



РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје
Фармацевтски Факултет

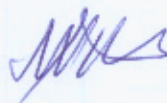
Република Северна Македонија
Универзитет „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ



НИП - Образец-2

НАРАТИВЕН ИЗВЕШТАЈ¹
ЗА НАУЧНОИСТРАЖУВАЧКИ ПРОЕКТ

финансиран од интегративните средства на Универзитетот

Единица на УКИМ – носител на проектот	Фармацевтски Факултет
Наслов на проектот	Пристапи за развој на еколошки прифатливи хроматографски методи во фармацевтски анализи
Акроним	Eco-chrom-pharm-analysis
Клучни зборови	еколошки прифатливи методи, неконвенционална мобилна фаза, фармацевтски анализи, реверзно-фазна течна хроматографија, активни супстанции
Научноистражувачко подрачје	Фармација
Научноистражувачко поле	Медицински науки и здравство
Поднесок по конкурс (бр./датум)	02-858/47 од 20.09.2022 година
Период на реализација (од - до)	12 месеци 2022 / 2023
Одлука за прифаќање на извештај од ННС/НС (бр./датум)	02-102/4 од 13.02.2024
Главен истражувач (име и презиме, звање, потпис)	Проф. д-р Наталија Наков 

Скопје, 14.02.2024 година

Декан

Проф. д-р Зоран Стрејев

(потпис)



¹ Комплетниот Извештај за научноистражувачкиот проект е составен од:

- изготвени Образец 2 (наративен извештај) и Образец 3 (финансиски извештај),
- придружно писмо за доставување извештај од единицата на Универзитетот и
- одлука од наставно-научниот или научниот совет на единицата за прифаќање на извештајот.



ДЕЛ I

1.1.Преглед на целите на истражувањето со нивна временска рамка предвидени во предлог-проектот

- Цел 1 Воспоставување на еколошки прифатливи хроматографски методи во фармацевтски анализи за определување на активни фармацевтски супстанции што имаат широка примена во аналитичките лаборатории на фармацевтската индустрија, како и во овластени лаборатории за контрола на квалитет на лекови.
 - Равој на еколошки подобни („зелени“) хроматографски методи преку примена на соодветен пристап што ќе овозможи замена на ацетонитрилот и метанолот (како најчесто користени токсични растворувачи во мобилната фаза).
 - Валидација на развиените еколошки подобни хроматографски методи согласно со ICH Водичот за валидација на аналитички методи (ICH Q2).
 - Испитување на применливоста на воспоставените методи за определување на содржина на активни супстанции во фармацевтските дозирани форми и споредба на добиените резултати со истите ќе бидат споредени со резултатите добиени со примена на конвенционалните (класични) хроматографски методи.
- Цел 2 Евалуација на еколошката прифатливост на развиените хроматографски методи преку примена на следните пристапи: ранг на еколошка подобност (*Eco-scale*), алатката за проценка на „зелен индекс“ на аналитички метод (*Analytical method greenness score, AMGS*) и „зелена метрика“ на аналитички метод (*Analytical greenness metrics approach, AGREE*).
- Цел 3. Подигнување на свеста на студентите за еколошки прифатливите хроматографски решенија преку нивна едукација

Цели	Временска рамка за реализација на проектот (месечи)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Воспоставување на еколошки прифатливи хроматографски методи во фармацевтски анализи							P1					
2. Евалуација на еколошката прифатливост на развиените хроматографски методи								P2				
3. Подигање на свеста на студентите преку едукација во однос на еколошки прифатливите хроматографски решенија												P3

*P – испорачан резултат



1.2. Преглед на реализираните активности со кои се оствариле целите и индикаторите со кои се следела реализацијата на целите и постигнувањето на резултатите

Цели / активности за реализација на целта	Индикатор за следење на реализацијата (И)
1. Воспоставување на еколошки прифатливи хроматографски методи во фармацевтски анализи	
1.1. Избор на активни фармацевтски супстанции (APIs) со конвенционални хроматографски методи и соодветни пристапи што се во согласност со GAC	И 1.1. Направен е избор на неколку конвенционални (еколошки неподобни) RP-HPLC методи на кои е применет пристапот за трансформација од конвенционален во еколошки прифатлив хроматографски метод
1.2. Развој и оптимизација на еколошки прифатливите хроматографски методи	И 1.2 Воспоставени се четири RP-HPLC еколошки прифатливи методи за определување на: - содржина на диазепам во обложена таблета - содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета - содржина на ривароксабан во филм-обложена таблета - сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета
1.3. Валидација на еколошки прифатливите хроматографски методи согласно ICH Водичот за валидација на аналитички методи (ICH Q2)	И 1.3 Спроведена е валидација на развиените еколошки прифатливи („зелени“) RP-HPLC методи за определување на: - содржина на диазепам во обложена таблета - содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета - содржина на ривароксабан во филм-обложена таблета - сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета
1.4. Споредба на критичните хроматографски параметри добиени со воспоставените еколошки прифатливите методи во однос на конвенционалните RP-HPLC методи	И 1.4 Добиели податоци од споредба на критичните хроматографски параметри (време на ретенција, резолуција, симетрија на пик и број на теоретски подови) на еколошките во однос на конвенционалните RP-HPLC методи
1.5. Испитување на применливоста на воспоставените методи	И 1.5 Воспоставените еколошки подобни RP-HPLC методи се применети за определување на: - содржина на диазепам во диазепам 5 mg обложена таблета - содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета (10mg / 10mg) - содржина на ривароксабан во ривароксабан 10 mg филм-обложена таблета - сродни супстанции на ривароксабан во ривароксабан 10 mg филм-обложена таблета И 1.6 Направена е статистичка споредба на добиените резултати со воспоставените еколошки прифатливите методи во однос на конвенционалните методи



Цели / активности за реализација на целта	Индикатор за следење на реализацијата (И)
2. Евалуација на еколошката прифатливост на развиените хроматографски методи	
2.1 Евалуација на еколошката прифатливост на воспоставените RP-HPLC и нивна споредба во однос на класичните методи за определување на APIs во фармацевтски дозирани форми	И 2.1. Податоци за еколошка прифатливост на методите (еколошки прифатливи vs конвенционални методи) со примена на: - проценка на ранг на еколошка подобност (<i>Eco-scale индекс</i>) - проценка на „зелен индекс“ на аналитички метод (AMGS алатка) - „зелена метрика“ на аналитички метод (Analytical greenness metrics approach, AGREE) - проценка на одржливост на метод (Whiteness score)
3. Подигање на свеста на студентите преку едукација во однос на еколошки прифатливите хроматографски решенија	
3.1. Дисеминација на резултатите	И 3.1 Резултатите се дисеминирани преку: - публикација на поглавје во книга - публикации во часописи со фактор на влијание и меѓународен уредувачки одбор - орални и постер презентации на научни собири
3.2. Едукација на студенти во однос на можностите на еколошки прифатливите хроматографски решенија	И 3.2 Организирана е работилница за студентите на Фармацевтскиот факултет со наслов „Развој на одржливи хроматографски методи во фармацевтски анализи – од теорија до пракса“; изработени се дипломски и магистерски трудови

1.3. Детален осврт на реализацијата на истражувањето и остварените резултати

1.3.1 Избор на конвенционални (еколошки неподобни) RP-HPLC методи за определување на содржина на API во ФДФ погодни за трансформација во еколошки прифатливи хроматографски методи

Првата фаза на овој проект опфати избор на конвенционални (еколошки неприфатливи) RP-HPLC методи за определување на активни фармацевтски супстанции (Active Pharmaceutical Ingredient, API) во фармацевтски дозирани форми (ФДФ) кои во тек на истражувањето би се трансферирале во еколошки прифатливи хроматографски методи. При изборот во предвид е земена количината на токсичните органски растворувачи што се применуваат во конвенционални RP-HPLC методи како за подготовка на примерокот за анализа, така и како растворувачи за мобилната фаза, а во предвид е земена и потрошувачка на овие лекови во третманот на хронични заболувања. Голема потрошувачка води кон зголемен обем на производство, а следствено на тоа и голем број на произведени серии кои што подлежат на контрола на квалитет. Во рамките на овој проект пристапено е кон развој на еколошки прифатливи („зелени“) хроматографски методи за: определување на содржина на диазепам во обложена таблета, истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета, определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета.

Диазепамот (DZP) се наоѓа на списокот на есенцијални лекови на Светската здравствена организација и претставува генерички лек што се произведува од различни фармацевтски компании ширум светот. Определувањето на содржина на диазепам, согласно официјалната монографија во USP (USP43-NF38), е со конвенционален RP-HPLC метод. Мобилна фаза е составена од смеса од ацетонитрил (ACN):вода (H₂O):метанол (MeOH), во однос 40:40:20 (% v/v/v), со што при рутинско изведување на оваа анализа се генерира големо количество на токсичен отпад. Дополнително, во литературата се достапни голем број на RP-HPLC методи со мобилна фаза составена од вода и метанол.



Комбинацијата на амлодипин/аторвастатин (AML/ATV) за третман на хипертензија и дислипидемија неодамна беше воведена на пазарот. Согласно Европската фармакопеја (Ph Eur., 11th edition), определувањето на содржина на AML се изведува со мобилна фаза составена од амониум ацетатен пуфер и метанол во однос 30:70 (% v/v), додека определувањето на содржина на ATV се изведува со градиентен RP-HPLC метод кој се состои од три мобилни фази (ацетонитрил и ацетатен пуфер со pH вредност 5 во сооднос 33:67 (% v/v), ацетонитрил и тетрахидрофуран). Од наведените хроматографски услови може да се заклучи дека поединечно следење на квалитетот на двете активни компоненти е долг и сложен процес, за чие што изведување се троши многу време, ресурси и се генерира големо количество на токсичен отпад. Согласно USP монографијата (USPNF 2021 Issue 1), за истовремено определување на содржина на двете активни компоненти се користи RP-HPLC метод со конвенционална мобилна фаза, при што истата се составена од ACN, MeOH и воден раствор A (ацетатен пуфер pH-5), во однос 38:15:47 (% v/v/v).

Ривароксабан (RIV) е уникатен анти тромботичен лек кој е одобрен од страна на Европската комисија и од страна на FDA на Соединетите Американски Држави како орален антикоагулантен лек. За време на пандемијата SARS-COVID-19, додадена беше и дополнителна индикација за RIV, што доведе да овој лек стане еден од најкористените орални антикоагуланси во третманот на компликациите COVID-19. Методите за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во таблети, опишани во монографијата на Европската фармакопеја и USP монографијата за Ривароксабан таблети, се конвенционални и како органски растворувач во мобилната фаза се користи голема количина на ацетонитрил. Дополнително, за подготовка на примероците за анализа се користи и диметилсулфоксид.

1.3.2 Развој и оптимизација на еколошки прифатливите хроматографски методи

1.3.2.1 Развој на еколошки прифатлив RP-HPLC метод за определување на содржина на диазепам во обложена таблета

Првиот чекор од развојот на методот беше исклучување на токсичните органски растворувачи (метанол и ацетонитрил) од мобилната фаза на конвенционалниот (референтен) USP метод и нивна замена со етанол, како еколошки најподобен растворувач. Разделувањето беше извршено на хроматографска колона Lichrosper® 100 RP-18 (250 mm × 4 mm, 5 µm) со изократско елуирање користејќи мобилна фаза составена од смеса на H₂O и EtOH со проток од 1,0 mL/min. Волуменот на инјектирање беше 10 µL, а брановата должина на детекција 254 nm.

Уделот на органскиот растворувач во конвенционалниот метод е 60 % (v/v). Имајќи во предвид дека етанолот има поголема елуциона моќ, во прелиминарните истражувања користен е удел на етанол од 50 % (v/v). pKa вредноста на диазепам изнесува 3,4, додека pH вредноста на мобилната фаза (H₂O: EtOH, 50:50, v/v %) изнесува 6,5. Иако бројот на теоретските подови (N) беше задоволителен, симетријата на пикот (As) беше повисока од 1,2 (1,27). Промени во уделот на етанол во мобилната фаза, како и температурата на колоната не доведоа до подобрување на симетријата на пикот. Истражувањето е продолжено на други две хроматографски колони: Spherisorb C18 (125 mm × 4,0 mm, 5 µm) и Lichrosper® 100 RP-18 (250 mm × 4,0 mm, 5 µm). Симетријата на пикот добиена со користење на Spherisorb C18 хроматографска колона не ги задоволи потребните критериуми (As >1,2). Анализата спроведена на хроматографската колона Lichrosper® 100 RP-18 ги исполни барањата за соодветност на системот (As < 1,2). Иако литературните податоци укажуваат дека мобилна фаза што содржи етанолот доведува до повисок притисок на колона, под дефинираните хроматографски услови на методот притисокот на колоната се движеше во прифатливи граници (околу 200 bar). Зголемување на содржината на EtOH во мобилната фаза до 60 % (H₂O:EtOH, 40:60, % v/v) доведе со подобрување на симетријата на пикот на DZP, како и со зголемување на бројот на теоретски подови. Експериментите покажаа дека хроматографското однесување на EtOH е слично со тоа на ACN. Температурата на колоната исто така беше оптимизирана. Зголемување на температурата на колоната за 10 °C (од 25 °C до 35 °C) доведе до пократко време на ретенција (Rt) на DZP.

Оптимизирани хроматографски услови за определување на диазепам во обложена таблета се: хроматографска колона Lichrosper® 100 RP-18 (250 mm × 4 mm, 5 µm); мобилна фаза составена од смеса на H₂O и EtOH во сооднос 40:60 (% v/v), проток од 1,0 mL/min; волуменот на инјектирање 10 µL, температурата на колона 35 °C и брановата должина на детекција 254 nm.



1.3.2.2 Равој на еколошки прифатлив RP-HPLC метод за истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета

Почетните хроматографски услови за развој на „зелен“ RP-HPLC метод за истовремено определување на AML и ATV беа избрани земајќи ги во предвид условите опишани во монографијата на Американската фармакопеа (USP) за определување на AML и ATV во таблети, како и конвенционалниот метод предложен од страна на Чаудари и соработниците [Chaudhari et al., 2007]. Имајќи ги во предвид хроматографските услови наведени во конвенционалните методи, за разделување на двата аналити користена е октадецилсилика стационарна фаза (C18 250 x 4,0 mm, 5 μ m), мобилната фаза која содржи EtOH и фосфатен пуфер (pH 3,0) во сооднос 60:40 (% v/v), температурата на колоната од 25°C, брановата должина на детекција 254 nm. Протокот од 1 mL/min беше намален на 0,8 mL/min поради поголемиот вискозитет на мобилната фаза. Под овие услови R_t на AML беше 5,6 min, додека R_t на ATV беше 9,4 min. Сепак, овие почетни услови не ги задоволуваа критериумите за соодветност на системот во однос на симетријата на пикот ($A_s > 2$) и ефикасноста на колоната изразена преку бројот на теоретски подови ($N < 2000$). Со цел подобрување на симетријата на пикот, и намалување на притисокот на колоната, температурата на колоната дополнително се зголеми на 40°C. Како што се очекуваше, повисоката температура на колоната обезбеди прифатлив работен притисок (околу 200 bar), но немаше подобрување на симетријата на пикот. Зголемување на содржината на етанол во мобилната фаза доведе до прифатлива ефикасност на колоната ($N > 2000$) и одлична симетрија на пикот на ATV ($A_s = 1.0$). Сепак симетријата на пикот на AML ($A_s = 1.9$) не ги задоволуваа потребните критериуми за соодветност на системот. Од тие причини развојот на методот е продолжен на хроматографската колона со октасилика (C8) стационарна фаза. Изборот на C8 како стационарна фаза првенствено е засновано на теоретското знаење дека пократкиот јаглеродороден ланец (C8 во споредба со C18) обезбедува помала интеракција, со што би се подобрила симетријата на пикот, а во исто време би се намалило времето на задржување на аналитот. Дополнително, оваа стационарна фаза е дизајнирана да ја намали или елиминира силната адсорпција на базни аналити, како што е AML, со што се дополнително би се подобрила симетријата на пикот. Задоволување на критериумите за соодветност на системот е постигнато со примена на етанол и 0.02M NaH_2PO_4 (pH 3,0) во сооднос 63:37 (% v/v) како мобилна фаза, температура на колоната од 40°C, проток од 0,8 mL/min, волуменот на инјектирање 10 μ L и брановата должина на детекција 254 nm. Под дефинираните хроматографски услови, постигнато е идеално раздвојување на AML и ATV за време од 5 минути ($R_s > 5$), со соодветни вредности на симетрија на пик (A_s 1,0-1,2 за двата аналита) и висока ефикасност на колоната ($N > 4000$).

1.3.2.3 Равој на еколошки прифатливи RP-HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета

Земајќи ги во предвид принципите на GAC, равојот на методот за определување на содржина на RIV започна со замената на ацетонитрил од мобилната фаза опишана во конвенционалниот метод (Turner, 2013) со етанол како еколошки прифатлив органски растворувач. Дополнително, развојот на методот вклучуваше и избор на еколошки погоден растворувач за подготовка на примероците за анализа. Имено, рибароксабан е практично нерастворлив во вода и во етанол, додека е слабо растворлив во органски растворувачи (пр. ацетон, диметилсулфоксид). При развојот на методот беа евалуирани различни растворувачи. Диметилсулфоксидот се покажа како несоодветен растворувач бидејќи даваше пикови во хроматограмот кои интерферираа со пикот на аналитот. Испитувањата покажаа дека RIV е слободно растворлив во растворувач што претставува мешавина од EtOH и 0,1% оцетна киселина (50:50, % v/v). Изборот на мешавина од EtOH и оцетна киселина е компатибилен со составот на мобилната фаза и има поголема еколошка подобност во споредба со растворувачите користени за подготовка на примероци за анализа опишани во литературата. Ретенционото време на RIV добиено со примена на EtOH во мобилната фаза (R_t 4,3 min), беше споредливо со R_t RIV добиен со примена на ACN во мобилната фаза (R_t 3,37 min). Уделот на EtOH во мобилната фаза беше оптимизиран во насока на постигнување на резолуција од најмалку 1,5 помеѓу пикот на RIV и онечистувањето H (R_s RIV/imp. H). Резолуцијата помеѓу онечистувањето G и RIV (R_s imp. G/RIV) не е критична бидејќи ова онечистување има релативен фактор на ретенција (Relative retention time, RRt) од 0,6.



Оптимизираниите хроматографски услови за определување на содржина на ривароксабан се: хроматографска колона X-Bridge C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μ m); мобилна фаза составена од смеса на етанол и вода во сооднос 35:65 (% v/v), проток од 1,0 mL/min; волуменот на инјектирање 5 μ L, температурата на колоната од 45 °C и брановата должина на детекција 250 nm.

При развојот на еколошки подобниот RP-HPLC метод за определување на сродни супстанции на RIV, во предвид беа земени официјалните методи опишани во монографијата за Ривароксабан таблети во Европската фармакопеа Ph. Eur [European Pharmacopoeia. General monographs: rivaroxaban tablets. 11th Ed. 2022-2023] и Американската USP фармакопеа [United States Pharmacopoeia, 2023, USP Monographs, Rivaroxaban Tablets, USP-NF]. Согласно барањата за соодветност дефинирани во наведените официјални методи, онечистувањето G (imp. G) и онечистувањето H (imp. H) се клучни за демонстрирање на соодветноста на системот. Покрај наведените онечистувања, во развојот на хроматографските услови, во предвид беше земено и онечистувањето 14 (imp. 14) кое има различна поларност од imp. G и imp. H. Дополнително, при развојот на методот за онечистувања, вклучени беа и раствори на RIV добиени со киселинска (1 M HCl, 1 h на 80 °C), и алкална (1 M NaOH, 1 h на 80 °C) форсирана деградација. Имајќи ги во предвид литературните податоци за стабилност на молекулата на ривароксабан, не беше потребно вклучување на раствори добиени со фотолиза, термолита и оксидативна форсирана деградација. При киселинската деградација беа добиени четири деградациони продукти (најголема застапеност на imp. 14 и imp. H). Во услови на алкална хидролиза, беа забележани вкупно пет деградациони продукти, вклучувајќи четири непознати онечистувања (најголема застапеност на едно рано елуирачко онечистување означено како imp. I и imp. H).

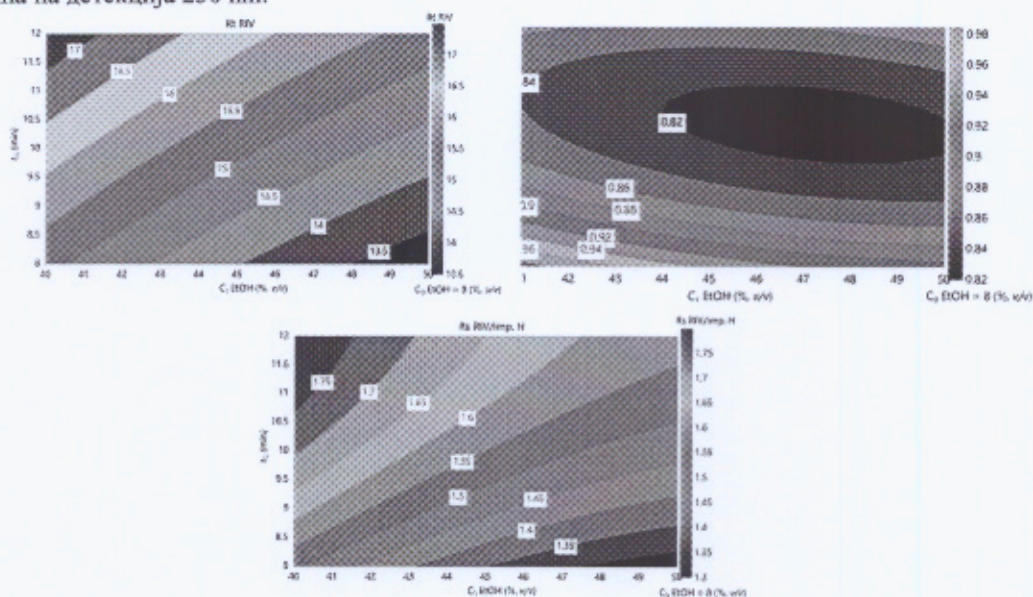
Почетните хроматографски услови беа избрани врз основа на литературни податоци. Со цел развивање на еколошки подобен метод, користени беа етанол и вода како растворувачи во мобилната фаза. Хроматографските услови за градиентно елуирање беа оптимизирани со примена на два сета на DoE (MODDE 10.0 Software Umetrics, Umea, Sweden), што овозможи постигнување на оптимално раздвојување помеѓу RIV и неговите сродни супстанции со најмал можен број на експерименти. За скрининг на почетните услови беше користен Fractional Factorial експериментален дизајн (Design of Experiments, DoE) на две нивоа (11 експерименти) со четири експериментални фактори: процентот на EtOH во изократскиот дел од градиентот (C_0 EtOH од 5-10 % v/v), должината на изократскиот дел од градиентот дефинирано како градиентно задоцнето време (tD од 1-5 min), градиентно време (tG од 8-12 min) и конечен процент на EtOH во мобилната фаза (C_1 EtOH од 36-40 % v/v). Првиот сет DoE беше искористен за да се проценат ефектите на експерименталните фактори врз следените хроматографски одговори: резолуција помеѓу RIV и imp. H (R_s RIV/imp.H) и факторот на капацитет на рано елуирачко онечистување (k' imp. 1). Меѓутоа применетите експериментални услови не обезбедија задоволителна резолуција и фактор на задржување (R_s RIV/imp.H < 1,5 и k' imp. 1 < 0,5). Од друга страна, резолуцијата помеѓу онечистувањето G и RIV (R_s imp. G/RIV) под сите експериментални услови беше поголема од 5, што го задолговува критериумот за соодветност на системот дефиниран во монографијата во Ph. Eur. Одтука овој хроматографски одговор не се сметаше за критичен. Дополнително, немаше интерференција помеѓу imp. 14 и останатите онечистувања добиени со формирана деградација. Евалуацијата на критичните хроматографски одговори добиени од првиот сет покажа дека градиентно задоцнето време (tD) нема значително влијание врз одговорите, поради што овој експериментален фактор не беше евалуиран. Вредноста на tD беше дефинирана на 3 min, што овозможува елиминација на разликите во волуменот на задржување (dwell volume) помеѓу различните HPLC инструменти, овозможувајќи лесен трансфер на методот меѓу лаборатории.

2^3 Central Composite Faced (CCF) DoE, беше применет за понатамошно оптимизирање на хроматографските услови. Во оптимизацијата беа вклучени три критични фактори: C_0 EtOH (8-12 % v/v), tG (8-12 min) и C_1 EtOH (40-50 % v/v). Изведени беа 17 експерименти, додека хроматографскиот одговор беше следен преку: Rt RIV (< 15 min), R_s RIV/imp. H ($\geq 1,5$) и фактор на капацитет на онечистување 1 (k' imp. 1 > 0,5). Проценката на критичните хроматографски одговори покажа дека задоволителни вредности во однос на Rt RIV и R_s RIV/imp. H можат да се постигнат во широк опсег на комбинации на испитуваните експериментални фактори, но задоволителна вредност за k' imp. 1 се постигнува во многу тесна област на експериментални фактори (Слика 1). Rt RIV помало од 15 min и R_s RIV/imp. H поголемо од 1,5 може да се постигне со помал процент на EtOH во мобилната фаза ($C_1 \sim 41\%$) и пократко градиентно време (tG ~ 8 min); или со поголем процент на EtOH и подолго градиентно време. Соодветно задржување на imp. 1 (k' imp. 1 ~ 1) се забележува само во услови кога C_1 е помеѓу 40-41% и tG се движи помеѓу 8 min до 9 min (слика). C_0 EtOH немаше влијание на критичните хроматографски одговори и беше дефинирано



на 8%. По внимателна евалуација на добиените резултати, беше воспоставен конечниот градиентен програм на методот.

Оптимизираните хроматографски услови за определување на сродни супстанции на ривароксабан се: хроматографска колна X-Bridge C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm); мобилна фаза составена од смеса на етанол и вода со градиентно елуирање изразено преку удел на етанол (EtOH): 0 - 3 min 8% v/v EtOH; 3 - 6 min од 8% до 23% v/v EtOH; 6 - 14 min од 23% до 44% v/v EtOH; 14 - 17 min 44% v/v EtOH; 17 - 18 min од 44% до 8% v/v EtOH (враќање на иницијални услови); 18 - 27 min 8% v/v EtOH (рееквилибрирање). Проток беше 1,0 mL/min; волуменот на инјектирање изнесува 5μL, температурата на колона од 45 °C и брановата должина на детекција 250 nm.



Слика 1. Дијаграми на површина на одговор за оптимизација на метод за определување на сродни супстанции на ривароксабан

1.3.3 Критичните хроматографски параметри добиени со воспоставените еколошки прифатливи методи

1.3.3.1 Еколошки прифатлив RP-HPLC метод за определување на содржина на диазепам во обложена таблета

Споредбата на параметрите за соодветност на системот (System suitability, SS) постигнати со развиениот еколошки прифатлив метод и референтниот USP метод за определување на DZP во обложена таблета се претставени во Табела 1. Резултатите од споредбата покажаа дека еколошкиот метод развиен во ова истражување дава вредности за соодветност на системот што се споредливи со референтниот конвенционален метод.

Табела 1. Споредба на критични параметри на референтен (конвенционален) метод во однос на „еколошки прифатлив“ метод

Параметар	Барања за соодветност	Конвенционален (USP) метод	Еколошки прифатлив метод
Ретенционо време (R_t , min)	3 - 8 минути	4,0	4,3
Симетрија на пик (A_s)	0,8 -1,2	1,17	1,12
Теоретски подови (N)	Најмалку 2000	4586	4175



1.3.3.2 Еколошки прифатлив RP-HPLC метод за истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета

Направена е споредба помеѓу критичните хроматографски параметри (R_t , A_s , N , R_s AML/ATV) помеѓу предложениот одржлив метод, конвенционалниот метод [Chaudhari et al., 2007] и претходно објавениот неконвенционален („зелен“) метод предложен од страна на Хемдан [Hemdan et al., 2014] (Табела 2).

Табела 2. Споредба на критични параметри на предложениот „еколошки прифатлив“ метод и литературно достапен конвенционален и „зелен“ метод

Параметар	Барања за соодветност	Предложен метод		Конвенционален метод [Chaudhari et al., 2007]		„Зелен“ метод [Hemdan et al., 2014]	
		AML	ATV	AML	ATV	AML	ATV
Ретенционо време R_t (min)	2 - 7	2.5	3.5	2,8	5,0	6.8	3.3
Симетрија на пик (A_s)	0.8 - 1.2	1.1	1.0	1,2	1,3	1.4	1.4
Теоретски подови (N)	≥ 2000	4094	4116	1677	727	1044	1438
Резолуција (R_s AML/ATV)	≥ 2	5.6		> 2		3.5	

Споредбата на параметрите за соодветност на системот покажа дека еколошки подобниот метод развиен во ова истражување овозможува пократко време на анализа, како и подобрена симетрија на пикот на аналитите. И покрај пократкото време на анализа, резолуцијата помеѓу аналитите не е намалена ($R_s=5,6$) и во исто време е постигната значително поголема ефикасност на колона. Споредбата на критичните хроматографски параметри покажа дека конвенционалниот метод, како и претходно објавениот „зелен“ метод, не ги задоволуваат критериумите за ефикасност на колона.

Мобилната фаза опишана во методот предложен од Хемдан и сор. се состои од EtOH и пуферски раствор (pH 7,0). Под овие услови, ATV е прво елуиран аналит (R_t 3.3), додека AML се елуира како втор (R_t 6.8). Мобилната фаза претставена во ова истражување се состои од етанол и пуферски раствор со pH вредност од 3,0. pKa вредност на ATV изнесува 4,46, додека вредноста на партициониот коефициент ($\log P$) изнесува 6,36. Вредноста на pKa за AML е 9,26, а $\log P$ изнесува 3,0. При pH вредност на мобилната фаза од 7,0, молекулата на ATV е во јонизирана форма и се елуира пред нејонизираната форма на AML. Во случај кога се користи мобилна фаза со pH 3,0, двете молекули се во нивната нејонизирана форма; па редоследот на елуирање зависи од поларноста на аналитот. Следствено, под оптимизираните хроматографски услови AML е прв елуиран аналит. Ова истражување покажа дека за раздвојување на AML и ATV посоодветна е примена на мобилната фаза во кисела средина, бидејќи времето на задржување на аналитите е пократко, а истовремено се подобрува и симетријата на пикот.

1.3.3.3 Еколошки прифатливи RP-HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета

Дефинираните параметри за следење на соодветноста на развиените RP-HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета, како и добиените хроматографски одговори се дадени во Табела 3. Резултатите од соодветноста на системот потврдуваат дека еколошки подобните RP-HPLC методи развиени во овој проект ги исполнуваат потребните критериуми за соодветност на системот.



Табела 3. Барања за соодветност на систем и добиени хроматографски одговори за RP-HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета

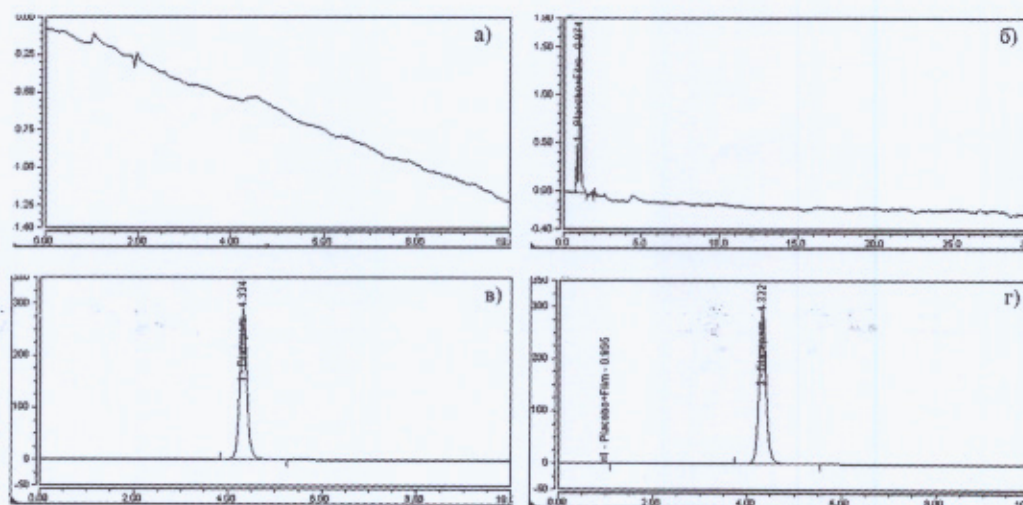
Параметар	Барања за соодветност	Добиени вредности
Метод за содржина		
Ретенционо време RIV (R_t , min)	3 - 8	5,67
Симетрија на пик (As)	0,8 - 1,8	1,2
Теоретски подови (N)	Најмалку 2000	
Резолуција помеѓу RIV и imp. H	$\geq 1,5$	2,1
Метод за сродни супстанции		
Ретенционо време RIV (R_t , min)	≤ 15	14,9
Резолуција помеѓу imp. G/RIV	$\geq 5,0$	17,6
Резолуција помеѓу RIV/imp.H	$\geq 1,5$	2,1

1.3.4 Валидација на еколошки прифатливи хроматографски методи

Сите еколошки прифатливи RP-HPLC методи развиени во ова истражување се валидирани во согласност со Водичот на ICH Q2(R1) (2005) во однос на селективноста/специфичноста, линеарноста, осетливоста, точноста, прецизноста и робушноста.

1.3.4.1 Валидација на еколошки прифатлив RP-HPLC метод за определување на содржина на диазепам во обложена таблета

Репрезентативни хроматограми од испитувањето на специфичноста се прикажани на Слика 2, додека резултатите добиени од испитување на линеарноста, прецизноста и точноста се прикажани во Табела 4 и Табела 5, соодветно.



Слика 2. Репрезентативни хроматограми од: а) растворувач, б) раствор на плацебо, в) стандарден раствор на диазепам, г) пробен раствор



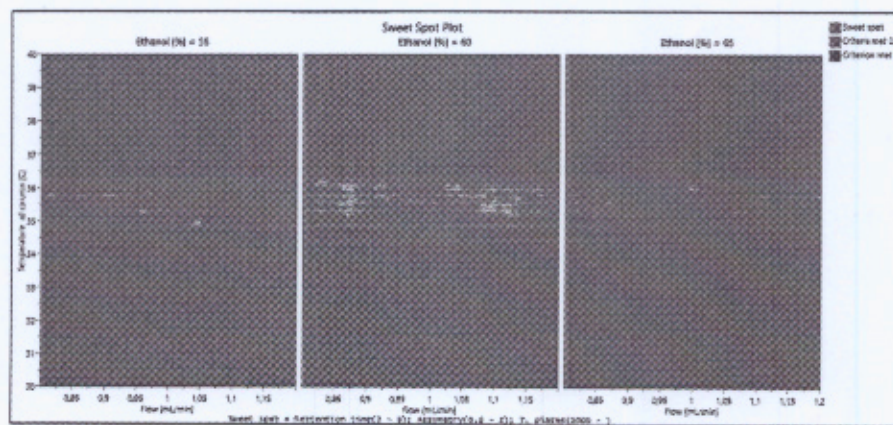
Табела 4. Резултати за линеарност и прецизност на метод

Параметар од валидација	Вредност
Линеарност на метод	
- концентрациски опсег (mg/mL)	0,05 – 0,15
- коефициент на корелација	0,9999
- Интерсепт	0,2507
- нагиб	520,79
Прецизност на метод (RSD, %)	
- повторливост на метод (n=6)	1,0
- интермедиерна прецизност (n=6)	
Аналитичар 1	1,0
Аналитичар 2	0,8

Табела 5. Резултати за точност на метод

Концентрациско ниво (%)	Додадено (mg/mL)	Определено (mg/mL)	Принос (%) P = 95%
50	0,05	0,05	100,03 ± 0,50
100	0,10	0,10	100,30 ± 0,72
150	0,15	0,15	99,73 ± 0,51

Робусноста на методот е испитана со помош на MODDE® софтверот (Umetrics) за дизајнирање на експерименти, при што на брз и економичен начин се изведени поголем број на експерименти. Целта беше да се верификува дека методот ќе биде робустен при мали отстапувања на хроматографските услови што можат да се јават при трансфер на методот од една во друга лабораторија, како и при секојдневната работа. Робусноста на методот е определена преку мали промени на протокот на мобилната фаза ($\pm 0,2$ mL/min), уделот на етанол во мобилната фаза ($\pm 5\%$ v/v) и температурата на колоната ($\pm 5^\circ\text{C}$). Истата е евалуирана преку 11 експерименти со користење на дизајнот Plackett-Burman, при што се анализирани трите фактори на две нивоа. Со цел да се олесни визуелизацијата на интеракциите помеѓу факторите и нивниот индивидуален ефект, креиран е Sweet spot дијаграм (Слика 3). Добиената зелена површина го претставува делот од проектираниот простор каде што се исполнети сите критериуми за испитуваните одговори (т.н sweet spot): Rt од 3 до 8 минути, As од 0,8 до 2,0 и N од најмалу 2000. Валидацијата на моделот со ANOVA покажа дека моделот соодветно го претставува односот помеѓу експерименталните фактори и хроматографските одговори.

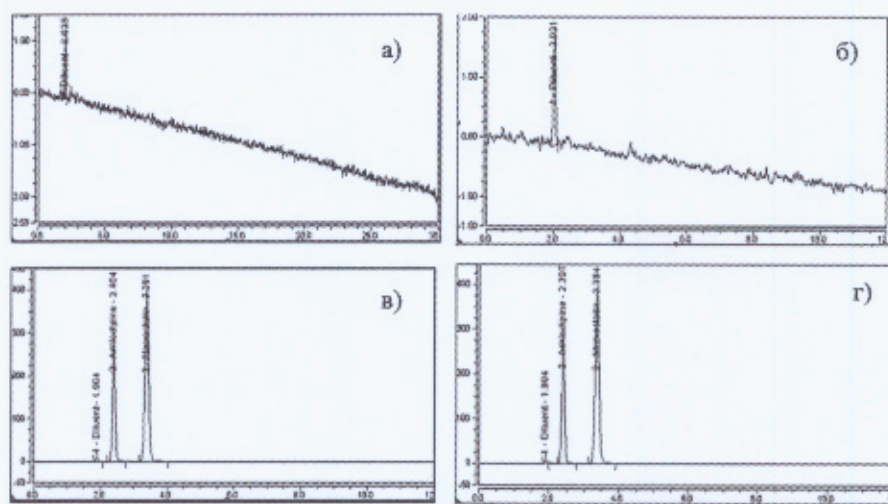


Слика 3. Sweet spot дијаграм



1.3.4.2 Валидација на еколошки прифатлив RP-HPLC метод за истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета

Репрезентативни хроматограми од испитување на специфичноста се прикажани на Слика 4, додека резултатите добиени од испитување на линеарноста, прецизноста и точноста на методот се прикажани во Табела 6, соодветно.



Слика 4. Репрезентативни хроматограми од: а) растворувач, б) раствор на плацебо, в) стандарден раствор на амлодипин и аторвастатин, г) пробен раствор

Табела 6. Резултати од валидација на методот

Параметар од валидација	AML	ATV
<i>Линеарност на метод</i>		
Концентрациски опсег (mg/mL)	0.05 – 0.15	0.05– 0.15
Коефициент на корелација	0.9999	0.9999
Интерсепт	0.0896	-0.0996
Нагиб	267.03	268.28
<i>Точност (Принос, % / RSD, n=3)</i>		
50%	100.30 ± 0.7 / 0.65	100.80 ± 0.7 / 0.65
100%	100.43 ± 0.6 / 0.57	100.10 ± 0.3 / 0.30
150%	99.87 ± 0.4 / 0.40	100.00 ± 0.3 / 0.30
<i>Повторливост (n=6)</i>		
Повторливост на систем (AUC стандарден раствор)	26.73	26.96
Повторливост на метод (Содржин во % / RSD %)	100.9 % / 0.13	100.7 / 0.15
<i>Интермедиерна прецизност</i>		
Аналитичар 1 (n=6)	100.9 % / 0.7	100.7 % / 0.4
Аналитичар 2 (n=6)	100.4 % / 0.6	100.5 % / 0.6
RSD	0.7	0.5



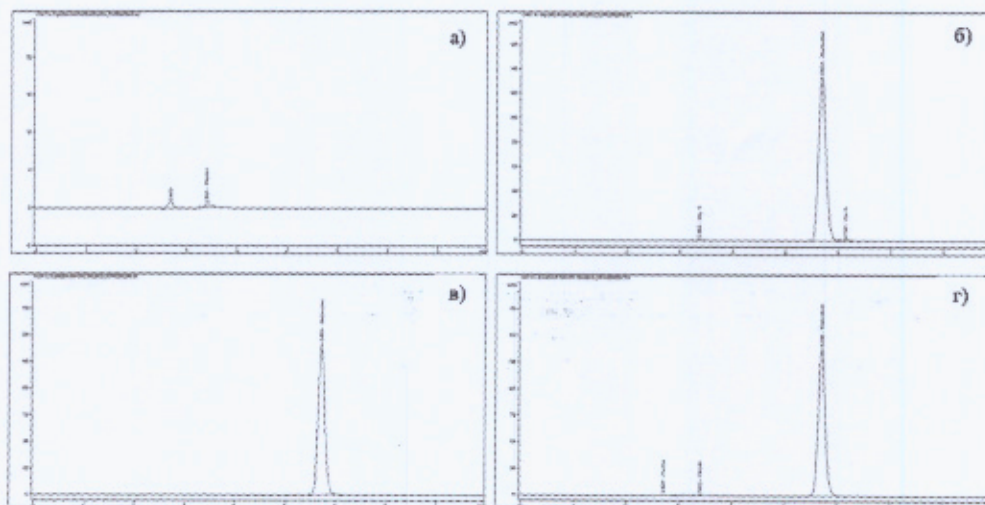
За испитување на робушноста на методот беа изведени 11 експерименти користејќи го Plackett-Burman експерименталниот дизајн (MODDE Go софтвер, Umetrics). Евалуирани беа три критични експериментални фактори: содржина на етанол (EtOH, % v/v) во мобилната фаза ($62 \pm 1\%$ v/v), проток ($0,8 \pm 0,2$ mL/min) и температура на колона (40 ± 5 °C). Проценката на хроматографскиот одговор е направена преку: R_t на аналитите (1,5 до 6 мин); As од 0,8 до 1,8; $N \geq 2000$ и R_s AML/ATV ≥ 2 (Табела 7). Моделот беше потврден со анализа на варијанса (ANOVA). Добиените резултати потврдија дека развиениот метод е робустен во испитуваното експериментално подрачје.

Табела 7. Експериментални фактори и хроматографски одговори за испитување на робушност на еколошки подобен метод за определување на AML и ATV, со примена на Plackett-Burman дизајн

Експеримент	Проток (mL/min)	T (°C)	EtOH (% v/v)	R_t (min) AML	R_t (min) ATV	As (AML)	As (ATV)	N (AML)	N (ATV)	R_s AML/ATV
N1	0.6	35	62	3.26	4.80	1.16	1.06	4858	5011	6.72
N2	1.0	35	62	1.99	2.92	1.15	1.03	3550	3580	5.65
N3	0.6	35	64	3.15	4.33	1.19	1.10	4906	5002	5.54
N4	1.0	35	64	1.93	2.64	1.11	1.03	3601	3621	4.70
N5	0.6	45	62	3.21	4.64	1.14	1.05	5020	5239	6.57
N6	1.0	45	62	1.96	2.84	1.12	1.01	3583	3619	6.52
N7	0.6	45	64	3.10	4.21	1.16	1.06	5115	5273	5.48
N8	1.0	45	64	1.86	2.58	1.14	1.10	3599	4196	4.81
N9	0.8	40	63	2.47	3.59	1.17	1.08	3926	3786	5.73
N10	0.8	40	63	2.46	3.57	1.16	1.09	3923	3793	5.71
N11	0.8	40	63	2.46	3.59	1.17	1.11	3943	3787	5.70

1.3.4.2 Валидација на еколошки прифатливи RP-HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета

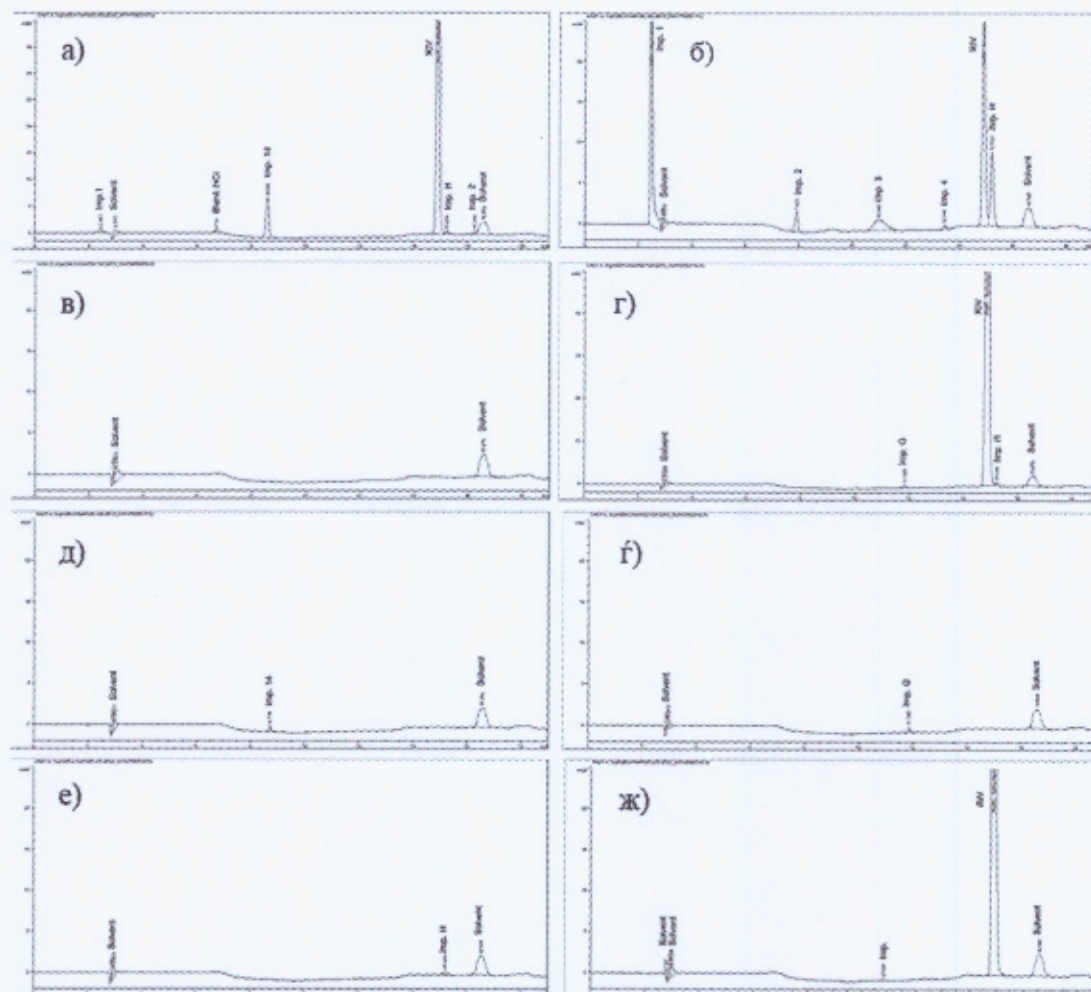
За потврдување на специфичноста на методот за определување на содржина на RIV беа анализирани хроматограми од растворувач, раствор на плацебо, раствор за резолуција, стандарден раствор на RIV, пробен раствор, како и поединечни стандардни раствори од онечистувања (imp. G и imp. H). Од приложените хроматограми се потврдува дека не постои интерференција помеѓу пикот на аналитот, пикот од растворот на плацебо и пикот на специфицираните онечистувања (Слика 5).



Слика 5. Хроматограми од испитување на специфичност на метод за определување на содржина на RIV: а) раствор на плацебо, б) раствор за резолуција, в) стандарден раствор на ривароксабан, г) пробен раствор



За потврдување на специфичноста/селективноста на методот за определување на сродни супстанции на RIV, беа анализирани раствори добиени со форсирана киселинска и алкална деградација. Репрезентативни хроматограми на растворувач, раствор на плацебо, раствори на форсирана деградација, како и на стандардни раствори на специфицираните онечистувања (imp. G, imp. H и imp. 14) се претставени на Слика 6. Со предложените хроматографски услови е постигнато целосно раздвојување помеѓу пиковите на RIV, специфицираните онечистувања, неспецифицираните онечистувањата добиени со форсирана деградација, како и пикот од плацебото, со што е потврдена специфичноста на методот.



Слика 6. Хроматограми од испитување на специфичност на метод за определување на сродни супстанции на RIV: а) стандарден раствор на RIV добиен при форсирана алкална деградација (1 M NaOH, 1 h на 80 °C), б) стандарден раствор на RIV добиен при форсирана киселинска деградација (1 M HCl, 1 h на 80 °C), в) раствор на плацебо, г) раствор за резолуција, д) стандарден раствор на imp. 14, е) стандарден раствор на imp. G, е) стандарден раствор на imp. H, ж) пробен раствор

Линеарноста на методот за содржина е потврдена во концентрационен опсег од 0,05 mg/mL до 0,15 mg/mL (50 – 150% од работната концентрација). Добиената вредност на коефициентот на корелација R^2 (0,9999) ја потврдува линеарноста на методот во оценетиот опсег. Потврдена точност на методот (Табела 8) во поширокиот концентрациски опсег (70% -130% од работната концентрација, наместо 80% - 120%) потврдува дека предложениот метод може да се користи и за определување на воедначеност на содржина на RIV во филм-обложена таблета. Прецизноста на методот беше потврдена преку испитување на прецизноста на системот (RSD 0,34% од шест инјектирања на стандарден раствор) и прецизноста на методот (RSD = 0,34% од анализа на шест пробни раствори).



Линеарност на методот за сродни супстанции е испитана на пет концентрациски нивоа кои се движат од границата на квантификација (Quantification limit, QL) до 150% од работната концентрација (0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,4 и 0,6 $\mu\text{g/mL}$ за RIV и за секое од специфицираните онечистувања) (табела). Добиените резултати за аналитичкиот принос испитан во опсег на линеарност (QL, 50%, 100% и 150% од работната концентрација) за RIV, imp. G, imp. 14 и imp. H (Табела 8) ја потврди точноста на методот. Вредноста за RSD добиена од шест повторени инјектирања на стандардните раствори на RIV и специфицираните онечистувања, како и вредноста за RSD добиена од анализата на шест пробни раствори беше пониска од 5%, со што се потврди прецизноста на системот и на методот. Вредностите за лимитот на детекција (Detection limit, DL) и лимитот на квантификација (QL) за за RIV, imp. G, imp. 14 и imp. H се прикажани во Табела 9. Методот овозможува квантификација на сродните супстанции во концентрации од 0,10 $\mu\text{g/mL}$ до 0,15 $\mu\text{g/mL}$, со што се потврдува осетливоста на методот.

Табела 8. Резултати за параметарот точност од валидација на методите

Точност на метод за содржина				
Концентрациско ниво (%)	Принос (%)		RSD (n=3)	
70 %	98.9 ± 0.008		0.003	
100 %	98.2 ± 0.008		0.001	
130 %	98.3 ± 0.009		0.001	
Точност на метод за сродни супстанции				
Концентрациско ниво (%)	RIV	RIV imp. G	RIV imp. H	RIV imp. 14
	Принос (%)			
LOQ	93.15 ± 0.91	93.44 ± 1.09	92.31 ± 1.52	94.63 ± 1.25
50 %	98.92 ± 0.35	98.72 ± 0.43	98.61 ± 0.45	98.97 ± 0.37
100 %	99.15 ± 0.15	99.50 ± 0.35	98.41 ± 0.38	99.01 ± 0.22
150 %	98.86 ± 0.24	98.96 ± 0.39	98.74 ± 0.54	99.26 ± 0.28

Табела 9. Резултати од валидација на методите за параметрите линеарност, лимит на детекција (DL), лимит на квантификација (QL)

Аналит	Регресиона равенка (y)				Коефициент на корелација	DL / QL ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Нагиб (b)	Интерсепт (a)	Интерсепт % (грешка)	Стандард -на грешка		Од калибрацио-на крива	Експериментал-но определен
RIV	0.1046	13.204	1.95	0.129	0.9973	0.03 / 0.10	0.05 / 0.15
Imp. 14	0.0827	10.579	2.01	0.091	0.9977	0.03 / 0.09	0.05 / 0.10
Imp. G	-0.0731	11.002	-1.53	0.101	0.9980	0.03 / 0.09	0.05 / 0.10
Imp. H	-0.258	10.676	-4.91	0.098	0.9975	0.03 / 0.09	0.05 / 0.15

За испитување на робушноста на двата воспоставени методи користен е 2^3 Central Composite Face (CCF) дизајн на експерименти (Табела 10). Дефинирани критични експериментални фактори за методот за содржина беа: концентрација на EtOH ($35 \pm 2\%$, v/v), проток (0,8 - 1,2 mL/min) и температура на колоната ($45 \pm 2^\circ\text{C}$). За испитување на робушноста на методот за сродни супстанции беа испитани следните експериментални фактори: градиентно задоцнето време, tD (3 ± 1 min), градиентно време, tG (8 ± 1 min) и проток (0,9 - 1,1 mL/min) (Табела 10). Резултатите добиени при испитување на робушноста на методите укажуваат дека мали, но намерни промени во хроматографските услови не влијаат дефинираните



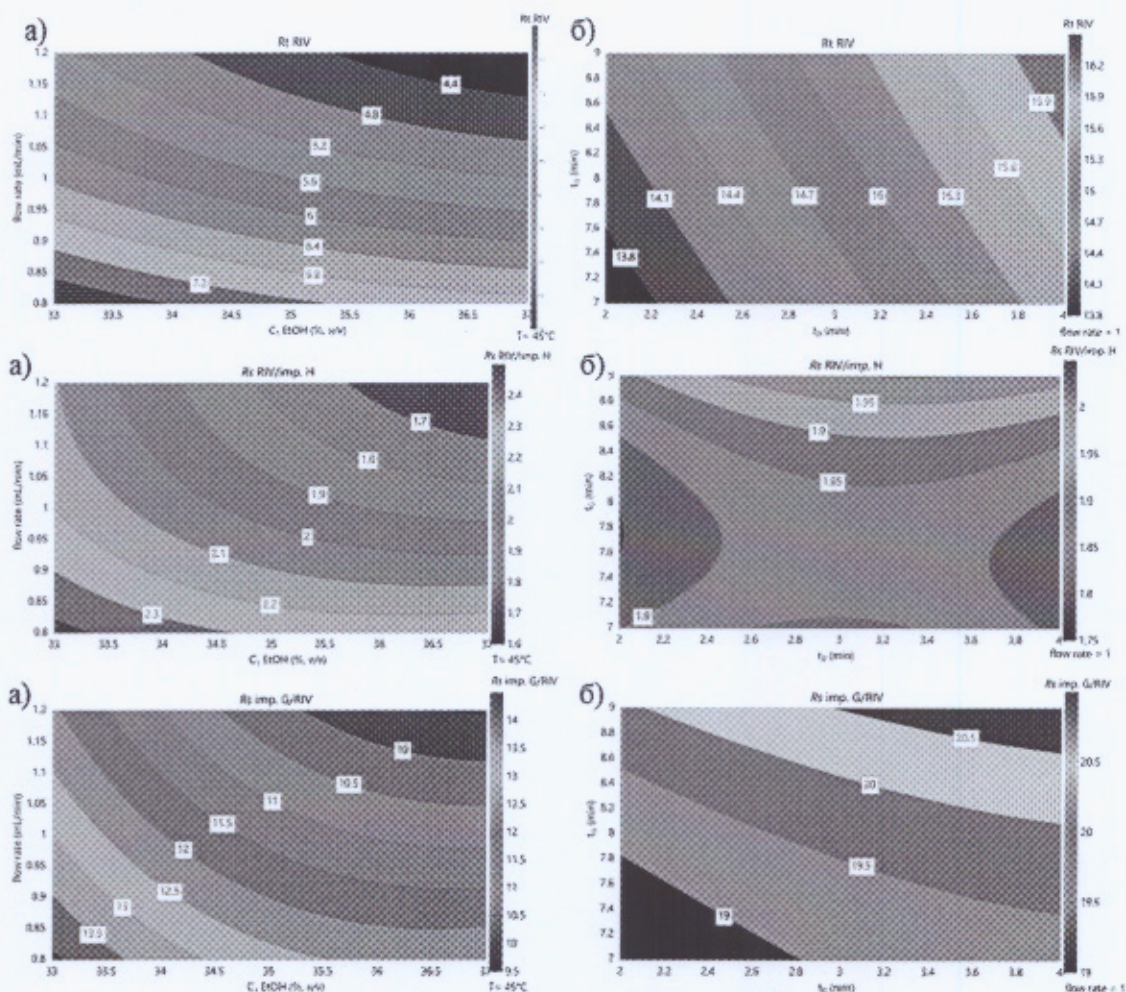
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ -Скопје
Фармацевтски Факултет



параметри за соодветност на системот, односно сите барања за соодветноста на системот се во дозволените граници на прифатливост (Табела 10, Слика 7).

Табела 10. Резултати од испитување на робусност на воспоставените „зелените“ RP-HPLC методи за определување на содржина и сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета со примена на 2³ Central Composite Face DoE

Метод за соржина							Метод за сродни супстанции					
Експериментален фактор				Хроматографски одговор			Експериментален фактор			Хроматографски одговор		
Екс. број	EtOH (% v/v)	Проток (mL/min)	T _{колона} (° C)	Rt RIV (min)	Rs (RIV/ imp. H)	Rs (imp. G / RIV)	t _b	t _g	Проток (mL/min)	Rt RIV (min)	Rs (RIV/ imp. H)	Rs (imp. G / RIV)
N1	33	0.8	43	8.33	2.38	14.7	2	7	0.9	14.249	1.95	18.47
N2	37	0.8	43	6.414	2.04	11.7	4	7	0.9	16.139	1.93	19
N3	33	1.2	43	5.506	2.07	12.3	2	9	0.9	14.946	1.84	19.86
N4	37	1.2	43	4.25	1.48	9.6	4	9	0.9	16.84	2	20.87
N5	33	0.8	47	7.87	2.31	13.9	2	7	1.1	13.004	1.72	18.3
N6	37	0.8	47	7.859	2.36	13.8	4	7	1.1	14.882	1.75	19.27
N7	33	1.2	47	5.174	1.86	11.7	2	9	1.1	13.605	1.98	19.67
N8	37	1.2	47	4.081	1.46	9.4	4	9	1.1	15.446	2.02	20.62
N9	33	1	45	6.457	2.21	13.0	2	8	1	13.934	1.77	19.15
N10	37	1	45	5.025	1.82	10.6	4	8	1	15.804	1.75	19.8
N11	35	0.8	45	7.04	2.16	12.0	3	7	1	14.527	1.82	19.12
N12	35	1.2	45	4.658	1.87	10.6	3	9	1	15.176	2.01	20.37
N13	35	1	43	5.802	1.97	11.7	3	8	0.9	15.558	1.86	19.8
N14	35	1	47	5.528	1.69	11.0	3	8	1.1	14.251	1.86	19.02
N15	35	1	45	5.654	1.94	11.3	3	8	1	14.866	1.9	19.4
N16	35	1	45	5.656	2	11.5	3	8	1	14.869	1.91	19.68
N17	35	1	45	5.652	2.01	11.6	3	8	1	14.872	1.75	20.02



Слика 7. Дијаграми на површина на одговор за испитување на робусност на метод за: содржина на ривароксабан, б) сродни супстанции на ривароксабан

1.3.5 Испитување на применливост на воспоставените еколошки прифатливи методи

1.3.5.1 RP-HPLC метод за определување на содржина на диазепам во обложена таблета

Применливоста на предложениот еколошки прифатлив метод беше испитана преку определување на содржината на диазепам во диазепам 5 mg обложена таблета. Примероците беа анализирани со примена на предложениот еколошки прифатлив метод и со референтен (USP) метод. Добиените резултати од испитувањето се споредени со резултатите добиени со референтниот фармакопејски метод. Споредбата помеѓу добиените средни вредности за содржина на диазепам добиена од анализа на 6 примероци од иста индустриска серија, како и прецизноста на методите е направена со помош на статистичкиот t-тест и F-тест, соодветно (табела 11). Статистичката евалуација на резултатите покажа дека не постои статистички значајна разлика помеѓу резултатите добиени со двата методи, со што се потврдува применливоста на развиениот еколошки прифатлив метод.



Табела 11. Резултати од определување на содржина на DZP во диазепам 5 mg обложена таблета

	Содржина на DZP (%) со референтен (USP) метод	Содржина на DZP (%) со предложен еколошки прифатлив метод
1	102,4	101,0
2	99,5	102,9
3	101,0	101,0
4	100,6	100,1
5	102,6	101,9
6	100,6	101,9
Средна вредност, % (n=6)	101,1	101,5
RSD	1,4	1,0
t-тест експериментална вредност	-0,5	
t-тест табеларна вредност	2,6	
F-тест експериментална вредност	1,5	
F-тест табеларна вредност	5,1	

1.3.5.2 RP-HPLC метод за истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета

Валидираниот метод беше применет за определување на содржината на AML и ATV во филм-обложена таблета (10 mg / 10 mg). Дополнително, содржината на двата анализи во ФДФ беше одредена со примена на референтен конвенционален метод (USP метод). Резултатите добиени со двата методи (Табела 12) беа статистички обработени со примена на F-тестот варијанса и студентовиот t-тест. Добиените вредности за F-тестот (2,28 за AML и 2,28 за ATV), и за t-тестот (1,17 за AML и 1,63 за ATV) беа пониски од табеларната вредност за F-тестот (5,05) и од табеларната вредност на t-тестот (2,57), што покажа дека не постои статистички значајна разлика помеѓу резултатите добиени со предложениот „зелен“ метод и конвенционалниот метод (Табела 12). Содржината на AML и ATV (изразена како процент од декларираната содржина за двете активни фармацевтски супстанции) во филм-обложена таблета изнесува 100,9 % и 100,5%, соодветно (Табела 12), со што е потврдена применливоста на методот.



Табела 12. Определување на содржината на AML и ATV во филм-обложена таблета (10 mg / 10 mg) со примена на предложениот „зелен“ метод и конвенционален метод

Број на таблети	Содржина на AML во филм-обложена таблета (%)		Содржина на ATV во филм-обложена таблета (%)	
	Предложен „зелен“ метод	Конвенционален метод	Предложен „зелен“ метод	Конвенционален метод
1	101.4	100.2	100.2	100.9
2	99.9	100.7	100.8	99.7
3	100.4	101.0	100.1	99.5
4	101.7	100.8	100.8	100.5
5	100.7	99.8	100.7	100.1
6	101.2	100.3	100.3	99.8
Средна вредност, % (n=6)	100.9	100.5	100.5	100.1
RSD	0.67	0.44	0.32	0.53
F-тест				
табеларна вредност		5.05		5.05
F-тест експериментална вредност		2.28		2.28
t-тест				
табеларна вредност		2.57		2.57
t-тест експериментална вредност		1.17		1.63

1.3.5.3 RP-HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета

Предложените еколошки подобни RP-HPLC методи беа применети за определување на содржина и на сродни супстанции во ривароксабан 10 mg таблети од три различни производители достапни на пазарот на Република Северна Македонија (Табела 13). Развиените методи се применливи за контрола на квалитетот на ривароксабан 10 mg таблети.

Табела 13. Резултати од определување на содржина и сродни супстанции на ривароксабан во ривароксабан 10 mg филм-обложена таблета

Аналит	Производител 1	Производител 2	Производител 3
Содржина на RIV (%)	97.67	100.10	97.69
Онечистување G (%)	не е детектирано	не е детектирано	0.02
Онечистување 14 (%)	не е детектирано	не е детектирано	0.03
Онечистување H (%)	не е детектирано	не е детектирано	0.01
Неспецифицирани онечистувања (%)	не е детектирано	0.02	0.03
Вкупни онечистувања (%)	/	0.03	0.05



1.3.6 Евалуација на еколошката прифатливост на развиените хроматографски методи

1.3.6.1 Еколошки прифатлив RP-HPLC метод за определување на содржина на диазепам во обложена таблета

Развиениот и валидирани еколошки прифатливи хроматографски метод е евалуирани во однос на неговата еколошка подобност со примена на алатката за проценка на „зелен индекс“ на аналитички метод (*Analytical method greenness score*, AMGS) и пристапот за проценка на ранг на еколошка подобност (*Eco-scale индекс*). Резултатите од компарацијата помеѓу предложениот и референтниот USP метод, користејќи ја AMGS алатката, се претставени на Слика 8. AMGS вредноста за референтен USP метод изнесува 4759.01, додека AMGS вредност за „зелениот“ метод развиен во ова истражување изнесува 1432,4 што укажува дека новоразвиениот метод има најмалку три пати помало негативно влијание врз животната средина во однос на референтниот USP метод. Дополнително, оваа евалуација покажа дека развиениот метод има значително помала енергетска потрошувачка што произлегува од пократкото време на анализа. Новиот метод нуди значително подобрување и во однос на енергетскиот индекс на растворувачите („Solvent energy score“) што во конвенционалниот метод е на ниво што не е еколошки прифатливо (означен со црвено).

Method

Method Number:

2022-10-06 19:49:11.720

Greenness Score:

1432.40

Instrument Energy Score:

200.93

14.03%

Solvent Energy Score:

120.73

8.43%

Solvent EHS Score:

1110.74

77.54%

Method

Method Number:

2022-10-06 18:44:29.747

Greenness Score:

4759.01

Instrument Energy Score:

912.95

6.57%

Solvent Energy Score:

2785.52

58.69%

Solvent EHS Score:

1662.54

34.94%

Слика 8. AMGS индекс на: а) еколошки прифатлив метод за определување на DZP, б) референтен (конвенционален) USP метод

Дополнително, направена е споредба на степенот на еколошка подобност со примена на Eco-scale пристапот на предложениот метод со литературно достапен метод што е базиран на мицеларна мобилна фаза (Micellar Liquid Chromatography, MLC) развиен од страна на Elmansi & Belal, 2019 (Табела 14). Евалуацијата покажа дека и двата методи имаат одлична еколошка подобност (Eco-scale индекс поголем од 75) што укажува дека и двата „еколошки прифатливи“ методи имаат приближно исто влијание врз животната средина. MLC методот има незначително повисока еколошка подобност (Eco-scale индекс 87) во однос на развиениот „зелен“ RP-HPLC метод (Eco-scale индекс 82) што се должи на применетите растворувачи (сурфактант во однос на етанол). Сепак, методот развиен во ова истражување има предности во однос на: пократко на времето на анализа (5 минути во однос на 10 минути, соодветно), исполнување на барањата за соодветност на методот во целост, (што не е случај со MLC методот), произлегува дека истиот претставува прв избор за следење на квалитет на производот во фармацевтската индустрија.



Табела 14. Споредба на еколошка подобност со примена на Eco-scale пристапот

Опасност	Казнени поени	
	Предложен „зелен“ RP-HPLC метод	MLC метод
Реагенси		
Етанол	12	0
Вода	0	0
Полиоксиетилен(23)лаурил етер	0	4
Потрошувачка на енергија	0	1
Професионална експозиција	0	0
Отпад	6	8
Вкупен број поен	18	13
Степен на еколошка подобност (Eco-scale индекс)	82*	87*

* Вредност за Eco-scale индекс: >75 – одличен степен на еколошка подобност; >50 – прифатливо ниво на еколошка подобност; <50 – неадекватно ниво на еколошка подобност

1.3.6.2 Еколошки прифатлив RP-HPLC метод за истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета

Еколошката прифатливост на методот е евалуирана со примена на три квантитативни алатки: Eco-scale индекс, AMGS алатката и AGREE алатката. Добиените вредности за „зелениот“ индекс беа споредени со индексите пресметани за еколошки подобни методи достапни во литературата: LC метод со мобилна фаза со етанол [Hemdan et al., 2018] и MLC методот [Habib et al., 2020] (Табела 15).

Методот предложен во оваа студија има Eco-scale индекс од 87, што е повисок во однос на претходно објавените зелени методи за определување на AML и ATV [Hemdan et al., 2018, Habib et al., 2020] (Табела 15). Повисоката вредност за Eco-scale индекс на методот развиен во ова истражување се должи на пократкото време на анализа и на намалувањето на растворувачите потребни за подготовка на примерокот за анализа. Иако сурфактантите се сметаат за еколошки погодни растворувачи, сепак MLC методот има понизок Eco-scale индекс од 82, што е резултат на користењето на n-бутанол во мобилната фаза.

Втората алатка користена за евалуација на методите беше AMGS алатката и истата е достапна на веб-страницата на Американското хемиско друштво. Предложениот метод има AMGS индекс од 171,44, додека метод базиран на мобилна фаза со EtOH има AMGS вредност од 251,99 (Табела 15). MLC методот не беше евалуиран со оваа алатка, бидејќи софтверот не дава можност за вклучување на сурфактанти во пресметувањето на „зелениот“ индекс. Пониска вредност за AMGS индекс укажува дека методот има помало негативно влијание врз животната средина. Предложениот метод има приближно 1,4 пати подобар AMGS индекс во однос на веќе постоечкиот метод базиран на мобилна фаза со EtOH. Дополнително, евалуацијата покажа дека предложениот метод нуди значително подобрување во однос на енергетскиот индекс на инструментот (Instrument energy score), како и во однос на EHS индексот на растворувачот (Solvent EHS score), што се должи на пократкото време на анализа. Оваа евалуација покажа дека новоразвиениот метод е еколошки посоодветен во споредба со зелениот метод достапен во литературата.

Добиените резултати со примена на AGREE алатката се во согласност со резултатите добиени со Eco-scale индексот и со AMGS алатката. AGREE индекс од 1,0 укажува на метод што во целост ги исполнува GAC принципите. Методот развиен во ова истражување има највисок AGREE индекс од 0,73 (Табела 15), што укажува дека истиот има подобра еколошка подобност во однос на методите достапни во литературата. Дополнително, спроведената евалуација покажа дека сите евалуирани „зелени“ методи не во согласност со принципите со третиот GAC принцип (црвено обоени - off-line методи), петтиот GAC принцип (црвено обоени - степен на автоматизација) и седмиот GAC принцип (црвено обоени - аналитички отпад). Вообичаено, кога течна хроматографија се користи како техника за квантитативно определување, овие три GAC принципи не се во согласност со GAC принципите. Повисоката вредност за AGREE индексот добиен за предложениот метод се должи на двојното намалување на волуменот на применетиот растворувач за подготовка на примероците, како и на краткото време за анализа од 5 минути. Иако сурфактантите се вбројуваат во еколошки подобни растворувачи, сепак MLC методот има најнизок



AGREE индекс од 0,54. Имено, пониската вредност за AGREE индекс на MCL методот произлегува од примената на метанол во подготовка на примероците за анализа; примената на n-бутанолот во мобилната фаза, поголемата вредност за проток (1,5 mL/min), како и подолгото време за анализа од 9 минути.

Резултатите добиени од евалуацијата на еколошката подобност на воспоставениот метод, добиени со примена на три различни алатки, се споредливи. Имено, евалуацијата покажа дека воспоставениот метод е во согласност со GAC принципите. *Eco-scale* индексот, како алатка за евалуација на еколошката подобност на методите, не го вклучува времето на анализа и дава поопшта пресметката на казнените поени во однос на хемискиот отпад. AMGS алатката е помоќна алатка во споредба со *Eco-scale* индексот и дава поголема можност за воочување на разликите помеѓу методите што се во согласност со принципите на GAC. Причината се должи на тоа што AMGS калкулаторот го зема во предвид волуменот на инјектирање, протокот, времето на анализа, волуменот на растворувач што се користи за подготовка на примероците за анализа, итн. Недостаток на оваа алатка е што не е применлива во случај кога се користат повеќе од три растворувачи во мобилната фаза или кога растворувачите не се дел од понудените опции. AGREE алатката овозможува полесно воочување на разликите помеѓу зелените методи. Оваа алатка нема ограничувања во однос на избор на растворувачи; во предвид ја зема масата на примерокот за анализа; волуменот на хемиски отпад; времето на анализа (ефикасност на метод) и нуди посеопфатна проценка на токсичноста на употребените растворувачи.

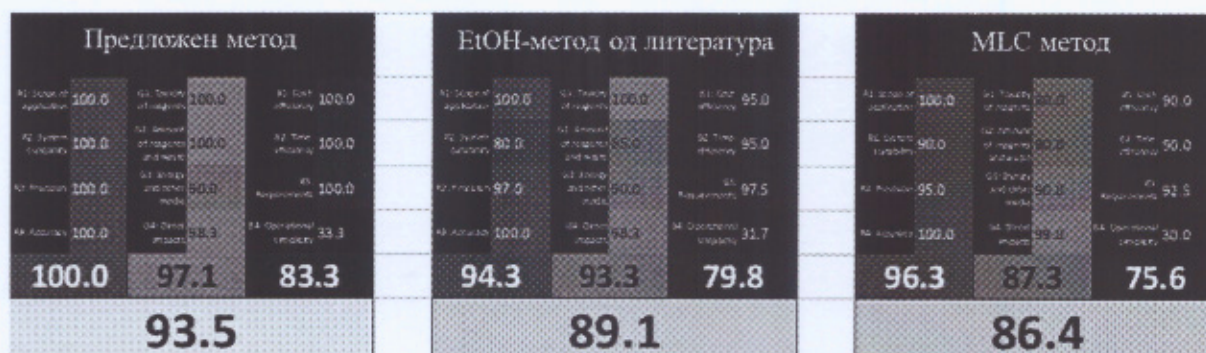
Табела 15. Евалуација на еколошката подобност на воспоставениот метод и на литературно достапни „зелени“ методи за определување на содржина на AML и ATV во филм-обложена таблета

	Воспоставен HPLC еколошки подобен метод	HPLC метод со мобилна фаза со EtOH (Hemdan et al., 2018)	MLC метод (Habib et al., 2020)
<i>Eco-scale</i> индекс			
КП за токсичност на реагенси			
Етанол	9	9	/
n-бутанол	/	/	12
Воден раствор на SDS	/	/	0
Фосфатен пуфер	0	0	/
КП за енергетска потрошувачка	1	1	1
КП за негативно влијание врз околината	0	0	0
КП за хемиски отпад	3	5	5
Вкупно КП	12	15	18
Eco-scale индекс	87	85	82
<i>AMGS</i> алатка			
Енергетски индекс на инструмент	55.81 (32.55%)	100.46 (39.87%)	/
Енергетски индекс на растворувачи	11.00 (6.42%)	16.44 (6.53%)	/
EHS индекс на растворувачи	104.63 (61.03%)	135.09 (53.61%)	/
AMGS зелен индекс	171.44	251.99	Не е применливо



*Казнени поени (КП)

Хроматографските методи за контрола на квалитет на лековите што се применуваат во фармацевтската индустрија, покрај еколошката подобност, потребно е да ги исполнуваат и аналитичките критериуми на методот, но истовремено треба да бидат и економски исплатливи. Одтука произлегува дека пожелно е методите треба да бидат одржливи. Евалуацијата на одржливоста на предложениот метод, како и споредба со литературно достапните „зелени“ методи за определување на AML и ATV во филм-обложена таблета е спроведена со примена на алгоритмот за пресметка на одржливост на метод (Whiteness assessment algorithm) предложен од страна на Нобак и соработниците [Nowak et al., 2021]. Методите со помош на овој алгоритам се оценуваат во однос на аналитичните перформанси прикажани преку параметрите од валидација на методот (означени со црвена боја), еколошката подобност (зелена боја) и економската исплатливост (сина боја). Идеално одржлив метод има вредност за одржливост од 100. Воспоставениот метод има висока вредност од 93,5, додека добиената вредност за претходно објавените „зелени“ методи е пониска од 90 (Слика 9). Проценката на одржливоста покажа дека методот развиен во текот на овој проект нуди неколку предности како што се: подобри аналитички перформанси, помало негативно влијание врз животната средина, како и подобра економска исплатливост.



Слика 9. Евалуација на степенот на одржливост на методите со примена на „Whiteness assessment algorithm“

1.3.6.3 Еколошки прифатлив RP-HPLC метод за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета

Евалуацијата на еколошката прифатливост на развиените и валидирани методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета беше спроведена со примена на две квантитативни алатки: *Eco-scale* индексот и AGREE алатката.

За пресметка на казнените поени за *Eco-scale* индексот за двата методи во предвид беше земена количината и токсичноста на употребените растворувачи, техниката за анализа, како и количината на генериран отпад во текот на целокупната постапка (подготовка на примерок за анализа и инструментална анализа). Добиената вредност за *Eco-scale* индексот за двата методи беше над 75 поени (86 за методот за содржина и 85 за методот за сродни супстанции), со што се потврди еколошката подобност на воспоставените методи од ова истражување (Табела 16).



Примената на AGREE алатката овозможи да се направи евалуација на усогласеноста на поединечните сегменти од предложените методи со дванаесетте принципи на „зелена аналитичка хемија“. Резултатите потврдија дека предложените методи се во согласност со шест принципи на GAC и тоа со принципот: 2, 4, 6, 10, 11 и 12 (зелена боја во пиктограмите) (Табела 16). Делумно отстапување на методите беше забележано принципот 1, 7 и 9 (изразено со портокалова боја на пиктограмите) поради употребата на надворешен предтретман на примерокот (принцип 1); волумен на аналитички отпад од 25 mL до 100 mL (принцип 7); и енергетската потрошувачка на инструментот LC (принцип 9). Имајќи во предвид дека и двата методи се off-line, црвената боја во AGREE пиктограмот (неусогласеност со GAC принципите) се забележа за третиот GAC принцип. Целокупната централна боја на AGREE пиктограмите за двата методи е бледо зелена (AGREE индекс 0,66 за содржина и 0,65 за сродни супстанции), што потврдува дека предложените методи генерално се во согласност со GAC принципите (Табела 16).

Резултатите од спроведената евалуација со примена на *Eco-scale* индексот и AGREE алатката потврдија дека предложените RP-HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета можат да се сметаат за еколошки прифатливи методи (Табела 16).

Табела 16. Евалуација на еколошка прифатливост на воспоставените HPLC методи за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета со примена на *Eco-scale* индексот и AGREE алатката

Воспоставен метод за содржина на RIV		Воспоставен метод за сродни супстанции на RIV	
AGREE индекс		AGREE индекс	
<i>Eco-scale</i> индекс	Казнени поени (КП)	<i>Eco-scale</i> индекс	Казнени поени (КП)
Подготовка на примерок		Подготовка на примерок	
Етанол	4	Етанол	4
Фосфорна киселина	/	Фосфорна киселина	/
Оцетна киселина	/	Оцетна киселина	2
Инструментална анализа		Инструментална анализа	
HPLC	1	HPLC	1
Реагенси	4	Реагенси	4
Отпад	5	Отпад	4
Вкупно КП	14	Вкупно КП	15
<i>Eco-scale</i> индекс	100-14=86	<i>Eco-scale</i> индекс	100-15=85



1.3.7 Едукација на студенти во однос на можностите на еколошки прифатливите хроматографски решенија

Искуствата и сознанијата што произлегоа од реализацијата на овој проект беа претставени пред студентите на Фармацевтскиот факултет. За таа цел на 21 декември 2023 година беше одржана работилница со наслов „Развој на одржливи хроматографски методи во фармацевтски анализи – од теорија до пракса“. Работилницата ја водеа професори од Институтот за применета хемија и фармацевтски анализи, а на работилницата учествуваа околу 70 студенти од Фармацевтскиот факултет. Студентите добија сознанија за: основните начелата и принципи на „зелената“ аналитичка хемија, насоки за имплементацијата на нејзините принципи во хроматографските методи; пристапи за развој на еколошки прифатливи хроматографски методи; како и примери за совладување на предизвиците што се јавуваат при развојот на „зелени“ методи. Преку оваа работилница се подигна свеста кај студентите за важноста на примената на концептот на „зелена“ аналитичка хемија, како и актуелните трендови во развојот на аналитички методи во фармацевтските анализи.

1.4. Објавени резултати кои произлегуваат од проектот

1.4.1 Резултати публикувани во часописи

- Поглавје во рецензирана книга - Nakov N, Acevska J, Brezovska K, Kavrovski Z, Dimitrovska A. Green Strategies towards Eco-Friendly HPLC Methods in Pharma Analysis, book High Performance Liquid Chromatography - Recent Advances and Applications. Eds: O. Núñez, S. Sentellas, M. Granados, J. Saurina. IntechOpen; London UK, 2023. DOI: 10.5772/intechopen.110035 <http://hdl.handle.net/20.500.12188/25894>
- Nakov Natalija, Anastasova Liljana, Gjorgievska Marija Zafirova, Acevska Jelena, Brezovska Katerina, Petkovska Rumenka, Dimitrovska Aneta. Green RP-HPLC methods for assay and related substances in rivaroxaban tablets. Acta Chromatographica DOI:10.1556/1326.2023.01178 (IF 2.01) (accepted November 2023) <http://hdl.handle.net/20.500.12188/28942>
- Tomić Marija, Božinovska Marijana, Anevska-Stojanovska Nataša, Lazova Jelena, Petkovska Rumenka, Anastasova Liljana, Nakov Natalija. Eco-friendly RP-HPLC method for determination of diazepam in coated tablet. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering 2023, 42 (2): 153–163 DOI: 10.20450/mjccce.2023.2683 (IF 1.0) <http://hdl.handle.net/20.500.12188/28944>
- Nakov Natalija, Anastasova Liljana, Zafirova Marija, Petrovska-Dimitrievska Gabriela, Tonikj Ribarska Jasmina, Ugrinova Liljana, Acevska Jelena, Brezovska Katerina. Experience-based insights for switching to greener chromatographic methods. Macedonian pharmaceutical bulletin 2023, 69 (Suppl 1) 221 – 222. DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2023.69.03.108 <http://hdl.handle.net/20.500.12188/28943>

1.4.2 Резултати претставени на научни собири

- Nakov Natalija. Experience-based insights for switching to greener chromatographic methods. 14th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (14th CESPT). Oral presentation., Ohrid, R. North Macedonia, September 2023.
- M. Tomik, M. Božinovska, A. Petrovska, N. Anevska-Stojanovska, J. Lazova, J. Acevska, K. Brezovska, J. Tonic-Ribarska, N. Nakov. Robust, eco-friendly HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in pharmaceutical formulation. 7th Green and Sustainable Chemistry Conference. Poster presentation. Dresden, Germany, May, 2023.



1.4.3 Изработени магистерски и дипломски трудови

- Магистерски труд, Фармацевтски факултет, УКИМ-Скопје - „Примена на пристап „неконвенционална мобилна фаза“ во развој на еколошки прифатливи хроматографски методи“. Марија Томиќ, декември 2022
- Дипломски труд, Фармацевтски факултет, УКИМ-Скопје – „Развој на RP-HPLC метод за определување на содржина на рибароксабан во филм-обложена таблета со примена на еколошки подобна мобилна фаза“. Ангела Мицова, август 2023
- Дипломски труд, Фармацевтски факултет, УКИМ-Скопје – „Евалуација на еколошка подобност на HPLC методи за определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во таблета“. Видосава Мукоска, септември 2023.

1.5. Преглед на набавена истражувачка опрема (доколку има)

/

1.6. Корисници на остварените резултати, начини на пренесување и примена

Добиените резултати имаат научен, стручен и апликативен придонес во полето на фармацевтските анализи и се значајни за понатамошни истражувања во полето од интерес. Стекнатите сознанија овозможуваат развој на одржливи хроматографски методи што можат да најдат примена во лабораториите за контрола на квалитет на лековите во фармацевтската индустрија, како и во националните лаборатории за вршење на контрола на квалитет на лековите.

Стекнатите сознанија во насока на воведување на еколошки прифатливи хроматографски методи во фармацевтските анализи се пренесени на студентите на Фармацевтскиот факултет преку одржување на работилница под наслов „Развој на одржливи хроматографски методи во фармацевтски анализи – од теорија до пракса“.

Добиените резултати во однос на придобивките од примената на еколошки прифатливи хроматографски методи побудија интерес кај фармацевтските компании во нашата држава. Имено, фармацевтската компанија „Алкалоид“ АД Скопје во соработка со Центарот за кариера при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје отпочна едукативно-апликативниот проект наменет за студентите на Фармацевтскиот факултет на тема „Зелени хроматографски методи за контрола на квалитетот на лековите“.

1.7. Резиме на остварените резултати

Развиени се и валидирани четири еколошко прифатливи („зелени“) RP-HPLC методи за определување на содржина на диазепам во обложена таблета, истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета, определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета. За развој на „зелените“ методи беше применет пристапот на замена на токсични растворувачи (метанол и ацетонитрил) со етанол како еколошки погоден растворувач, како и намалување на количината и токсичноста на растворувачите што се користат за подготовка на примероците за анализа. Споредбата на критичните хроматографски параметри (време на ретенција, фактор на симетрија на пик, резолуција) покажа дека примената на етанол како органски растворувач во мобилната фаза овозможува пократко време на анализа, поголема ефикасност на колоне, подобрена симетрија на пикови и поголема резолуција во споредба со евалуираните конвенционални мобилни фази.

Сите методи беа валидирани во согласност со Водичот на ICH Q2(R) во однос на селективноста/специфичноста, линеарноста, точноста, прецизноста, а методот за сродни супстанции беше валидиран и во однос на осетливоста. Робустноста на методите беше евалуирана со примена на дизајн на експерименти, што овозможи значително рационализирање на бројот на спроведени експерименти, што е во согласност со принципите на „зелената“ аналитичка хемија. Резултатите од ова истражување покажаа дека неконвенционална, еколошки подобна водено-етанолна мобилна фаза исто така овозможува исполнување на дефинираните критериуми на клучни параметри во однос на селективност, точност, прецизност и робустност на методите.



Развиените методи беа применети за определување на содржина на диазепам во диазепам 5mg обложена таблета, истовремено определување на содржина на амлодипин и аторвастатин во филм-обложена таблета (10mg /10mg), определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во на ривароксабан 10 mg филм-обложена таблети добиени од три различни производители. Со примена на статистичкиот t-тест и F-тест се потврди дека не постои статистички значајна разлика помеѓу резултатите добиени со воспоставените методи и соодветните референтни конвенционални методи.

Еколошката прифатливост на развиените методи е потврдена со примена на различни квантитативни алатки како што се: *Eco-scale* индексот, AMGS алатката и AGREE алатката, додека со примена на Whiteness assessment algorithm се потврди одржливоста на методите за определување на содржина и на сродни супстанции на ривароксабан во филм-обложена таблета. Дополнително, истражувањата во рамките на овој проект потврдија дека развиени еколошки прифатливи методи имаат подобри аналитички перформанси, помало негативно влијание врз животната средина, како и подобра економска исплатливост во споредба со „зелените“ методи достапни во литературата.

Примената на воспоставените еколошки прифатливи RP-HPLC методи обезбедува поздрава работна средина, како и намалување на токсичниот отпад што се генерира за време на анализите, без притоа да биде доведена во прашаше валидноста на аналитичкиот резултат. Развиените и валидирани еколошки прифатливи хроматографски методи можат да најдат широка примена во контролата на квалитетот на лековите во лабораториите на фармацевтската индустрија, како и во националните лаборатории за контрола на квалитет на лековите.

ABSTRACT

Four eco-friendly (“green”) RP-HPLC methods for determination of: diazepam in coated tablets, amlodipine and atorvastatin in film-coated tablets, content of rivaroxaban and related substances of rivaroxaban in film-coated tablets were developed. The approach used for the method development was focused on replacement of toxic solvents from the mobile phase with ethanol as an eco-friendly solvent, as well as reduction of the amount and the toxicity of the solvents used for the sample preparation process. Compared with the conventional chromatographic methods, the use of ethanol-water based mobile phase offers several analytical advantages in terms of: shorter analysis time, improved peak symmetry, better column efficiency and higher resolution.

The methods were validated in accordance with the ICH Guideline Q2(R) in terms of specificity/specificity, linearity, accuracy, precision. Additionally, the method for related substances determination was validated in terms of sensitivity. The robustness of the optimized methods was evaluated using the design of experiments approach, which is in accordance with the “green” analytical chemistry principles. The obtained research results demonstrated that the ethanol-based RP-HPLC methods can deliver the desired selectivity, accuracy, precision and robustness of the analytical method required for the quality control methods used in the pharmaceutical industry.

The methods were applied for determination of diazepam in 5 mg coated tablet, determination of amlodipine and atorvastatin in film-coated tablets (10mg/10mg), determination of content and related substances in rivaroxaban 10 mg film-coated tablets obtained from three different manufacturers. The statistical evaluation confirmed that there were no significant differences between the performance of the proposed eco-friendly methods and the conventional reference methods.

The greenness of the proposed methods was confirmed using three quantitative approaches: the Eco-scale index, the AMGS tool and the AGREE software, while the sustainability of the methods for determination of rivaroxaban and its related substances was confirmed by the Whiteness evaluation algorithm. Besides the low negative environmental impact, the methods developed during this project have better analytical performances and lower economical cost compared with the previously published “green” methods.

The eco-friendly, ethanol-based RP-HPLC methods bring benefits in terms of safer working environment, reduced toxic waste formation without compromising the validity of the analytical results. The proposed ethanol-based RP-HPLC methods could be used for drug quality control of the stated medicinal products.



ДЕЛ III

3.1. Учесници во реализацијата на проектот

Учесници во истражувачкиот тим (име, презиме, звање, единица, потпис)	
Главен истражувач	Наталија Наков, вонреден професор, ФФ <i>Nakov</i>
Членови на истражувачкиот тим	
Истражувач	Анета Димитровска, редовен професор, ФФ <i>A. Dimitrova</i>
Истражувач	Сузана Трајковиќ Јолевска, редовен професор, ФФ <i>Suzana Trajkovic</i>
Истражувач	Руменка Петковска, редовен професор, ФФ <i>Rumenka Petkova</i>
Истражувач	Зоран Кавраковски, редовен професор, ФФ <i>Zoran Kavracovski</i>
Истражувач	Катерина Брезовска, редовен професор, ФФ <i>Katerina Brezovska</i>
Истражувач	Јасмина Тониќ Рибарска, редовен професор, ФФ <i>Jasmina Tonick Ribarska</i>
Истражувач	Ана Поцева Пановска, редовен професор, ФФ <i>Ana Potceva Panovska</i>
Истражувач	Јелена Ацевска, вонреден професор, ФФ <i>Jelena Acevska</i>
Истражувач	Лилјана Анастасова, вонреден професор, ФФ <i>Liljana Anastasova</i>
Истражувач	Лилјана Угринова, стручен соработник, ФФ <i>Liljana Ugrinova</i>
Млад Истражувач	Благој Ачевски, асистент, ФФ <i>Blagoj Acevski</i>
Млад Истражувач	Олга Гигопулу, асистент, ФФ <i>Olga Gigopulu</i>
Млад Истражувач	Христанта Гоцо, асистент, ФФ <i>Hristanta Goco</i>
Млад Истражувач	Марија Зафирова Ѓоргиевска, аналитичар / стручен соработник, ФФ <i>Marija Zafirova Gorgievska</i>
Млад Истражувач	Габриела Петровска Димитриевска, аналитичар, ФФ <i>Gabriela Petrovska Dimitrievska</i>