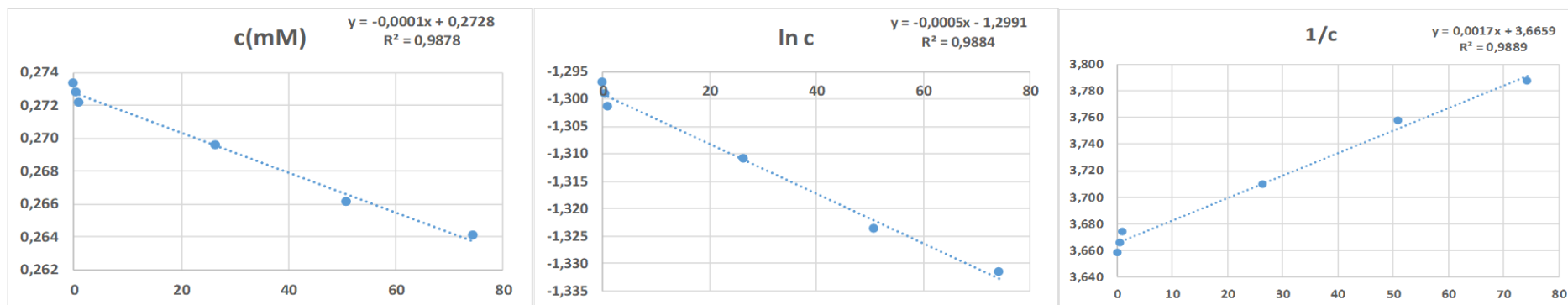


Слика П65. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на $45^\circ C$ а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеси

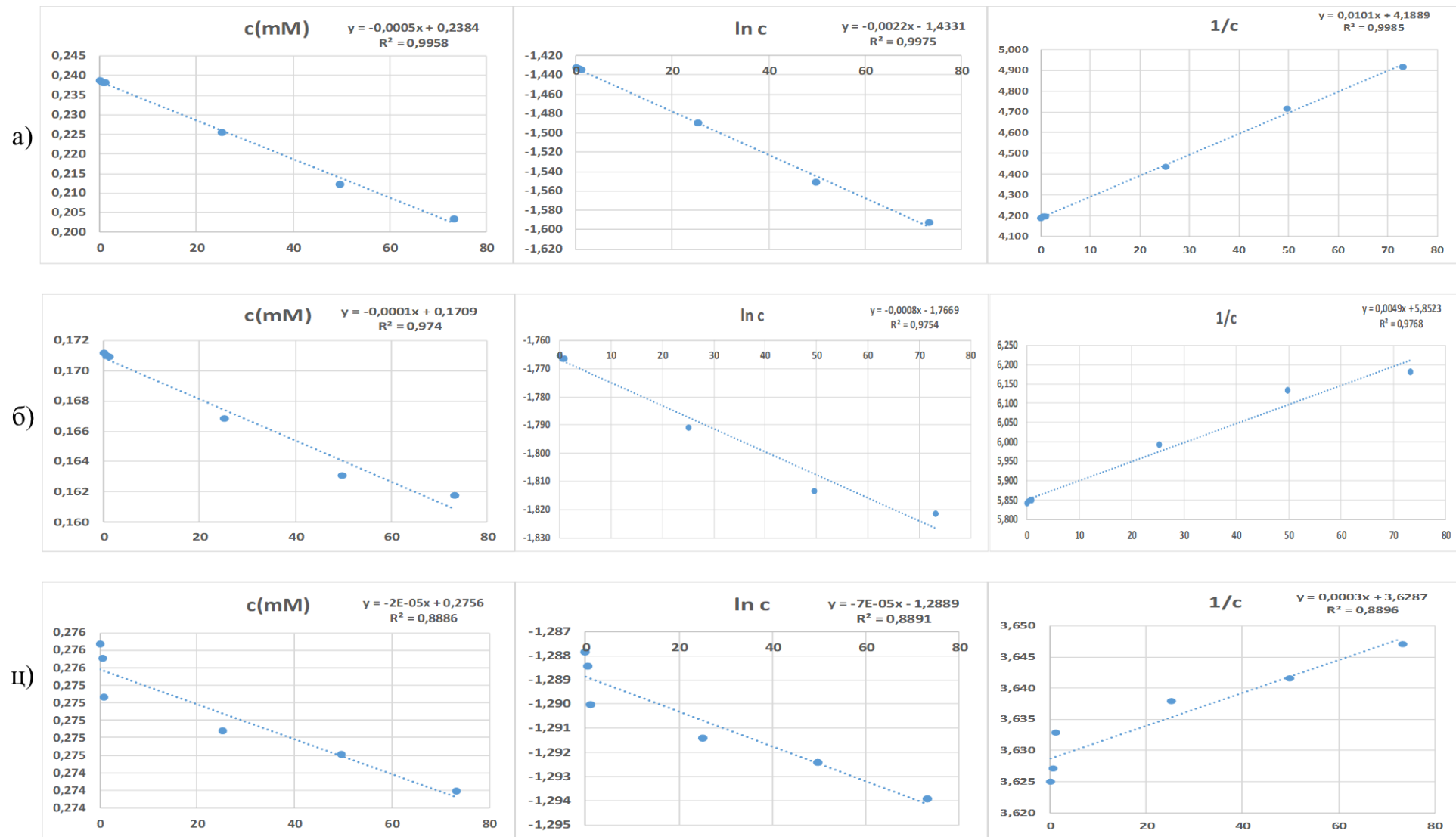
а)



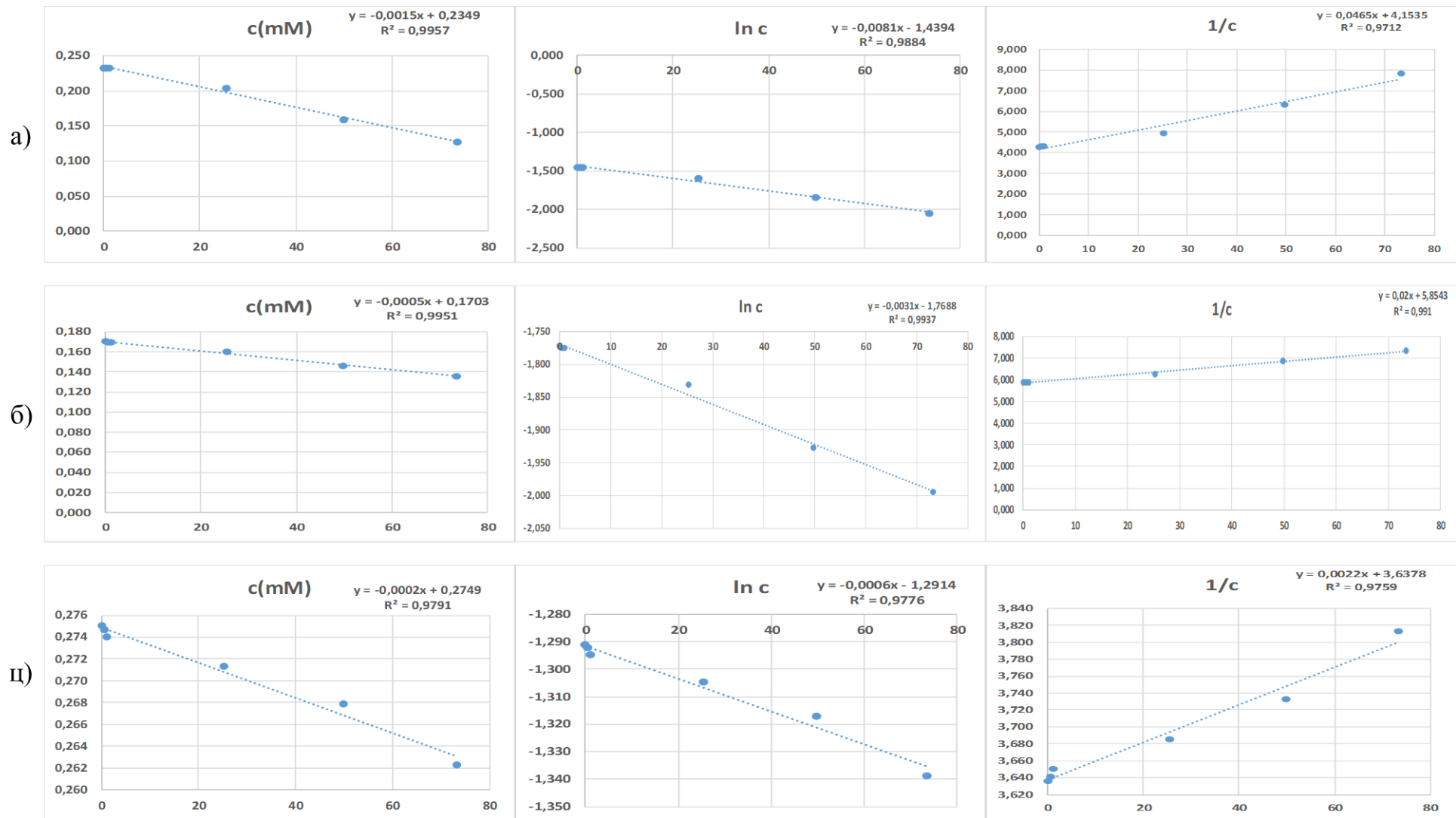
б)



Слика П66. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на 65°C а) амлодипин бесилата и б) индапамида у бинарној смеши



Слика П67. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на $45^\circ C$ а) периндоприл терц-бутиламина, б) амлодипин бесилата и ц) индапамида у тернарној смеши



Слика П68. Графичко одређивање реда реакције и константе брзине реакције неутралне хидролизе (H_2O) на 65°C а) периндоприл терц-бутиламина, б) амлодипин бесилата и в) индапамида у тернарној смеши

Биографија аутора

Небојша Ж. Мандић-Ковачевић рођен је 31. јула 1987. године у Бихаћу. Гимназију је завршио 2006. године у Бањој Луци. На Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци, студијски програм Фармација, дипломирао је 2013. године са просечном оценом 9,47 и стекао звање дипломирани фармацеут. Мастер студије физичке хемије завршио је 2015. године на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду, са просечном оценом 10,00, и стекао звање мастер физикохемичар. Докторске академске студије физичке хемије уписао је 2019. године на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду.

Од 2014. године члан је Фармацеутске коморе Републике Српске. Радно искуство стицао је као магистар фармације у апотекарској пракси, а од 2019. године запослен је као виши асистент на Катедри за физичку хемију Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци. У наставном и научноистраживачком раду бави се фармацеутском анализом, развојем и валидацијом хроматографских метода, хеометријским приступом, зеленом аналитичком хемијом, испитивањем стабилности лекова, као и испитивањем оксидативног стреса и активности ензима на биолошким узорцима. Аутор је и коаутор више научних радова и саопштења на домаћим и међународним скуповима. Супруг је Биљане Гатарић и отац кћерке Алине.

Библиографија аутора

Рад у водећем међународном часопису категорије M21a:

1. Мандић-Ковачевић Н., Касагић-Вујановић И., Гатарић Б., Шкрбић Р., Поповић Бијелић А. (2024). Study of the Acidic, Basic, and Thermal Degradation Kinetics of Three Antihypertensive Drugs—Individually and in Combination. *Pharmaceutics*, 16(11), 1410. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111410>

Рад у међународном часопису категорије M23:

1. Мандић-Ковачевић Н., Касагић-Вујановић И., Поповић Бијелић А. Analysis of Fixed-Dose Combination of Three Antihypertensive Drugs by a Green and Quality by Design Approach. *J Chromatogr Sci*, 61(3): 256-268; 2023.

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

1. Мандић-Ковачевић Н., Касагић-Вујановић И. Application of experimental design in optimization of chromatographic method for pharmaceutical analysis of amlodipine besylate, indapamide and perindopril-erbumine. XIII International scientific conference Contemporary materials 2020, Book of Abstracts, p.90-91, Banja Luka, 2020.

Изјава о ауторству

Потписани-а Небојша Мандић-Ковачевић
број индекса 2019/0318

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Хеометријски приступ развоју еколошки прихватљиве хроматографске методе за
анализу и испитивање кинетике и термодинамике деградације периндоприла, амлодипина
и индапамида

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Небојша Мандић-Ковачевић

Број индекса 2019/0318

Студијски програм Докторске академске студије физичке хемије

Наслов рада Хеометријски приступ развоју еколошки прихватљиве хроматографске методе за анализу и испитивање кинетике и термодинамике деградације периндоприла, амлодипина и индапамида

Ментор др Маја Милојевић-Ракић, ванредни професор
др Ирена Касагић-Вујановић, ванредни професор

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Хеометријски приступ развоју еколошки прихватљиве хроматографске методе за анализу и испитивање кинетике и термодинамике деградације периндоприла, амлодипина и индапамида

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.