

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ
Катедра за аналитика на лекови и фармацевтска хемија



ДОКТОРСКИ ТРУД
РАЗВОЈ И ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОД БАЗИРАН НА ТЕЧНА
ХРОМАТОГРАФИЈА ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА МЕЛОКСИКАМ И НЕГОВИ
СРОДНИ СУПСТАНЦИИ ПРИ ИСПИТУВАЊЕ НА СТАБИЛНОСТ ВО РАСТВОР
ЗА ИНЈЕКТИРАЊЕ

Ментор:
проф. д-р Биљана Ѓорѓеска

Кандидат:
Дино Карпичаров
број на индекс: 31169

Штип, мај 2026 година

Интерен ментор: д-р Биљана ЃОРЃЕСКА
Редовен професор
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија

Екстерен ментор: д-р Јасмина ТОНИЌ РИБАРСКА
Редовен професор
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје, РС Македонија

Претседател: д-р Марија ДАРКОВСКА СЕРАФИМОВСКА
Вонреден професор
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија

Член: д-р Зорица АРСОВА-САРАФИНОВСКА
Редовен професор
Институт за јавно здравје на РС Македонија
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија

Член: д-р Емилија ЈАНЕВИЌ-ИВАНОВСКА
Редовен професор
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија

Научно поле: 3.05 Други медицински науки
Научно потполе: 3.05.02 Фармација
Научна област: 3.05.02.07 Аналитика на лекови
3.05.02.08 Применета хемија и фармацевтски анализи

Датум на одбрана: 6.5.2026 година
Датум на промоција: _____

Особено сум горд што Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип го препознав како мој академски дом во текот на додипломските и постдипломските студии, а денес и како институција во која продолжувам да се развивам и да придонесувам преку мојата професионална ангажираност.

Изразувам искрена и длабока благодарност до мојата интерна менторка, проф. д-р Биљана Ѓорѓеска, за стручното водство, континуираната поддршка и критичкиот осврт, кои значајно придонесоа за обликувањето и квалитетот на ова истражување. Од нејзиното менторство не добив само стручни насоки, туку и животни мудрости што трајно ме обликуваа.

Посебна благодарност упатувам до проф. д-р Јасмина Тониќ Рибарска, која без двоумење прифати да биде моја екстерна менторка, за внимателното следење на мојот професионален и научен раст, како и за клучните совети и насоки во текот на изработката на овој докторски труд.

Искрена благодарност изразувам и до проф. д-р Зорица Арсова-Сарафиновска и проф. д-р Марија Дарковска Серафимовска за постојаната соработка во наставната и научно-истражувачката работа, која значајно придонесе за моето стручно и научно созревање во текот на специјалистичките и докторските студии. Посебна благодарност упатувам и до проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска за нејзината поддршка, стручните и животните совети, како и за обезбедувањето дел од лабораториските ресурси неопходни за реализација на овој докторски труд.

Огромна благодарност упатувам до доц. д-р Ивана Митревска, која се појави во период кога ми беа најпотребни поддршка, насока и верба дека можам да продолжам понатаму. Нејзината стручност, несебичност, доверба и човечност беа вистински ветер во мојот грб и ми даваа сила да одам напред, особено во најтешките моменти.

Искрена благодарност упатувам до раководството на компанијата „Алкалоид“ АД Скопје, кое ја препозна вредноста на оваа соработка. Посебна благодарност упатувам до м-р Ана Атанасова, менаџер на фармацевтски и аналитички развој, која овозможи дел од ова истражување да се реализира токму на Институтот за истражување и развој при „Алкалоид“ АД Скопје. Благодарност изразувам и до м-р спец. Благица Манчевска и нејзиниот тим за стручната помош, искрената соработка, споделеното знаење и постојаната достапност за насочување во текот на работата. Дополнително,

благодарност упатувам и до м-р спец. Марија Величковска, за несебичната поддршка и корисните совети, обезбедени преку постојана комуникација во текот на целиот процес.

Меѓусебната мотивација, меѓусебниот поттик и меѓусебната поддршка имаат посебна вредност кога не се само морални и логистички, туку суштински, искрени и човечки. Затоа, особена благодарност упатувам до моите колешки, м-р спец. Паулина Апостолова и д-р спец. Дијана Мицева, со кои заеднички го почнавме ова патување.

Благодарност упатувам и до моите пријатели и роднини, кои на различни начини беа дел од овој процес – со разбирање, трпение, поддршка и континуирано охрабрување. Нивното присуство и верба ми дадоа сила да истраам и да останам фокусиран кон целта.

На крај, но најважно, благодарност упатувам до моето семејство – татко ми, мајка ми и сестра ми. Љубовта, трпението и разбирањето што тие ми ги даваа беа мојата тивка сигурност и најцврста потпора, сила што ме туркаше напред и ме држеше исправен кога беше најтешко. Тие беа секогаш тука, без прашања и услови, и веруваа во мене дури и во моментите кога јас се сомневав.

***Овој докторски труд им го посветувам на моите родители,
заради нивната љубов што ме обликуваше како човек,
заради трпението со кое беа покрај мене во секој чекор,
и заради вербата во мене што ја имаа уште пред да ја имам самиот јас.***

РЕЦЕНЗИРАНИ И ОБЈАВЕНИ НАУЧНИ ТРУДОВИ:

1. **Karpicarov, D.**, Mitrevska, I., Manchevska, B., Apostolova, P., Tonic Ribarska, J., Gjorgjeska, B. (2026). Software-Assisted Analytical Quality by Design for Stability-Indicating Method Development: Integration of DoE and Predictive Retention Modeling Using MODDE® and DryLab®. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 72(2): 3–15. doi: 10.33320/maced.pharm.bull.2026.72.02.001;
2. **Karpicarov, D.**, Mitrevska, I., Apostolova, P., Arev, M., Arsova-Sarafinovska, Z., Darkovska Serafimovska, M., Dražić, B., Tonic Ribarska, J., Gjorgjeska, B. (2025). Estimation of Measurement Uncertainty Using Top-Down and Bottom-Up Approaches for Accurate Content Determination of Meloxicam in Injectable Dosage Forms. *Arhiv za farmaciju*, 75(6): 493–507. doi: 10.5937/arhfarm75-63142;

ПРЕЗЕНТАЦИИ ОД НАУЧНИ СОБИРИ:

1. **Karpicarov, D.**, Gjorgjeska, B. (2023). Евалуација на соодветност на систем кај HPLC метод за определување содржина на мелоксикам во инјекции. *Прв симпозиум со меѓународно учество од областа на фармацијата „Фармацевтска грижа: актуелности, можности и предизвици“*, 23 септември, Мултимедијален центар на Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, РС Македонија;
2. Gjeorgiev, B., **Karpicarov, D.**, Apostolova, P., Gjorgjeska, B. (2023). Спектрофотометриска применливост на нефармакопејски хроматографски метод за определување на содржина на мелоксикам во инјекции. *Прв симпозиум со меѓународно учество од областа на фармацијата „Фармацевтска грижа: актуелности, можности и предизвици“*, 23 септември, Мултимедијален центар на Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, РС Македонија.

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ:

Кратенка	Англиски термин	Македонски термин / објаснување
AI	Artificial Intelligence	Вештачка интелигенција
API(s)	Active Pharmaceutical Ingredient(s)	Активна(и) фармацевтска(и) супстанција(и)
AQbD	Analytical Quality by Design	Аналитички квалитет во дизајн
As	Symmetry Factor	Фактор на симетрија
ATP	Analytical Target Profile	Целен аналитички профил
AUC	Area Under the Curve	Површина под крива
BCS	Biopharmaceutical Classification System	Биофармацевтски систем за класификација
BP	British Pharmacopoeia	Британска фармакопеја
CAA(s)	Critical Analytical Attribute(s)	Критичен(и) аналитички атрибут(и)
CAS	Chemical Abstracts Service	Служба за хемиски изводи
C_{max}	Maximum Plasma Concentration	Максимална плазматска концентрација
CMP(s)	Critical Method Parameter(s)	Критичен(и) параметар(и) на методот
COX	Cyclooxygenase	Циклооксигеназа
CPP(s)	Critical Process Parameter(s)	Критичен(и) процесен(и) параметар(и)
CQA(s)	Critical Quality Attribute(s)	Критичен(и) атрибут(и) на квалитет

CRS	Chemical Reference Standard(s)	Хемиски референтен(и) стандард(и)
CV	Coefficient of Variation	Коефициент на варијација
DoE	Design of Experiments	Дизајн на експерименти
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare	Европски директорат за квалитет на лековите и здравствена заштита
EMA	European Medicines Agency	Европска агенција за лекови
FDA	Food and Drug Administration	Администрација за храна и лекови
FMEA	Failure Mode and Effects Analysis	Анализа на влијанија и последици од грешки
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	Течна хроматографија со високи перформанси
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	Меѓународен совет за хармонизација на техничките барања за лекови за хумана употреба
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Меѓународен сојуз за чиста и применета хемија
k'	Capacity Factor	Фактор на капацитет
LIMS	Laboratory Information Management Systems	Лабораториски информациски системи за управување
LOD	Limit of Detection	Граница на детекција
LOQ	Limit of Quantification	Граница на квантификација
MDD	Maximum Daily Dose	Максимална дневна доза
ML	Machine Learning	Машинско учење

MODR	Method Operable Design Region	Работна област на дизајн на методот
<i>N</i>	Number of Theoretical Plates	Број на теоретски подови
NSAID(s)	Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug(s)	Нестероиден(и) антиинфламаторен(и) лек(ови)
OFAT	One-Factor-at-a-Time	Еден фактор во дадено време
OOS	Out of Specification	Надвор од спецификацијата
OOT	Out of Trent	Надвор од трендот
PAT	Process Analytical Technology	Процесна аналитичка технологија
PG	Prostaglandin	Простагландин
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia	Европска фармакопеја
QbD	Quality by Design	Квалитет во дизајн
QTPP	Quality Target Product Profile	Целен профил на квалитет на производот
<i>r</i>	Coefficient of Correlation	Коефициент на корелација
<i>R</i>²	Coefficient of Determination	Коефициент на детерминација
ROS	Reactive Oxygen Species	Реактивни кислородни видови
RPN	Risk Priority Number	Број на приоритет на ризик
<i>R</i>_s	Resolution	Резолуција
RSD	Relative Standard Deviation	Релативна стандардна девијација

RSM	Response-Surface Methodology	Методологија на површина на одговор
RSS	Root-Sum-of-Squares	Корен од збир на квадрати
R_t	Retention Time	Ретенциско време
S/N	Signal-to-Noise	Сигнал/шум
s^2	Variance	Варијанса
SAR	Structure–Activity Relationship	Однос структура–активност
SD	Standard Deviation	Стандардна девијација
SIM(s)	Stability-Indicating Method(s)	Метод(и) за следење на стабилноста
SOP(s)	Standard Operating Procedure(s)	Стандардна(и) оперативна(и) постапка(и)
$t_{1/2}$	Elimination Half-Time	Полувреме на елиминација
TX	Thromboxane	Тромбоксан
UV	Ultraviolet	Ултравioletов(а)
V_D	Volume of Distribution	Волумен на дистрибуција
WHO	World Health Organization	Светска здравствена организација

РАЗВОЈ И ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОД БАЗИРАН НА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА МЕЛОКСИКАМ И НЕГОВИ СРОДНИ СУПСТАНЦИИ ПРИ ИСПИТУВАЊЕ НА СТАБИЛНОСТ ВО РАСТВОР ЗА ИНЈЕКТИРАЊЕ

Краток извадок:

Вовед: Контролата на квалитетот и следењето на стабилноста на парентералните фармацевтски дозирани форми бара примена на селективни, робусни и регулаторно усогласени аналитички методи. Мелоксикам, како нестероиден антиинфламаторен лек, присутен во форма на раствор за инјектирање, подлежи на строги барања за контрола на содржината и профилот на онечистувања, особено во контекст на испитувањата на стабилност. Современите регулаторни насоки сè повеќе го назначуваат значењето на систематски пристапи кон развојот на аналитички методи, вклучително и аналитички квалитет во дизајн и квантитативна проценка на мерната неодреденост.

Цел: Целта на овој докторски труд е развој, оптимизација и валидација на методи базирани на течна хроматографија со високи перформанси за определување на содржината на мелоксикам и за следење на стабилноста преку квантификација на неговите сродни супстанции и/или деградациски производи во раствор за инјектирање, со примена на комбиниран традиционален и пристап базиран на аналитички квалитет во дизајн, потпомогнат со интеграција на софтверските алатки DryLab® и MODDE®, како и со систематска проценка на мерната неодреденост.

Материјали и методи: Развојот на аналитичките методи беше изведен преку комбинација на традиционален пристап и пристап базиран на аналитички квалитет во дизајн, при што DryLab® беше користен за предиктивно моделирање на ретенцијата, а MODDE® за дизајн на експерименти, оптимизација и проценка на робусноста. Беа развиени метод за определување на содржина и метод за следење на стабилност, при што селективноста беше потврдена преку студии на форсирана деградација (кисела, базна, оксидативна и термална). Методите беа валидирани согласно релевантните регулаторни барања. Мерната неодреденост беше проценета со примена на пристапите одозгора-надолу и

одоздола-нагоре, со цел да се интегрира варијабилноста на аналитичкиот процес во конечниот резултат.

Резултати: Развиените методи базирани на течна хроматографија под висок притисок, покажаа соодветна селективност, линеарност, чувствителност, точност, прецизност и робусност, како и способност за јасно раздвојување на мелоксикам од неговите сродни супстанции и/или деградациски производи. Пристапот базиран на аналитички квалитет во дизајн овозможи дефинирање и експериментална потврда на работната област на дизајн на методот, со значително намалување на бројот на експерименти и потрошувачката на ресурси во споредба со традиционалниот пристап „еден фактор во дадено време“. Проценката на мерната неодреденост овозможи резултатите да се изразат како интервал со дефинирано ниво на доверба, што ја зголемува нивната аналитичка и регулаторна релевантност.

Заклучок: Комбинираната примена на аналитички квалитет во дизајн, софтверски потпомогнато моделирање и квантитативна проценка на мерната неодреденост, претставува ефикасен и научно оправдан пристап за развој на робусни методи за следење на стабилноста. Воспоставената методолошка рамка не е ограничена само на раствори за инјектирање, туку претставува добра основа за развој и адаптација на аналитички методи применливи во контролата на квалитет на различни фармацевтски дозирани форми што содржат мелоксикам, како и за понатамошна дигитализација на аналитичкиот развој.

Клучни зборови: мелоксикам, течна хроматографија со високи перформанси, метод за следење на стабилност, аналитички квалитет во дизајн, DryLab[®], MODDE[®], мерна неодреденост

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A LIQUID CHROMATOGRAPHY-BASED METHOD FOR DETERMINATION OF MELOXICAM AND ITS RELATED SUBSTANCES IN INJECTION SOLUTION STABILITY TESTING

Abstract:

Introduction: Quality control and stability monitoring of parenteral pharmaceutical dosage forms require the application of selective, robust, and regulatorily compliant analytical methods. Meloxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug formulated as an injection solution, is subject to strict requirements regarding content determination and impurity profiling, particularly in the context of stability testing. Contemporary regulatory guidance increasingly emphasizes the importance of systematic approaches to analytical method development, including analytical quality by design and the quantitative evaluation of measurement uncertainty.

Objective: The objective of this doctoral dissertation is the development, optimization, and validation of liquid chromatography-based analytical methods for the determination of meloxicam content and for stability monitoring through the quantification of its related substances and/or degradation products in injection solutions. The study applies a combined traditional and analytical quality by design-based approach, supported by the integration of the software tools DryLab[®] and MODDE[®], as well as by the systematic evaluation of measurement uncertainty.

Materials and Methods: Analytical method development was performed using a combination of a traditional approach and an analytical quality by design-based framework. DryLab[®] was employed for predictive retention modeling, while MODDE[®] was used for experimental design, optimization, and robustness assessment. A method for content determination and a stability-indicating method were developed, with selectivity confirmed through forced degradation studies under acidic, alkaline, oxidative, and thermal conditions. The methods were validated in accordance with relevant regulatory requirements. Measurement uncertainty was evaluated using both top-down and bottom-up approaches, enabling the integration of analytical variability into the final reported results.

Results: The developed liquid chromatography-based methods demonstrated adequate selectivity, linearity, sensitivity, accuracy, precision, and robustness, as well as the capability to clearly separate meloxicam from its related substances and/or degradation products. The analytical quality by design-based approach enabled the

definition and experimental confirmation of the method operable design region, with a substantially reduction in the number of experiments and resource consumption compared with the traditional one-factor-at-a-time approach. The evaluation of measurement uncertainty allowed the analytical results to be expressed as confidence intervals, thereby enhancing their analytical reliability and regulatory relevance.

Conclusion: The combined application of analytical quality by design, software-assisted modeling, and quantitative evaluation of measurement uncertainty represents an efficient and scientifically justified approach for the development of robust stability-indicating analytical methods. The established methodological framework is not limited to injection solutions but provides a solid basis for the development and adaptation of analytical methods applicable to the quality control of various pharmaceutical dosage forms containing meloxicam, as well as for the further digitalization of analytical method development.

Keywords: meloxicam, high-performance liquid chromatography, stability-indicating method, analytical quality by design, DryLab[®], MODDE[®], measurement uncertainty

Содржина:

1. ВОВЕД	9
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА.....	13
2.1. Карактеристики на готовиот фармацевтски производ (мелоксикам раствор за инјектирање).....	14
2.1.1. Карактеристики на активната супстанција	14
2.1.1.1. Физичко-хемиски својства и биофармацевтски профил	15
2.1.1.2. Фармаколошки својства	17
2.1.1.2.1. Фармакокинетски својства	18
2.1.1.2.2. Фармакодинамски својства	19
2.1.2. Карактеристики на помошните супстанции.....	20
2.2. Карактеристики на онечистувањата (сродни супстанции и/или деградациски производи на мелоксикам).....	21
2.2.1. Карактеристики на онечистување А	22
2.2.2. Карактеристики на онечистување В	23
2.2.3. Карактеристики на онечистување С	24
2.2.4. Карактеристики на онечистување D	25
2.3. Аналитички метод	25
2.3.1. Метод за определување на содржина на активна супстанција во готов фармацевтски производ	26
2.3.2. Метод за следење на стабилноста на активна супстанција во готов фармацевтски производ.....	27
2.3.2.1. Студии на форсирана деградација (стрес тестови).....	29
2.3.2.1.1. Хидролитичка деградација	30
2.3.2.1.1.1. Кисела хидролиза.....	31
2.3.2.1.1.2. Базна хидролиза.....	31
2.3.2.1.2. Оксидативна деградација	31
2.3.2.1.3. Термална деградација	32
2.3.2.1.4. Фотолитичка деградација (фотолиза).....	33
2.3.2.2. Концепт на баланс на маса	33
2.4. Развој и оптимизација на аналитички метод.....	34
2.4.1. Традиционален пристап.....	36
2.4.2. Пристап базиран на квалитет во дизајн.....	37

2.4.2.1.	Примена на аналитички квалитет во дизајн при развој на методи за следење на стабилноста	38
2.4.2.2.	Регулаторен аспект и индустриска имплементација на аналитички квалитет во дизајн	39
2.4.2.3.	Интеграција на дизајн на експерименти и управување со ризик во рамки на аналитички квалитет во дизајн	42
2.4.2.4.	Софтверски поддржана имплементација на аналитички квалитет во дизајн	44
2.4.2.4.1.	DryLab®: софтвер за предиктивно моделирање на ретенција и оптимизација на методи	45
2.4.2.4.2.	MODDE®: софтвер за дизајн на експерименти и статистичка организација	47
2.4.2.4.3.	Интеграција на DryLab® и MODDE® за развој на методи за следење на стабилноста	48
2.5.	Валидација на аналитички метод	52
2.5.1.	Валидациски параметри: основни концепти и дефиниции	52
2.5.1.1.	Специфичност/селективност	52
2.5.1.2.	Линеарност и опсег	53
2.5.1.3.	Точност	53
2.5.1.4.	Прецизност	54
2.5.1.5.	Граница на детекција и граница на квантификација	54
2.5.1.6.	Робусност	55
2.5.2.	Избор на параметри при валидација на аналитички методи	55
2.6.	Соодветност на систем	56
2.6.1.	Фактор на капацитет	57
2.6.2.	Фактор на симетрија	57
2.6.3.	Број на теоретски подови	57
2.6.4.	Резолуција	58
2.7.	Мерна неодреденост	58
3.	ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА	60
4.	МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА	62
4.1.	Материјали на истражувачката работа	63
4.1.1.	Хемикалии и реагенси	63
4.1.2.	Тип, перформанси и услови на системот за хроматографија	64

4.1.2.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање	64
4.1.2.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања	64
4.1.3. Останати материјали.....	65
4.1.3.1. Опрема.....	65
4.1.3.2. Софтвери.....	65
4.2. Методи на истражувачката работа	66
4.2.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање	66
4.2.1.1. Протокол за подготовка на стандарден раствор	66
4.2.1.2. Протокол за подготовка на примерок за анализа	66
4.2.1.3. Методологија за проценка на мерната неодреденост.....	66
4.2.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања	70
4.2.2.1. Протоколи за подготовка на стандардни раствори	70
4.2.2.2. Протокол за подготовка на примерок за анализа	71
4.2.3. Протоколи за изведба на студии на форсирана деградација	71
4.2.3.1. Хидролитичка деградација	71
4.2.3.1.1. Кисела хидролиза.....	71
4.2.3.1.2. Базна хидролиза.....	71
4.2.3.2. Оксидативна деградација	72
4.2.3.3. Термална деградација	72
5. РЕЗУЛТАТИ.....	73
5.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање	74
5.1.1. Валидација на аналитичкиот метод	74
5.1.2. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод.....	84
5.1.3. Проценка на мерната неодреденост	85
5.1.3.1. Идентификација на мерената величина.....	85
5.1.3.2. Идентификација на изворите на неодреденост	85
5.1.3.3. Квантификација на неодреденоста.....	86

5.1.3.4. Пресметка на комбинираната стандардна и проширена неодреденост	92
5.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања	93
5.2.1. Валидација на аналитичкиот метод	93
5.2.2. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод.....	126
6. ДИСКУСИЈА	129
6.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање	130
6.1.1. Развој и оптимизација на аналитичкиот метод.....	130
6.1.2. Валидација на аналитичкиот метод	133
6.1.3. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод.....	136
6.1.4. Проценка на мерната неодреденост	137
6.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања	138
6.2.1. Развој и оптимизација на аналитичкиот метод.....	138
6.2.2. Валидација на аналитичкиот метод	143
6.2.3. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод.....	165
7. ЗАКЛУЧОК	166

1. ВОВЕД

Аналитичките методи претставуваат едни од клучните темели на безбедноста, ефикасноста и квалитетот на лековите во текот на нивниот животен циклус. Строгата контрола на активните фармацевтски супстанции (Active Pharmaceutical Ingredients, APIs) и на готовите фармацевтски производи се потпира на валидирани и научно потврдени аналитички методи, кои овозможуваат сигурно и повторливо оценување на квалитетот, а воедно ја поддржуваат и усогласеноста со регулаторните барања. Во тој контекст, течната хроматографија со високи перформанси (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) се наметна како една од најзначајните техники во фармацевтската анализа, бидејќи нуди висока флексибилност, точност и прецизност, особено кога станува збор за определување на содржината на APIs и контрола на онечистувањата. Оттука, методите базирани на HPLC се незаменливи во контролата на квалитетот и регулаторната усогласеност во развојот, производството и испитувањата на стабилноста на лековите. Затоа, валидирани и робусни аналитички методи не претставуваат само формалност за регулаторни цели, туку директно влијаат врз безбедноста на пациентите, терапевтската ефикасност и целокупниот квалитет на производот (Dwivedi et al., 2025).

Мелоксикам е нестероиден антиинфламаторен лек (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug, NSAID) кој се применува во повеќе фармацевтски дозирани форми, вклучително и како раствор за инјектирање (Khalil & Aldosari, 2020). Инјекциите, поради начинот на примена и строгите барања за стерилност и стабилност, подлежат на особено ригорозна контрола на квалитет. Оттука, од клучна важност е содржината на API во растворот за инјектирање да се определува сигурно и повторливо, а паралелно да се следи и стабилноста на API во текот на рокот на употреба, со цел да се обезбеди очекуваната терапевтска ефикасност и безбедност на пациентите (Panchal et al., 2022).

Традиционалниот развој на HPLC методи за определување на содржина најчесто се заснова на пристапот „еден фактор во дадено време“ (One-Factor-at-a-Time, OFAT), при што хроматографските услови се менуваат последователно сè додека не се постигнат задоволителни перформанси (Singh et al., 2025). Иако овој пристап е широко применуван во фармацевтските лаборатории за контрола на квалитет поради својата едноставност и практична употребливост, тој често бара повеќе време и ресурси. Воедно, обезбедува ограничен увид во варијабилноста и робусноста на методот, особено во ситуации кога постојат

интеракции помеѓу повеќе параметри (Peraman et al., 2015; Singh et al., 2025). Сепак, конвенционалните изократски методи за определување на содржина и понатаму имаат значајно место во аналитичката пракса, бидејќи претставуваат едноставно и економично решение за рутинска контрола на квалитет.

Покрај класичните валидациски параметри, кај методите за определување на содржина сè поголемо значење има проценката на мерната неодреденост, која ја квантификува довербата во добиениот резултат и претставува важен елемент на сигурноста и применливоста на методот во фармацевтската контрола на квалитет (Separovic et al., 2023).

Паралелно со традиционалниот пристап за развој на аналитички методи, современиот развој сè повеќе се насочува кон пристапот базиран на аналитички квалитет во дизајн (Analytical Quality by Design, AQbD), кој претставува систематска и научно заснована рамка за поголемо разбирање и робусност на методот, со што се поддржуваат сигурни перформанси и усогласеност со регулаторните барања (Singh et al., 2025). Во рамки на ваквиот пристап, сè почесто се применуваат специјализирани софтверски алатки кои го забрзуваат и рационализираат развојот на хроматографски методи. Така, DryLab® овозможува предиктивно моделирање на ретенцијата (Liu et al., 2002), додека MODDE® поддржува оптимизација и проценка на робусноста, базирани на дизајн на експерименти (Design of Experiments, DoE) (Peraman et al., 2015). Комбинираната примена на овие софтвери овозможува подобро разбирање на критичните променливи и поголема робусност со помал број експерименти, што придонесува за репродуктивност и доверливи аналитички резултати (Velichkovska et al., 2022).

Овој пристап е особено важен кај посложени разделувања, кога API се анализира во присуство на онечистувања (сродни супстанции и/или деградациски производи), бидејќи овозможува да се квантификува и контролира влијанието на параметрите врз перформансите на методот (Peraman et al., 2015; Нема et al., 2024). Во тој контекст, особено значајни се студиите на форсирана деградација, кои се користат за генерирање на веројатни деградациски производи и за согледување на деградациските патишта на API под влијание на екстремни услови (Dwivedi et al., 2025). Клучното аналитичко барање при проценката на стабилноста е јасно хроматографско раздвојување на API од деградациските производи и/или сродните супстанции, што наметнува потреба

од развој на метод за следење на стабилноста (Stability-Indicating Method, SIM) (Bandarkar & Vavia, 2009). На тој начин, форсираната деградација претставува логичен предуслов за потврдување на способноста на развиениот метод за следење на стабилноста и обезбедува основа за дефинирање на соодветни услови за чување и ефективна контрола на квалитет во текот на животниот циклус на производот (Dwivedi et al., 2025).

Оттука, во овој докторски труд фокусот е насочен кон развој, оптимизација и валидација на HPLC методи за определување на содржината и следење на стабилноста на мелоксикам во раствор за инјектирање, преку комбинирање на традиционален пристап и пристап базиран на AQbD, потпомогнат со интеграција на софтверите DryLab® и MODDE®, со цел да се обезбедат робусни, репродуктивни и регулаторно усогласени резултати релевантни за контрола на квалитет во текот на целиот животен циклус на производот.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1. Карактеристики на готовиот фармацевтски производ (мелоксикам раствор за инјектирање)

Мелоксикам растворот за инјектирање претставува жолтозелен, бистар раствор, без видливи честици, спакуван во безбојни ампули од 2,0 mL.

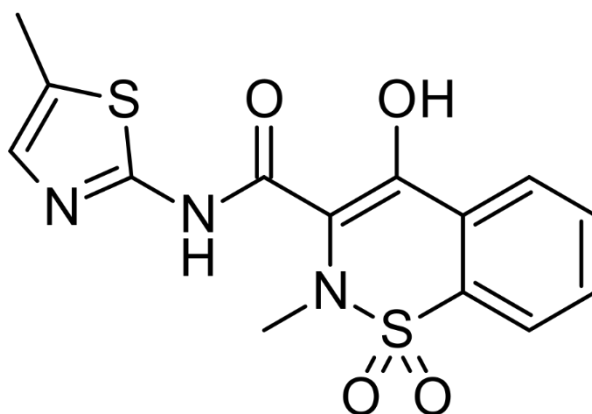
Секоја ампула содржи 15,0 mg мелоксикам во 1,5 mL раствор за инјектирање. Покрај API, формулацијата содржи и помошни супстанции (ексципиенси): меглумин, глюкофутол, полуксамер 188, глицин, натриум хлорид, натриум хидроксид или хлороводородна киселина, како и вода за инјекции.

Растворот за инјектирање е наменет за интрамускулна администрација и се користи за третман на ревматоиден артрит, за краткорочен симптоматски третман на акутни егзацербации на остеоартрит, како и за симптоматски третман на анкилозен спондилит. Дополнително, може да се користи и кај јувенилен идиопатски артрит (Khalil & Aldosari, 2020).

2.1.1. Карактеристики на активната супстанција

Во монографијата за мелоксикам во Европската фармакопеја (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.), според номенклатурата на Меѓународниот сојуз за чиста и применета хемија (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC), хемиското име на API е: 4-хидрокси-2-метил-*N*-(5-метилтиазол-2-ил)-2*H*-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид 1,1-диоксид (Council of Europe, 2026a).

Емпириската формула на мелоксикам е C₁₄H₁₃N₃O₄S₂ (Council of Europe, 2026a), додека неговата структурна формула е прикажана на Слика 1.



Слика 1 Структурна формула на мелоксикам

Figure 1 Structural formula of Meloxicam

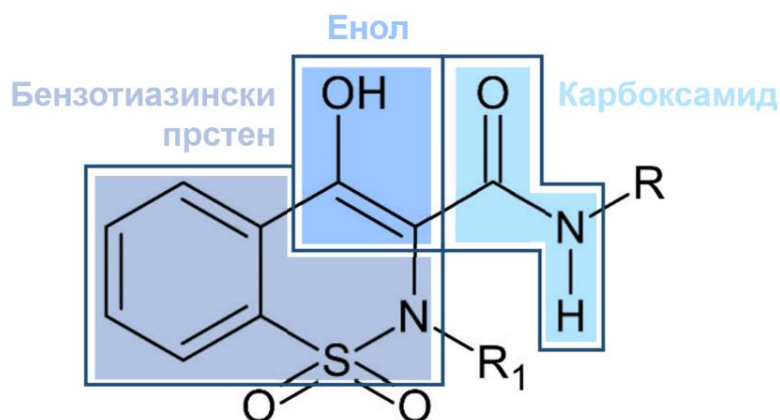
Релативната молекулска маса на мелоксикам изнесува 351,4, а неговиот регистарски број доделен од Службата за хемиски изводи (Chemical Abstracts Service, CAS) е 71125-38-7 (Council of Europe, 2026a).

2.1.1.1. Физичко-хемиски својства и биофармацевтски профил

Мелоксикам е бледожолт кристален прашок. Практично е нерастворлив во вода, многу малку растворлив во етанол (96%), а растворлив во диметилформаид (Council of Europe, 2026a). Важно е да се истакне дека мелоксикам покажува растворливост зависна од полиморфизмот, односно може да постои во различни кристални форми (полиморфи) кои меѓусебно се разликуваат според растворливоста, а со тоа и според биорасположливоста (Cysewski, 2018).

Според Биофармацевтскиот систем за класификација (Biopharmaceutical Classification System, BCS), мелоксикам се вбројува во Класа II, бидејќи се карактеризира со ниска растворливост во вода и висока пермеабилност. Оттука, неговата апсорпција, а следствено и биорасположливоста, во голема мера е ограничена од процесот на растворање и зависи од рН-вредноста на средината (Williams et al., 2013).

Мелоксикам има две рK_a-вредности (1,1 и 4,2) (Oliveira et al., 2009), а неговата точка на топење изнесува 254 °C (Moffat et al., 2011). Максималната бранова должина на ултравиолетова (Ultraviolet, UV) апсорпција варира во зависност од употребениот растворувач или пуфер, но најчесто се движи во опсег од 349 до 367 nm (Banerjee et al., 2003).



Слика 2 Општа структура на оксикамите

Figure 2 General structure of the Oxycams

Анализата на односот структура–активност (Structure–Activity Relationship, SAR) започнува со класификација на соединението во соодветната хемиска класа. Мелоксикам претставува дериват на оксикам, што значи дека во својата структура содржи бензотиазински прстен, енолна група и карбоксамид (Lemke et al., 2013).

Од хемиска гледна точка, оксикамите претставуваат деривати на енолната киселина, односно 4-хидрокси-1,2-бензотиазин карбоксамиди. Анализата на нивната општа структура прикажана на Слика 2 покажува дека најизразена активност се постигнува кога супституентот на бензотиазинскиот прстен (R_1) е метилна група (Lemke et al., 2013).

Метилната група врзана за бензотиазинскиот прстен на мелоксикам воспоставува хидрофобни интеракции со аминокиселинските остатоци во активното место на циклооксигеназата (cyclooxygenase, COX), при што овие интеракции се дополнително стабилизирани со посредство на две молекули вода. Замената на оваа метилна група со други супституенти (на пример, етил, пропил, бензил или алил) резултира со намалување на активноста, најчесто поради појава на просторни (стерични) пречки што ги нарушуваат хидрофобните интеракции во активното место (Xu et al., 2014).

Карбоксамидниот супституент (R) кај оксикамите најчесто претставува (хетеро)арилна група. Кај арилните деривати највисока активност се забележува при *m*-супституција, додека кај хетероарилните деривати pK_a -вредностите се пониски за 2–4 единици и антиинфламаторната активност може да биде приближно седумпати поголема (Lemke et al., 2013). Во таа насока, оксикамите што содржат ригидни хидрофобни ентитети (на пример, супституирани анилиди или хетероциклични прстени) врзани за амидната група на карбоксамидот, покажуваат поизразена антиинфламаторна активност во споредба со аналозите со флексибилни алкилни супституенти на истата позиција (Xu et al., 2014). Кај мелоксикам, за амидната група е врзан ригиден хетероцикличен ентитет (5-метилтиазол-2-ил), поради што се смета за тиазолан аналог. Ваквите аналози се карактеризираат со зголемена антиинфламаторна активност и намалена токсичност (Sharma et al., 2022).

N-хетероцикличните карбоксамиди се покисели од *N*-арилните деривати, при што зголемената киселост се објаснува со тавтомерна/резонантна стабилизација на конјугираната база (енолатниот анјон) преку карбоксамидниот

азотен атом. Супституцијата на карбоксамидниот азот може да ја намали оваа стабилизација, а кај терцијарните карбоксамиди се губи можноста за одредени стабилизирачки интеракции, што се одразува на киселоста (Lemke et al., 2013).

2.1.1.2. Фармаколошки својства

NSAIDs претставуваат класа на лекови со аналгетско и антипиретично дејство. При примена во повисоки дози, тие покажуваат и изразено антиинфламаторно дејство. Поради тоа, NSAIDs се широко применувани во третман на акутна и хронична болка, при состојби со покачена телесна температура, како и кај различни воспалителни реакции во организмот (Brune & Patrignani, 2015).

За фармаколошката активност на NSAIDs, од клучно значење се двата изоензими на COX: COX-1 и COX-2. COX-1 е присутен во повеќето ткива, вклучително и во тромбоцитите, додека COX-2 има централна улога во биосинтезата на простагландините кои учествуваат во медијацијата на болката, воспалителниот одговор и порастот на телесната температура (Brune & Patrignani, 2015).

NSAIDs можат да се класифицираат според два критериуми: дејството врз COX и хемиската структура.

Според дејството врз COX, NSAIDs се делат на COX-неселективни инхибитори и COX-2 селективни инхибитори. COX-неселективните инхибитори ги инхибираат и двата изоензими (COX-1 и COX-2), поради што нивната примена може да биде проследена со одредени несакани ефекти. Наспроти тоа, COX-2 селективните инхибитори претежно го инхибираат COX-2 изоензимот и, во споредба со COX-неселективните инхибитори, вообичаено, се поврзуваат со помала зачестеност на несакани ефекти, што претставува нивна терапевтска предност (Ghlichloo & Gerriets, 2025).

Според хемиската структура, NSAIDs се групираат во салицилати, пиразолони, деривати на *p*-аминофенол и други NSAIDs. Дополнително, другите NSAIDs се делат на деривати на индолоцетна киселина, деривати на пропионска киселина, деривати на аминоксалицилатна киселина, деривати на оксикам и деривати на фенаминска киселина (Ghlichloo & Gerriets, 2025).

Според дејството врз COX, мелоксикам се класифицира како COX-неселективен инхибитор. Сепак, тој покажува значително поголем афинитет кон COX-2 во однос на COX-1, особено при примена на најниската терапевтска доза.

Поради тоа, ризикот од појава на несакани ефекти е помал во споредба со други NSAIDs (Fleischmann et al., 2002). Според хемиската структура, мелоксикам претставува дериват на оксикам (Khalil & Aldosari, 2020).

Имајќи ги предвид фармакотерапевтската и хемиската припадност на мелоксикам, неговиот код според Системот за анатомско-терапевтско-хемиската класификација на лекови (Anatomical Therapeutic Chemical, ATC) е M01AC06 (WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, n.d.), како што е прикажано во Табела 1.

Табела 1 ATC код на мелоксикам

Table 1 ATC code for Meloxicam

Ниво	Опис
I	M: Мускулно-скелетен систем
II	M01: Антиинфламаторни и антиревматски препарати
III	M01A: Нестероидни антиинфламаторни и антиревматски препарати
IV	M01AC: Оксиками
V	M01AC06: Мелоксикам

2.1.1.2.1. Фармакокинетски својства

Мелоксикам се апсорбира речиси целосно по перорална, парентерална и ректална администрација. Притоа, апсолутната биорасположливост по перорална администрација изнесува околу 89%, додека по интрамускулна администрација, апсорпцијата е брза и целосна, така што просечната апсолутна биорасположливост изнесува околу 102% (Gates et al., 2005). Во терапевтски опсег од 7,5 до 30 mg, површината под кривата (Area Under the Curve, AUC) и максималната плазматска концентрација (Maximum Plasma Concentration, C_{max}) на мелоксикам се дозно-пропорционални (Davies & Skjodt, 1999), што овозможува предвидливо прилагодување на дозата.

По апсорпција, мелоксикам, како слаба киселина, во висок степен се врзува за плазматските протеини (>99%), главно за албуминот. Ваквото врзување резултира со релативно мал волумен на дистрибуција (Volume of Distribution, V_d), кој по перорална администрација се движи во опсег од 10–15 L. Мелоксикам, исто така, навлегува во синовијалната течност, каде достигнува приближно половина од плазматските концентрации (Davies & Skjodt, 1999).

Мелоксикам интензивно се метаболизира во црниот дроб до четири фармаколошки неактивни метаболити. Клучна улога во неговиот метаболизам има CYP2C9 изоензимот, со мал придонес од CYP3A4 (Gates et al., 2005). Најзастапен метаболит е 5'-карбоксимелоксикам, кој сочинува околу 60% од дозата. Тој се формира со оксидација на метилната група во бензотиазинскиот прстен преку интермедиерот 5'-хидроксиметилмелоксикам, кој сочинува околу 9% од дозата. Останатите два метаболита сочинуваат околу 16% и 4% од дозата (Davies & Skjodt, 1999).

Мелоксикам се елиминира главно во форма на метаболити. Непроменет мелоксикам се излучува во занемарливо мали количини преку урината (<0,25%), а мал дел од основното соединение се елиминира и преку фецес (околу 1,6%). Метаболитите што се излучуваат преку урината сочинуваат околу 42% од администрираната доза. Пероралниот клиренс изнесува приближно 0,42–0,7 L/h, а полувремето на елиминација (Elimination Half-Time, $t_{1/2}$) е релативно долго (околу 13–20 часа) (Davies & Skjodt, 1999).

2.1.1.2.2. Фармакодинамски својства

Фармаколошките ефекти на NSAIDs (вклучително и мелоксикам) произлегуваат од нивната способност да ја инхибираат биосинтезата на простаноидите од арахидонска киселина. Арахидонската киселина е полинезаситена масна киселина која се ослободува од мембранските фосфолипиди и претставува почетна молекула за синтеза на простаноиди. Овие сигнални молекули имаат клучна улога во регулацијата на бројни физиолошки и патофизиолошки процеси во организмот (Simmons et al., 2004).

COX ја конвертира арахидонската киселина најпрво во простагландин (Prostaglandin, PG) G₂ (PGG₂), кој потоа се редуцира до PGH₂. Понатаму, под дејство на ткивно-специфични синтази и изомерази, PGH₂ се претвора во биоактивни простаноиди, односно: PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (простациклин) и тромбоксан (Thromboxane, TX) A₂ (TXA₂). Овие медијатори се врзуваат за специфични рецептори и посредуваат различни биолошки ефекти, како медијација на болката, воспалителен одговор, пораст на телесната температура и агрегација на тромбоцити (Brune & Patrignani, 2015).

Како NSAID, мелоксикам ја инхибира активноста на COX, со што се блокира формирањето на PGH₂ и неговата конверзија во останатите простаноиди. На тој начин се потиснуваат нивните биолошки ефекти (Simmons et al., 2004).

2.1.2. Карактеристики на помошните супстанции

Во мелоксикам растворот за инјектирање, изборот на ексципиенси е насочен кон обезбедување соодветна растворливост на API, стабилност на растворот, прифатливи физичко-хемиски својства (особено pH) и добра подносливост при интрамускулна администрација. Бидејќи мелоксикам практично е нерастворлив во вода, формулацијата мора да вклучи компоненти што ја подобруваат растворливоста и ја одржуваат бистрината на растворот, со минимален ризик од појава на физички промени во текот на чувањето.

Во таа насока, меглумин има клучна улога како органска база што придонесува за регулирање на pH-вредноста и подобрување на растворливоста на API, овозможувајќи мелоксикам да остане растворен во формулацијата. Натриум хидроксидот или хлороводородната киселина се вклучени како средства за фино прилагодување на pH-вредноста до целниот опсег во кој мелоксикам е стабилен, доволно растворлив и погоден за интрамускулна администрација. Глицинот делува како пуфер и придонесува за одржување на релативно стабилна pH-вредност во текот на рокот на употреба, со што се намалува ризикот од варијации кои би можеле да доведат до физички промени во растворот (Sheskey et al., 2017).

Како корастворувач, глукофурол ја зголемува растворливоста на мелоксикам и придонесува за одржување на бистрината на растворот, што е особено важно кај формулации во кои API има многу ниска растворливост во вода. Како нејонски кополимер, полуксамер 188, покрај тоа што ја подобрува растворливоста, придонесува и за стабилизација на растворот преку намалување на ризикот од агрегација и таложење. Ова е особено важно за обезбедување визуелно чиста формулација за интрамускулна администрација (Sheskey et al., 2017).

Натриум хлоридот се користи како средство за изотонизација, со што се подобрува компатибилноста на растворот со мускулното ткиво и се намалува ризикот од локална иритација, односно се подобрува подносливоста при интрамускулна администрација (Sheskey et al., 2017).

Од аналитички аспект, кај методите базирани на HPLC со UV детекција, ексципиенсите можат потенцијално да интерферираат доколку коелуираат со API или со онечистувањата (сродни супстанции или деградациски производи) и/или доколку покажат значајна апсорпција на избраната бранова должина.

Бидејќи употребените ексципиенси во оваа формулација, генерално, не содржат изразени хромофорни групи, се очекува нивниот потенцијал за интерференција да биде низок. Практично, ова најчесто се проверува и преку анализа на плацебо (формулација со сите ексципиенси, но без API), како едноставен пристап за потврда на специфичноста/селективноста и исклучување на можни ефекти од матрицот (Marson et al., 2020).

2.2. Карактеристики на онечистувањата (сродни супстанции и/или деградациски производи на мелоксикам)

Од фармацевтска гледна точка, поимот онечистување се дефинира различно во зависност од тоа дали се однесува на онечистување во API или на онечистување во готов фармацевтски производ.

Во согласност со водичите за онечистувања на Меѓународниот совет за хармонизација на техничките барања за лекови за хумана употреба (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH), онечистувањата во API се дефинираат како компоненти присутни во API што се разликуваат по хемиската структура од самата API (ICH Q3A(R2), 2006). Онечистувањата во готовиот фармацевтски производ, пак, се компоненти присутни во готовиот производ што не претставуваат ниту API, ниту ексципиенси (ICH Q3B(R2), 2006).

Контролата на онечистувањата во готовите производи првенствено е насочена кон сродните супстанции, односно органски онечистувања поврзани со API, кои структурно се слични со неа и можат да се формираат во текот на производството или за време на чувањето (Patel et al., 2024). Во оваа поширока група се вбројуваат: појдовни суровини, споредни производи, интермедиери, деградациски производи, како и остатоци од реагенси, лиганди и катализатори (Dsouza et al., 2024).

Деградациските производи, како подгрупа на сродните супстанции, претставуваат онечистувања што настануваат поради хемиска промена на API за време на производството и/или чувањето, под влијание на светлина, температура, рН, вода или, пак, преку реакција со ексципиенси и/или контактното пакување/системот за затворање (ICH Q3B(R2), 2006).

Профилот на онечистувања во готовиот производ се контролира со валидирани SIMs, кои овозможуваат соодветно раздвојување и квантификација

на сродните супстанции (вклучително и деградациските производи). Критериумите за прифатливост се поставуваат согласно ICH Q3B(R2) и, по потреба, се поткрепуваат со токсиколошка квалификација.

При дефинирање на профилот на деградациски производи, важно е да се направи разлика помеѓу специфицирани и неспецифицирани деградациски производи.

Специфицирани деградациски производи се оние што се поединечно наведени во спецификацијата за квалитет на готовиот производ и имаат дефинирани граници на дозволено присуство, со цел да се обезбеди безбедност, ефикасност и квалитет на готовиот производ. Тие можат да бидат идентификувани или неидентификувани (ICH Q3B(R2), 2006).

Идентификувани деградациски производи се структурно карактеризирани деградациски производи, кои се идентификуваат кога се појавуваат во текот на рокот на употреба, под пропишаните услови на чување, над идентификацискиот праг дефиниран во ICH Q3B(R2). Дополнително, деградациските производи со потенцијална фармаколошка активност или токсично дејство се предмет на идентификација и/или квалификација и кога се присутни во пониски нивоа. Неидентификуваните деградациски производи, пак, не се структурно карактеризирани, туку се дефинирани преку квалитативни аналитички својства (на пример, хроматографско ретенциско време) (ICH Q3B(R2), 2006).

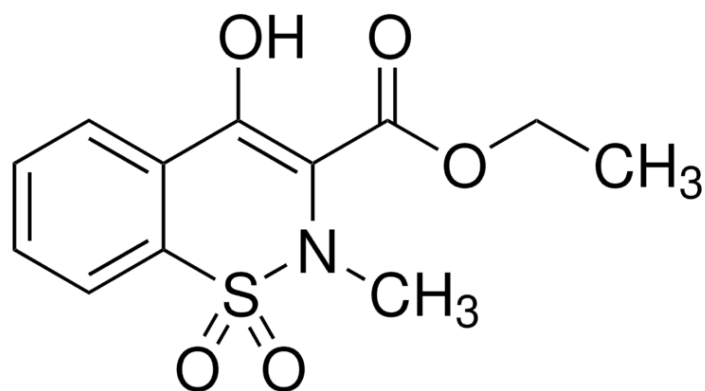
Неспецифицирани деградациски производи се оние за кои важат општи граници на дозволено присуство, но не се поединечно наведени со сопствени граници на дозволено присуство во спецификацијата на готовиот производ (ICH Q3B(R2), 2006).

За мелоксикам растворот за инјектирање, како специфицирани се наведуваат четири сродни супстанции: онечистување А, онечистување В, онечистување С и онечистување D.

2.2.1. Карактеристики на онечистување А

Според номенклатурата на IUPAC, хемиското име на онечистување А е: етил 4-хидрокси-2-метил-2H-1,2-бензотиазин-3-карбоксилат 1,1-диоксид (Council of Europe, 2026a). Релативната молекулска маса на онечистување А изнесува 283,30, а неговиот CAS регистарски број е 24683-26-9.

Емпириската формула на онечистување А е $C_{12}H_{13}NO_5S$, додека неговата структурна формула е прикажана на Слика 3.



Слика 3 Структурна формула на онечистување А

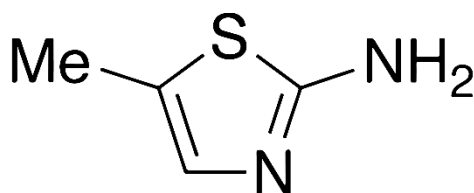
Figure 3 Structural formula of Impurity A

Онечистување А може да се разгледува како процесно онечистување, односно остаток од етил-естерски интермедиер. Ова толкување е во согласност со опишаните постапки за синтеза на мелоксикам, во кои се користи *N*-метилиран бензотиазински карбоксилат (вклучително и етил-естер) што во завршните фази се кондензира со 5-метил-2-аминотиазол за да се формира амидот. Оттука, присуството на онечистување А може индиректно да послужи како показател за ефикасноста на конверзијата и/или прочистувањето во завршните фази на синтезата (Dufrénoy et al., 2019).

2.2.2. Карактеристики на онечистување В

Според номенклатурата на IUPAC, хемиското име на онечистување В е: 5-метилтиазол-2-амин (Council of Europe, 2026a). Релативната молекулска маса на онечистување В изнесува 114,17, а неговиот CAS регистарски број е 7305-71-7.

Емпириската формула на онечистување В е $C_4H_6N_2S$, додека неговата структурна формула е прикажана на Слика 4.



Слика 4 Структурна формула на онечистување В

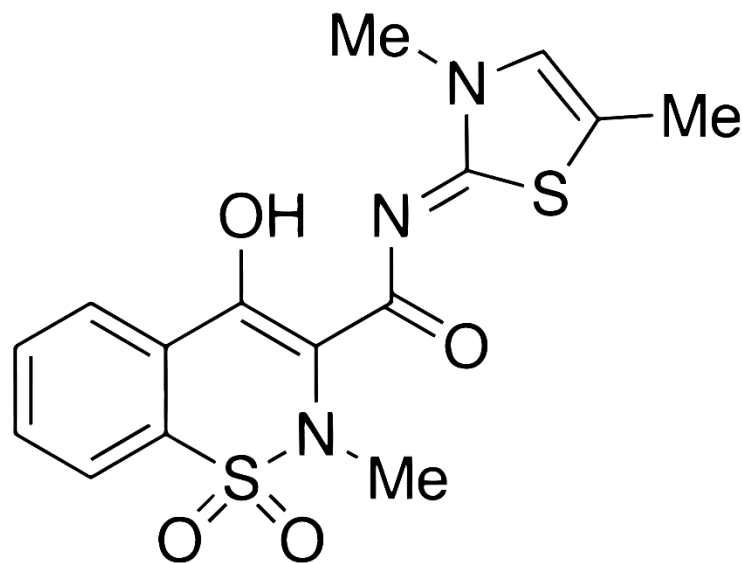
Figure 4 Structural formula of Impurity B

Онечистување В може да се разгледува како процесно онечистување, бидејќи се користи како почетна суровина во синтезата на мелоксикам и може да опстојува како остаток поради нецелосна конверзија и/или недоволно прочистување (Dufrénoy et al., 2019). Дополнително, теоретски, онечистување В може да се разгледува и како потенцијален деградациски производ при раскинување на амидната врска.

2.2.3. Карактеристики на онечистување С

Според номенклатурата на IUPAC, хемиското име на онечистување С е: *N*-[(2*Z*)-3,5-диметилтиазол-2(3*H*)-илден]-4-хидрокси-2-метил-2*H*-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид 1,1-диоксид (Council of Europe, 2026a). Релативната молекулска маса на онечистување С изнесува 365,43, а неговиот CAS регистарски број е 1262333-25-4.

Емпириската формула на онечистување С е $C_{15}H_{15}N_3O_4S_2$, додека неговата структурна формула е прикажана на Слика 5.



Слика 5 Структурна формула на онечистување С

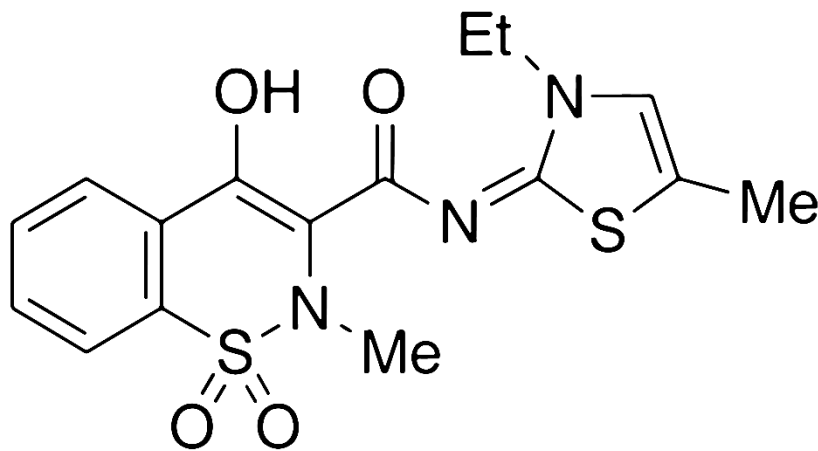
Figure 5 Structural formula of Impurity C

Онечистување С претставува *N*-метилян аналог на мелоксикам, кој може да се формира како процесно онечистување, при што метилацијата се одвива на азотниот атом во тиазолниот прстен (Volk et al., 2011). И покрај структурната сличност со мелоксикам, со соодветно оптимизирање на хроматографските услови може да се обезбеди нивно ефикасно раздвојување (Sinha et al., 2009).

2.2.4. Карактеристики на онечистување D

Според номенклатурата на IUPAC, хемиското име на онечистување D е: *N*-[(2*Z*)-3-етил-5-метилтиазол-2(3*H*)-илден]-4-хидрокси-2-метил-2*H*-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид 1,1-диоксид (Council of Europe, 2026a). Релативната молекулска маса на онечистување D изнесува 379,45, а неговиот CAS регистарски број е 1331636-17-9.

Емпириската формула на онечистување D е C₁₆H₁₇N₃O₄S₂, додека неговата структурна формула е прикажана на Слика 6.



Слика 6 Структурна формула на онечистување D

Figure 6 Structural formula of Impurity D

Онечистувањето D може да се разгледува како *N*-етил аналог на онечистување C, односно соединение кај кое на азотниот атом во тиазолниот прстен е присутна етил група наместо метил. Имајќи ја предвид структурата, веројатно е дека станува збор за процесно онечистување што може да се формира во текот на производствениот процес, особено при варијации или оптимизација на реакциските услови поврзани со чекорите на алкилација.

2.3. Аналитички метод

Под поимот аналитички метод, односно аналитичка постапка (аналитичка процедура), се подразбира сет документирани инструкции, утврдени во јасно дефиниран редослед, за изведување на анализа на конкретна супстанција или производ, со цел да се обезбедат конзистентни и сигурни резултати меѓу различни аналитичари и лаборатории (ICH Q2(R2), 2023; Panda et al., 2025).

Според општоприфатената аналитичка пракса, еден робустен аналитички метод најчесто ги опфаќа следниве елементи:

- Подготовка на примероци и реагенси, односно јасни инструкции за подготовка на примероците, референтните стандарди и реагенсите, особено кај комплексни примероци и кога е потребна соодветна чувствителност (González-Martín et al., 2023);
- Апаратура и опрема, односно спецификација на инструментите и работните услови, како и проверки за соодветност на систем, со цел да се одржат перформансите на методот и споредливоста на резултатите (Shabir et al., 2007);
- Изведба на тестот, односно детални оперативни насоки по јасен редослед, при што однапред се дефинираат експерименталните операции, апаратурата, материјалите и реагенсите, како и калибрацијата и обработката на податоците, со истовремено вклучување на контроли на критични точки, за да се обезбеди контролирано и споредливо мерење (Kadis, 2002);
- Пресметки и анализа на податоци, односно однапред дефинирани правила и статистички пристапи, со цел да се квантификува доверливоста на проценките и да се поддржи објективно донесување одлуки (Rostron et al., 2020).

2.3.1. Метод за определување на содржина на активна супстанција во готов фармацевтски производ

Методот за определување на содржина (assay) има за цел квантитативно да ја утврди содржината на API во готовиот фармацевтски производ и да потврди дека производот е во согласност со прифатливите граници пропишани во спецификациите (Uddin et al., 2016).

Во зависност од природата на API и дозираната форма, за определување на содржината може да се применат различни аналитички пристапи, како што се: титриметриски (волуметриски), хроматографски, спектрофотометриски и, кога е применливо, микробиолошки методи (Siddiqui et al., 2017).

Кај методите со течна хроматографија, содржината на API во готовиот фармацевтски производ се определува преку споредба на одговорот на детекторот за примерокот со оној за стандарден раствор (надворешен

стандард), при дефинирани услови и проверка на соодветност на систем. Резултатот се изразува како процент од декларираната содржина (Shabir et al., 2007; Patil et al., 2017).

2.3.2. Метод за следење на стабилноста на активна супстанција во готов фармацевтски производ

Фармацевтската стабилност се дефинира како способност на API или готовиот фармацевтски производ да ги задржат своите хемиски, физички и биолошки својства во рамките на утврдените спецификациски граници, во тек на определен временски период и при дефинирани услови на чување (Вајај et al., 2021). Кај готовите фармацевтски производи, стабилноста подразбира зачувување на API во непроменета форма, без значајни промени што би можеле да ја компромитираат терапевтската ефикасност и/или безбедноста на пациентите. Притоа, стабилноста не треба да се разгледува како статичко својство, туку како динамична, временски зависна карактеристика што мора систематски да се следи во текот на целиот животен циклус на производот (Mitrevska et al., 2025).

Студиите на стабилност претставуваат предуслов за регулаторно прифаќање и одобрување на лековите и се спроведуваат плански, во согласност со меѓународните водичи на ICH, Светската здравствена организација (World Health Organization, WHO) и други регулаторни агенции, со цел да се обезбеди усогласен пристап меѓу различни региони и пазари (Bhavyasri et al., 2019; Вајај et al., 2021).

Значењето на студиите на стабилност произлегува од нивното директно влијание врз безбедноста на пациентите, терапевтската ефикасност и конзистентниот квалитет на производот во текот на целиот рок на употреба. Деградацијата може да доведе до намалување на содржината на API и до формирање деградациски производи со потенцијален токсиколошки ризик, што дополнително ја нагласува потребата од научно засновани и робусно конципирани програми за следење на стабилноста (Sonawane et al., 2023; Liana et al., 2024).

Од аналитички аспект, стабилноста се оценува првенствено преку определување на содржината на API и следење на профилот на онечистувања, кој опфаќа идентификација и квантификација на сродните супстанции, односно

деградациските производи. Притоа, овие параметри мора да се мониторираат со валидирани аналитички методи (Vyas et al., 2023).

Промената на содржината на API може да укажува на релевантни деградациски процеси при кои се формираат деградациски производи, и да наложи повторна проценка на рокот на употреба и/или условите на чување, односно соодветни спецификациски промени (Sarhan & Haririan, 2025). Подеднакво важно, покрај следењето на содржината на API, е и следењето на сродните супстанции, односно деградациските производи, кои може да се формираат или чија содржина може да се зголеми во текот на чувањето (Dwivedi et al., 2025). Конзистентноста меѓу намалувањето на содржината на API и формирањето на детектибилни деградациски производи често се разгледува преку концептот баланс на маса (Marden et al., 2024). Бидејќи стабилноста се манифестира како промена во хемискиот состав, која вклучува намалување на содржината на API, придружено со појава или пораст на содржината на деградациски производи, заклучоците од студиите за стабилност се валидни само доколку со аналитичкиот метод може јасно и недвосмислено да се раздвои API од деградациските производи и компонентите на матрицот (Bajaj et al., 2021; Vyas et al., 2023).

SIMs се дефинираат како валидирани аналитички методи наменски дизајнирани за квантификација на API, како и за детекција и квантификација на сродните супстанции, односно деградациските производи, без интерференција или коелуирање што би можеле да ја прикријат реалната содржина на API и, со тоа, да ја нарушат точноста на резултатите (Tendulkar & Asif, 2025). Развојот и валидацијата на вакви методи претставуваат клучни предуслови во контролата на квалитетот на лековите, бидејќи токму тие ја обезбедуваат научната основа врз која се темелат тврдењата за стабилност и утврдувањето на рокот на употреба (Vyas et al., 2023). Оттука, SIMs мора да демонстрираат способност за јасно и недвосмислено раздвојување на API од сродните супстанции, вклучително и деградациски производи, како и од ексципиенсите. На тој начин се овозможува следење на потенцијалните деградациски производи што може да се формираат во текот на производството, чувањето, транспортот и употребата (Khaire & Pawar, 2022).

Основната цел на SIMs е да обезбедат непристрасно и веродостојно определување на содржината на API и на профилот на онечистувања, кога се

применуваат во студии на форсирана деградација (Vyas et al., 2023). Всушност, добро дизајниран SIM:

- обезбедува аналитичките резултати веродостојно да го одразуваат реалниот степен на деградација на производот;
- го минимизира ризикот од лажно позитивни или лажно негативни резултати, како последица на коелуирање и интерференции;
- го поддржува развојот на рационални стратегии за формулација преку идентификација на хемиската природа на деградациските патишта;
- обезбедува објективни докази за регулаторните тела дека производот ќе остане безбеден и ефикасен во текот на декларираниот рок на употреба (Tendulkar & Asif, 2025).

2.3.2.1. Студии на форсирана деградација (стрес тестови)

Студиите на форсирана деградација, познати и како стрес тестови, опфаќаат намерно и контролирано изложување на API или готовиот фармацевтски производ на построги услови од оние што вообичаено се очекуваат при чување и транспорт. Нивната основна цел е да се карактеризира внатрешната стабилност на API и да се идентификуваат потенцијалните деградациски патишта, преку намерно генерирање на деградациски производи што може да настанат во реални услови при производство, чување, транспорт и употреба (Vyas et al., 2023).

Принципот на форсирана деградација се заснова на примена на контролирани услови со кои процесите на деградација се забрзуваат и се обезбедуваат доволни количини деградациски производи за нивна детекција и карактеризација во разумен временски период, наместо да се чека нивната постепена појава во долгорочните студии на стабилност (Khaire & Pawar, 2022). Типично, овие услови целно резултираат со степен на деградација од приближно 5–20% (Sonawane et al., 2016). Дополнително, студиите на форсирана деградација може да придонесат за подобро разбирање на деградацијата во различни хемиски средини и, со тоа, да помогнат при избор и оптимизација на фактори за стабилизација на формулацијата (Vyas et al., 2023).

Постојат четири основни типови студии на форсирана деградација: хидролитичка деградација (која може да биде кисела или базна), оксидативна деградација, термална деградација и фотолитичка деградација (фотолиза).

2.3.2.1.1. Хидролитичка деградација

Хидролизата претставува хемиски процес при кој, под влијание на вода, доаѓа до раскинување на нестабилни функционални групи во молекулата на API, што резултира со структурни промени и формирање деградациски производи (Waterman et al., 2002). Примената на кисела и базна хидролиза овозможува појасно согледување на јонизациското однесување и реактивноста на функционалните групи во молекулата на API, како и идентификација на деградациските патишта и производите што се формираат во такви услови (Blessy et al., 2014).

Деградациските производи што се формираат при базна хидролиза често се разликуваат од оние што се формираат при кисела хидролиза, дури и кога деградацијата се одвива преку раскинување на истата хемиска врска. На пример, при базна хидролиза на естер, вообичаено, се добиваат соодветниот алкохол и сол на соодветната карбоксилна киселина. Меѓутоа, во услови на кисела хидролиза, истиот естер може селективно да се деградира преку раскинување на друга врска, во зависност од киселинско-катализираниот механизам. Оваа разлика е од суштинско значење, бидејќи со примена на протоколи за кисела и базна хидролиза се обезбедува целосен увид и широк спектар на потенцијални деградациски производи (Vyas et al., 2023).

Изборот на типот и концентрацијата на киселината или базата првенствено зависи од внатрешната стабилност на молекулата на API и од очекуваната чувствителност на хидролитичка деградација (Carstensen & Rhodes, 2000; Waterman & Adami, 2005). Доколку API е слабо растворлива во вода, може да се примени соодветен корастворувач за да се овозможи целосно растворање во киселината или базата, при што изборот на корастворувачот се прави согласно природата и растворливоста на API (Blessy et al., 2014).

Вообичаено, хидролитичката деградација се иницира на собна температура. Доколку не се забележи деградација во прифатлив временски интервал, може контролирано да се примени зголемена температура за да се забрза процесот и да се обезбедат детектибилни количества деградациски производи (Sharma & Murugesan, 2017).

Од клучно значење е примерокот да се неутрализира пред инјектирање во HPLC системот, односно при кисела хидролиза да се неутрализира со база, а при базна хидролиза со киселина. На тој начин се спречува понатамошна

деградација по завршување на стресирањето и се минимизира ризикот од оштетување на хроматографската колона (Blessy et al., 2014).

2.3.2.1.1.1. Кисела хидролиза

Киселата хидролиза опфаќа деградација на молекулата на API во услови на ниска pH-вредност, при што присутната киселина ја забрзува хидролитичката деградација на хемиски нестабилните функционални групи во молекулата на API (Khaire & Pawar, 2022). За таа цел, вообичаено, се користат хлороводородна или сулфурна киселина (Blessy et al., 2014).

Механизмот на киселата хидролиза најчесто вклучува протонирање на хетероатом (кислород или азот) во близина на електрофилен јаглерод, по што следи реакција со вода и раскинување на врската. Киселата хидролиза, вообичаено, се одвива побрзо отколку хидролизата во неутрални услови, поради каталитичкиот ефект на хидрониум јонот, што овозможува да се забележи статистички значајна деградација во практично прифатлив временски интервал (Vyas et al., 2023).

2.3.2.1.1.2. Базна хидролиза

Базната хидролиза опфаќа деградација на молекулата на API во услови на висока pH-вредност, при што присутната база ја забрзува хидролитичката деградација на хемиски нестабилните функционални групи во молекулата на API (Khaire & Pawar, 2022). За таа цел, вообичаено, се користат натриум или калиум хидроксид (Blessy et al., 2014).

Механизмот на базната хидролиза суштински се разликува од механизмот на киселата хидролиза. Имено, наместо протонирање на електрофилниот центар, хидроксидните јони директно напаѓаат електрофилни јаглеродни атоми според S_N2 механизам или, пак, ги активираат соседните групи за нуклеофилна реакција според $E1cB$ механизам. Како резултат на тоа, соединенија со различни функционални групи може да покажат изразена чувствителност кон деградација во базни услови, во споредба со кисели услови (Vyas et al., 2023).

2.3.2.1.2. Оксидативна деградација

Оксидативната деградација опфаќа деградација на API под дејство на оксидирачки средства, како на пример, водороден пероксид. Покрај тоа, може да се изведува и во присуство на атмосферски кислород, при зголемена температура и/или влажност, како и во присуство на трагови од метални јони кои дејствуваат како катализатори на оксидативните реакции (Vyas et al., 2023).

Механизмот на оксидативна деградација вклучува формирање реактивни кислородни видови (Reactive Oxygen Species, ROS) и слободни радикали, кои реагираат со електрон-богати функционални групи, при што се формираат оксидирани деривати (Khaire & Pawar, 2022).

Оксидативната деградација е особено значајна за фармацевтските производи, бидејќи кислородот е присутен во производствената средина, во воздушниот простор над производот во пакувањето и за време на транспортот. Затоа, оксидативните деградациски патишта се меѓу најчестите механизми на деградација што може да го ограничат рокот на употреба (Tendulkar & Asif, 2025).

2.3.2.1.3. Термална деградација

Термалната деградација опфаќа деградација на молекулата на API во услови на зголемена температура, со цел да се забрзаат деградациските процеси кои би се одвивале значително побавно при вообичаената температура на чување. За изведба на овој тип на деградација, најчесто се применуваат температури од 40–80 °C, а во одредени случаи може контролирано да се користат и повисоки температури (Vyas et al., 2023).

Термалната деградација може да вклучува различни механизми. Зголемената температура може да ја забрза хидролитичката деградација, а истовремено да ја поттикне и оксидативната деградација, поради зголемено молекулско движење и зголемени брзини на реакциите. Дополнително, при термален стрес може да се одвиваат и реакции на дехидратација, циклизација, декарбоксилација и полимеризација, што резултира со формирање различни типови деградациски производи. Следствено, доминантниот механизам на термална деградација првенствено зависи од хемиската структура и присутните функционални групи во молекулата на API (Khaire & Pawar, 2022).

Термалната деградација е особено важна за готовите фармацевтски производи, бидејќи температурни флукуации може да се јават за време на производството, пакувањето, транспортот и чувањето (Vyas et al., 2023). Брзината на термална деградација, вообичаено, ја следи кинетиката според Арениусовата равенка, што овозможува предвидување на долгорочната стабилност врз основа на податоци од краткорочни забрзани студии на стабилност (Fan & Zhang, 2015).

2.3.2.1.4. Фотолитичка деградација (фотолиза)

Фотолитичката деградација опфаќа деградација на молекулата на API под дејство на светлосна енергија. За изведба на овој тип на деградација, најчесто се применува изложување на светлина од UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm) и видливиот дел од спектарот, со однапред дефинирано времетраење на експозицијата (Khaire & Pawar, 2022).

Механизмот на фотолитичка деградација вклучува апсорпција на светлина од страна на хромофорните групи во молекулата на API, при што електроните преминуваат во возбудена состојба. Потоа, може да настане интрамолекуларно преуредување, раскинување на одредени врски во молекулата, реакции со молекуларен кислород или други присутни видови (Goti et al., 2024).

Фотолитичката деградација е особено значајна за фармацевтските производи, бидејќи тие можат да бидат изложени на светлина за време на производството, во продажни услови и при чување во домашни услови од страна на пациентите (Vyas et al., 2023).

2.3.2.2. Концепт на баланс на маса

Концептот на баланс на маса претставува еден од основните принципи во студиите на форсирана деградација и се користи како индикатор дека главните деградациски производи се земени предвид при евалуација на податоците од овие студии (Marden et al., 2024).

Балансот на маса ја опишува врската меѓу намалувањето на содржината на API и истовременото зголемување на содржините на детектибилните деградациски производи при форсирана деградација (Alsante et al., 2013; Baertschi et al., 2013). Во овој контекст, API се разгледува како молекула родител, додека деградациските производи претставуваат молекули ќерки што се формираат како последица на деградација на молекулата родител при условите дефинирани во студијата на форсирана деградација.

Според ICH, збирот од содржините на преостанатата (недеградирана) API и на детектибилните деградациски производи треба приближно да биде еднаков на почетната содржина на API (ICH Q1A(R2), 2003), што укажува дека главните деградациски производи се соодветно опфатени (детектирани и квантифицирани) со аналитичкиот метод. Во идеален случај, овој збир изнесува околу 100% од почетната содржина на API, при што резултатот треба да се толкува во рамките на маргината на аналитичката грешка (Alsante et al., 2013; Baertschi et al., 2013).

Во практична смисла, балансот на маса, изразен како процент, може да се пресмета како однос меѓу збирот од содржината на API и вкупните детектибилни деградациски производи по деградацијата и истиот збир во нулта точка (пред деградацијата), користејќи ја следната равенка (Baertschi et al., 2013):

$$\text{Баланс на маса (\%)} = \frac{(MP_x + MI_x)}{(MP_0 + MI_0)} \times 100 \quad \text{[Равенка 1]}$$

каде што: MP_0 е содржина на API пред деградација (нулта точка); MP_x е содржина на API по деградација; MI_0 е вкупна содржина на детектибилни деградациски производи пред деградација (нулта точка); MI_x е вкупна содржина на детектибилни деградациски производи по деградација.

Иако концептот на баланс на маса е едноставен, неговата интерпретација може да биде сложена. Имено, низок баланс на маса може да укажува дека дел од деградациските производи не се детектираат или дека се јавува загуба на анализите за време на подготовката или анализата на примерокот (Marden et al., 2024). Од друга страна, во зависност од типот на стрес условите, деградациските реакции може да вклучат и други реагенси, при што се формираат соединенија што вклучуваат делови од тие реагенси, што дополнително ја комплицира интерпретацијата на балансот на маса (Alsante et al., 2013; Baertschi et al., 2013). Во двата случаи се наметнува потреба од дополнителна оптимизација на методот пред неговата рутинска примена како SIM.

2.4. Развој и оптимизација на аналитички метод

Развојот на аналитички метод претставува систематска постапка која опфаќа воспоставување и дефинирање на нов метод за анализа на одредено својство на аналит, во согласност со претходно утврдени критериуми за прифатливост на тоа аналитичко својство. Во областа на фармацевтската анализа, најчесто се развиваат методи за квалитативно и квантитативно определување на содржината на конкретни аналити во дадени примероци (Chauhan et al., 2015).

Вообичаено, развојот на аналитички метод започнува со преглед на релевантните литературни податоци поврзани со анализите и со постоечките аналитички пристапи. На тој начин се овозможува приспособување на веќе воспоставената аналитичка методологија кон целите на методот и својствата на анализите. Оттука, развојот на нов аналитички метод најнапред подразбира

јасно дефинирање на неговите цели, а потоа и избор на соодветна инструментална техника потребна за неговата изведба (Krull & Swartz, 1999).

Причините за развој на нови аналитички методи се бројни и разновидни. Потребата се наметнува, на пример, кога постоечките методи повеќе не се применливи, кога не обезбедуваат доволна сигурност и чувствителност или кога не се економски исплатливи. Дополнително, развојот на нов (алтернативен) аналитички метод може да произлезе и од потребата за целосно усогласување со важечката регулатива. Конечно, развојот и воведувањето на современи инструментални техники со значително подобрени перформанси во однос на постарите, природно води кон развој на нови аналитички методи (Dong, 2006).

Развојот на аналитички метод базиран на HPLC, вообичаено, се состои од четири последователни чекори:

- Дефинирање на методот и неговите цели;
- Утврдување и систематизирање на постоечките податоци за аналитите;
- Почетен развој на методот со добивање првични хроматограми;
- Оптимизација на методот (Dong, 2006; Khan, 2017).

Оптимизацијата на аналитичкиот метод претставува насочен и систематски процес на прилагодување и прецизирање на хроматографските услови со цел да се постигнат претходно дефинираните перформанси на методот. Во пракса, оптимизацијата следи по почетниот развој на методот и се фокусира на подобрување на селективноста и резолуцијата, при што се тежнее кон прифатливи (и по можност робусни) резултати во разумно кратко време на анализа (Viaene & Heyden, 2020).

Во основа, при оптимизација на аналитичкиот метод се врши систематско управување со клучните хроматографски параметри. Најголемо влијание врз ретенцијата и селективноста го има составот на мобилната фаза (тип и удел на органска компонента, пуфер и рН), додека оперативните услови како проток, температура и градиент, најчесто се користат за оптимизирање на времетраењето на анализата и финално подобрување на разделувањето. Изборот и карактеристиките на колоната дополнително ја одредуваат ефикасноста и селективноста на системот, а волуменот на инјектирање влијае врз обликот на хроматографските пикови и репродуктивноста (Sule et al., 2014).

Оптимизацијата може да се спроведе со традиционален пристап или, сè почесто, преку пристап базиран на квалитет во дизајн (Quality by Design, QbD).

2.4.1. Традиционален пристап

Традиционалниот пристап за развој и оптимизација на аналитички методи, вообичаено, се темели на OFAT принципот, односно менување еден параметар додека останатите услови се одржуваат константни. Во пракса, ваквиот пристап се реализира преку серија експерименти во кои се оптимизираат услови како составот и рН-вредноста на мобилната фаза, типот и уделот на органската компонента, протокот, температурата на колоната и сл., со цел да се постигнат соодветни перформанси (ретенција, селективност, раздвојување, симетрија на пик, ефикасност и време на анализа) (Passerine & Breitreitz, 2024).

OFAT пристапот е широко применуван бидејќи е едноставен и интуитивен и овозможува директна интерпретација на влијанието на секој поединечен фактор. Ова го прави особено корисен во почетните фази на развојот, кога е потребно брзо да се воспостават работни услови и да се дефинира почетна насока за понатамошна оптимизација. Дополнително, пристапот овозможува контролирано прилагодување на параметрите, што во многу случаи е практично и соодветно за рутински лабораториски услови и за методи со ограничен број критични променливи (Taylor et al., 2023; Passerine & Breitreitz, 2024).

Сепак, OFAT пристапот има и ограничувања. Најзначајно, поради природата на експериментирањето со еден фактор, интеракциите помеѓу факторите не се разгледуваат систематски, иако тие често имаат суштинско влијание врз селективноста и раздвојувањето на пиковите во хроматографијата. Дополнително, оптимизацијата најчесто се спроведува како низа од постепени корекции без формално статистичко моделирање, што може да го отежне квантитативното опишување на врската фактор–одговор и да ја намали можноста за структурирана проценка на робусноста. Конечно, кога се разгледуваат повеќе параметри, секвенцијалниот карактер на OFAT може да доведе до поголем број експерименти и подолг развоен процес, бидејќи прилагодувањето на еден фактор може да влијае врз оптималноста на претходно поставените услови (Fukuda et al., 2018; Kasemiire et al., 2021; Taylor et al., 2023).

Поради овие причини, во современата аналитичка пракса, OFAT пристапот често се користи како практична основа или за почетна ориентација, додека за сеопфатен развој и оптимизација, како и за обезбедување на робусност, сè почесто се применува систематски пристапи базирани на QbD.

2.4.2. Пристап базиран на квалитет во дизајн

QbD претставува систематски пристап во фармацевтскиот развој кој ја нагласува потребата процесите да се дизајнираат и контролираат така што производите континуирано и доследно ќе ги исполнуваат однапред дефинираните критериуми за квалитет. Методологијата QbD се одликува со сеопфатно разбирање на процесните променливи и нивното влијание врз квалитетот на производот, со што се обезбедува конзистентност и се максимизира ефикасноста во текот на целиот животен циклус на производот. Овој пристап се темели на взаемните односи помеѓу критичните атрибути на квалитет (Critical Quality Attributes, CQAs) и критичните процесни параметри (Critical Process Parameters, CPPs), со цел ефикасно управување со варијабилноста и обезбедување робустен и сигурен производ (Prasad et al., 2016; ter Horst et al., 2021). Свкупната цел на QbD е развој на производи кои го задржуваат предвидениот квалитет во текот на рокот на употреба, поткрепено со научна валидација и проактивни техники за управување со ризик (Savitha & Devi, 2022; Ameen & Pappula, 2023).

Кога QbD се применува конкретно во развојот на аналитички методи, се користи терминот AQbD (Peraman et al., 2015). AQbD претставува систематски, научно заснован пристап за развој на аналитички методи кој нагласува однапред дефинирани аналитички цели, темелно разбирање на процесот и воспоставување простор на дизајн што ја определува прифатливата изведба на методот во рамки на дефинирани опсези на параметри (Katekar et al., 2022). За разлика од OFAT пристапите, методологијата AQbD уште од раните фази на развој интегрира принципи на управување со ризик и DoE, овозможувајќи им на фармацевтските научници да воспостават робусни аналитички процедури со документирано научно разбирање (Mishra et al., 2018).

Во рамките на AQbD, целниот аналитички профил (Analytical Target Profile, ATP) ги дефинира конкретните барања за перформансите што методот мора да ги исполни за да се смета дека е соодветен за намената, со што управувањето со неодреденоста и варијабилноста се интегрира директно во дизајнот на

методот (Dewi et al., 2022; Randive et al., 2024). Преку идентификација и контрола на критичните параметри на методот (Critical Method Parameters, CMPs) и обезбедување дека критичните аналитички атрибути (Critical Analytical Attributes, CAAs) ги исполнуваат утврдените стандарди за перформанси, може да се подобрат робусноста и перформансите на аналитичките методи низ нивниот животен циклус (Mahapatra & Meeyanathan, 2022; Kanthiah et al., 2025). Резултатите од оваа систематска карактеризација водат кон воспоставување на работната област на дизајн на методот (Method Operable Design Region, MODR), која се дефинира како мултидимензионална област во која аналитичките методи покажуваат сигурни перформанси и робусност при нормални работни услови. Дефинирањето на MODR во рамките на AQbD овозможува поголема регулаторна флексибилност преку научно оправдан опсег на параметри на методот. Ова потенцијално може да ја намали потребата од обемна ревалидација или регулаторен надзор при промени на параметрите, иако конкретните барања зависат од регулаторното прифаќање и од квалитетот на документацијата (Peraman et al., 2015).

Паралелно со ATP дефиниран во рамките на AQbD, целниот профил на квалитет на производот (Quality Target Product Profile, QTPP) претставува основен елемент на фармацевтскиот QbD, бидејќи ги опишува планираните квалитативни карактеристики на лековитиот производ, од кои произлегуваат CQAs. Воспоставувањето на оваа врска, QTPP–CQA, овозможува дизајнирање на производствени процеси што се робусни и научно оправдани во рамките на пошироката QbD парадигма (Verch et al., 2022).

2.4.2.1. Примена на аналитички квалитет во дизајн при развој на методи за следење на стабилноста

Примената на AQbD кај SIMs го поддржува развојот на аналитички ригорозни процедури со јасно дефинирани простори на дизајн и подобрена контрола на варијабилноста (Vyas et al., 2021). Интегрирањето на студиите на форсирана деградација во рамките на AQbD обезбедува механистички увид во патиштата на деградација и ја насочува селекцијата на хроматографските услови што ги раздвојуваат сите релевантни деградациски производи од API (Kleinman et al., 2015; Randive et al., 2024). Во пракса, DoE, често во комбинација со методологија на површина на одговор (Response-Surface Methodology, RSM) и мултиваријантна анализа, овозможува ефикасно мапирање на ефектите на

факторите и нивните интеракции, со што се олеснува идентификацијата на аналитичкиот простор на дизајн и предвидување на перформансите во однос на повеќе критични параметри истовремено (Lebrun et al., 2013).

Софтверските алатки како DryLab[®] (за моделирање на ретенциските времиња и хроматографска симулација) (MOLNÁR-INSTITUTE for Applied Chromatography, n.d.) и MODDE[®] (за статистички DoE) (Sartorius, n.d.), дополнително го систематизираат овој процес преку овозможување квантитативно истражување на интеракциите меѓу параметрите, конструирање простори на дизајн и објективна проценка на робусноста на методот. Во споредба со традиционалните пристапи, AQbD пристапите што комбинираат DoE со предиктивно моделирање значително ги скратуваат временските рамки за развој и го зајакнуваат разбирањето и документацијата на методот, притоа развивајќи робусни аналитички методи што поддржуваат континуирана верификација и регулаторна флексибилност во рамки на научно оправдани простори на дизајн.

2.4.2.2. Регулаторен аспект и индустриска имплементација на аналитички квалитет во дизајн

ICH ја воспостави основната регулаторна рамка за имплементација на QbD и неговиот аналитички пандан, AQbD, во фармацевтскиот развој. ICH водичите Q8(R2), Q9(R1) и Q10 колективно ги дефинираат научните и регулаторните очекувања во однос на разбирањето на производот и процесот, управувањето со квалитет базирано на ризик и интегрираните системи за квалитет, со што развојот на аналитичките методи се трансформира од емпириска практика во научно заснована дисциплина (Peraman et al., 2015; Prajapati et al., 2021).

Конкретно, ICH Q8(R2) го нагласува систематското оценување и разбирање на атрибутите на материјалите и процесните параметри, како и нивната поврзаност со квалитетот на производот (ICH Q8(R2), 2009), додека ICH Q9(R1) обезбедува структурирана рамка за управување со ризик, вклучувајќи идентификација, анализа, евалуација и контрола на ризикот, која може директно да се примени и кај аналитичките методи за да се идентификуваат и минимизираат факторите што влијаат врз перформансите на методот и аналитичкиот квалитет (ICH Q9(R1), 2023). ICH Q10 ги надградува овие принципи преку дефинирање модел за ефективен фармацевтски систем за квалитет,

имплементиран во текот на целиот животен циклус на производот, опфаќајќи развој, трансфер на технологија, производство и прекин на производството, што во целина ја поддржува изведбата на аналитичките методи и регулаторната усогласеност (ICH Q10, 2008). Методите развиени според AQbD, со карактеризиран простор на дизајн, ја поддржуваат и иницијалната валидација и континуираната верификација низ животниот циклус на аналитичкиот метод (Verch et al., 2022).

Покрај тоа, ICH Q11 обезбедува комплементарни насоки за развојот и производството на супстанции за фармацевтска употреба, потврдувајќи ги истите научно, како и насоки за ризик-базирани принципи кои се централни за QbD (ICH Q11, 2012). Во однос на аналитичките методи, параметрите за валидација што мора да се демонстрираат за да се обезбеди аналитичка сигурност се дополнително прецизирани преку ажурираниот ICH Q2(R2) и новиот ICH Q14 водич, кои заедно воспоставуваат хармонизирани меѓународни стандарди за развој и валидација на аналитички методи (ICH Q2(R2), 2023; ICH Q14, 2023). Во овој контекст, AQbD-базирани пристапи инхерентно ги адресираат овие очекувања преку систематска карактеризација на перформансите на методот низ просторот на дизајн и обезбедување усогласеност со АТР дефиниран во фазата на развој на методот (Orlandini et al., 2014). Оваа интегрирана регулаторна рамка утврдува дека фармацевтскиот и аналитичкиот квалитет не треба да се „тестираат“ во производите, туку треба научно да се дизајнираат, контролираат и континуирано унапредуваат во текот на целиот животен циклус.

Во Табела 2 е прикажан преглед на ICH водичите релевантни за имплементација на QbD и AQbD.

Табела 2 ICH водичи што ја поддржуваат имплементацијата на QbD и AQbD**Table 2** ICH guidelines supporting QbD and AQbD implementation

ICH водич	Основен фокус	Релевантност за AQbD
Q2(R2)	Барања за валидација	Дефинирање на критериуми за аналитички перформанси
Q8(R2)	Концепт на простор на дизајн	Научна основа за систематски дизајн на методот
Q9(R1)	Управување со ризик	Идентификација и контрола на критичните ризици на методот
Q10	Фармацевтски систем за квалитет	Управување со животниот циклус и континуирано унапредување
Q11	Развој и производство на активни супстанции	Усогласување на аналитичката контрола со принципите на QbD
Q14	Развој на аналитички постапки	Рамка за развој на методи базирани на AQbD

Освен ICH насоките, регулаторните тела, вклучувајќи ги Администрацијата за храна и лекови (Food and Drug Administration, FDA) и Европската агенција за лекови (European Medicines Agency, EMA), активно ја охрабруваат имплементацијата на QbD и AQbD принципите и препознаваат дека аналитичките методи развиени во рамки на воспоставен простор на дизајн може да овозможат регулаторна флексибилност (Simões et al., 2024). Двете агенции експлицитно промовираат AQbD-базирани пристапи преку упатства, научни работилници и регулаторни пилот-програми, при што се нагласува дека аналитичките методи со јасно дефинирани простори на дизајн може да се прилагодат по нивното одобрување без потреба од дополнителни поднесоци (FDA and EMA, 2017). FDA веќе има одобрено повеќе апликации за нови лекови кои вклучуваат аналитички методи развиени со AQbD и со вакви одредби за флексибилност, што покажува дека промени на методот направени во рамки на научно оправдана MODR или простор на дизајн може да се имплементираат без претходно одобрување (Peraman et al., 2015). Оваа регулаторна флексибилност не само што го

зајакнува управувањето со животниот циклус на аналитичките методи, туку и го намалува времето до имплементација на производствени и аналитички промени, при што се задржува високо ниво на уверување во квалитетот на производот. Како резултат на тоа, се создава јасен економски поттик за фармацевтските компании да усвојат развој на методи базиран на AQbD (Jagan et al., 2021).

Во споредба со традиционално развиените методи, имплементацијата на AQbD ја намалува фреквенцијата на појава на резултати надвор од трендот (Out of Trend, OOT) и резултати надвор од спецификацијата (Out of Specification, OOS) при изведба на рутински операции за контрола на квалитетот, со што директно се поддржуваат целите на фармацевтскиот систем за квалитет (Peraman et al., 2015). Фармацевтската индустрија прогресивно го усвојува AQbD како стратешка иницијатива за квалитет, сè повеќе интегрирајќи го со процесна аналитичка технологија (Process Analytical Technology, PAT), фармацевтска аналитичка технологија и целокупното управување со системите за квалитет (Mishra et al., 2018). Ова усвојување ја одразува индустриската свест дека AQbD овозможува развој на научно робусни методи со документирани простори на дизајн, кои обезбедуваат сигурни перформанси при предвидливи оперативни варијации, го намалуваат времето за развој на методот, обезбедуваат регулаторна усогласеност и го поддржуваат континуираното унапредување во текот на животниот циклус на производот (Bairagi et al., 2024).

2.4.2.3. Интеграција на дизајн на експерименти и управување со ризик во рамки на аналитички квалитет во дизајн

DoE претставува фундаментална статистичка методологија која овозможува истовремена оптимизација на повеќе параметри на аналитичкиот метод преку систематски планирани факторијални дизајни, централно-комполитни дизајни и RSM, со што овозможува замена на неефикасните OFAT пристапи за скрининг (Dar et al., 2024). Кога е интегриран со принципите на AQbD, DoE им овозможува на аналитичарите да ги карактеризираат односите меѓу SMPs и критичните атрибути, воспоставувајќи математички модели што ги опишуваат перформансите на методот низ целиот простор на дизајн (Prajarati et al., 2021). RSM обезбедува мултидимензионални предвидувања и модели што ги откриваат не само главните ефекти на поединечните параметри, туку и ефектите произлезени од интеракции меѓу параметрите, при што комбинации од

параметри можат да доведат до неочекувани последици врз перформансите (Sha'at et al., 2022). Ова сеопфатно разбирање на методот, добиено преку статистичко моделирање наместо преку конвенционален емпириски пристап, овозможува предвидување на аналитичките перформанси во рамки на дефинирани оперативни опсези, што OFAT пристапите базирани на поединечни експериментални точки не можат да го постигнат.

Методологиите за проценка на ризик, како што е наведено во ICH Q9, обезбедуваат систематски режим за идентификација и приоритетизирање на CMPs кои значајно влијаат врз аналитичките перформанси (Prajaapati et al., 2021). Кога анализата на влијанија и последици од грешки (Failure Mode and Effects Analysis, FMEA) се комбинира со рангирање преку бројот за приоритет на ризик (Risk Priority Number, RPN), овозможува систематска идентификација, евалуација и приоритетизирање на потенцијалните последици од грешки, помагајќи да се разграничат параметрите што бараат строга контрола од оние што дозволуваат оперативна флексибилност (El-Awady, 2023). Ваквото приоритетизирање засновано на ризик обезбедува експерименталните ресурси да се насочат кон карактеризација на односите помеѓу најкритичните параметри и аналитичките перформанси, со што се максимизира добиената информација од ограничени развојни буџети и истовремено се овозможува ефикасна распределба на ресурсите за контрола на квалитет. Интеграцијата на проценката на ризик со DoE преку секвенцијален скрининг на параметри создава високо ефикасен развоен пристап во кој проценката на ризик ги насочува приоритетите на експерименталниот дизајн, последователната DoE карактеризација ја потврдува критичноста на параметрите, а RSM овозможува дефинирање на контролни стратегии.

Имплементацијата на AQbD систематски ги интегрира DoE и проценката на ризик уште од иницирањето на развојот на методот, создавајќи сеопфатно разбирање на односите помеѓу параметрите на методот, оперативните услови и аналитичките перформанси (Mishra et al., 2018). Овој интегриран пристап овозможува воспоставување на MODR и соодветни контролни стратегии што ја одржуваат робусноста на методот при варијации во производството, флукуации во условите на средината и инструментални варијации, кои се неизбежни во реалната аналитичка пракса (Peraman et al., 2015).

Добиената документација ги поддржува регулаторните поднесоци, покажувајќи не само дека методите обезбедуваат прифатливи резултати, туку и дека фармацевтските компании темелно ги разбираат факторите што ги детерминираат перформансите на методот и можат сигурно да го предвидат аналитичкото однесување во рамки на дефинирани оперативни опсези, со што значајно се зајакнува регулаторната доверба во робусноста и трансферот на методот.

2.4.2.4. Софтверски поддржана имплементација на аналитички квалитет во дизајн

Софтверски поддржаниот развој на аналитички методи станува составен дел на имплементацијата на AQbD, при што софтверите за хроматографско моделирање, DoE и статистичка анализа, овозможуваат брзо истражување на комплексни параметарски простори (Tome et al., 2019). Предиктивните софтвери, како DryLab[®], користат минимален број пилот експерименти за воспоставување модели на ретенција кои овозможуваат симулација на хроматографските перформанси при повеќе комбинации на параметри, со што значително се намалува бројот на потребни експерименти, а притоа се задржува научната ригорозност (Makey et al., 2020). Оваа компјутерска способност им овозможува на фармацевтските научници брзо да разгледуваат сценарија за оптимизација на методот, да идентификуваат робусни региони и да воспоставуваат простори на дизајн со значително помал број експерименти во споредба со традиционалните пристапи. Интеграцијата на предиктивното моделирање на ретенција со HPLC системи преку автоматизирани платформи за работен тек значајно ги скратува временските рамки за развој и ја зголемува репродуктивноста преку елиминирање на експериментални манипулации и грешки при мануелен пренос на податоци, кои се својствени за традиционалните работни текови.

DoE софтверите, како MODDE[®], ја олеснуваат имплементацијата на сложени експериментални дизајни, овозможувајќи визуелизација на односите помеѓу параметрите на методот и перформансните атрибути преку графици на површина на одговор, дијаграми на интеракција и оптимизациски контури (Azcarate et al., 2020). Моќностите за статистичко моделирање во DoE софтверите генерираат предиктивни равенки што ги опишуваат перформансите на методот како функции од критичните параметри, овозможувајќи квантитативно

воспоставување на границите на просторот на дизајн (Dar et al., 2024). Овие математички модели ги откриваат интеракциските ефекти меѓу параметрите што пристапите за оптимизација со еден фактор не можат да ги идентификуваат, олеснувајќи идентификација на робусни региони на методот отпорни на мали варијации во температурата, составот на мобилната фаза и инструменталните услови (Alves et al., 2025). Интеграцијата на DoE софтверот со лабораториски информациски системи за управување (Laboratory Information Management Systems, LIMS) дополнително ги скратува временските рамки за развој и го унапредува квалитетот на податоците преку автоматизирано управување со експерименталниот работен тек и намалување на грешките при мануелен пренос на податоци.

Комбинацијата на предиктивно моделирање на ретенција и DoE софтвер обезбедува синергетски придобивки за развој на SIMs, овозможувајќи брзо воспоставување робусни аналитички постапки со јасно дефинирани простори на дизајн и сеопфатна придружна документација (Makey et al., 2020). Интегрираните софтверски платформи значително го намалуваат експерименталниот обем во споредба со традиционалните пристапи преку овозможување виртуелна симулација, оптимизирано планирање на експериментите и поефикасно истражување на мултидимензионални параметарски простори (Mannochio-Russo et al., 2020). Електронските развојни записи генерирани од овие платформи, кои опфаќаат образложение за дизајнот, матрици на експериментален дизајн, статистички евалуации и оправдување на просторот на дизајн, обезбедуваат транспарентна и регулаторно подготвена документација што ја олеснува проценката и ја поддржува флексибилноста по одобрувањето за методи што функционираат во рамките на воспоставени простори на дизајн (Colloud et al., 2023).

2.4.2.4.1. DryLab®: софтвер за предиктивно моделирање на ретенција и оптимизација на методи

DryLab® функционира како алатка за предиктивно моделирање која, врз основа на минимален број пилот експерименти, конструира модели на ретенција за аналитите и го симулира хроматографското однесување во зависност од градиентот и условите на хроматографската колона (Liu et al., 2002). Наместо да се спроведува обемен скрининг на параметри, DryLab® воспоставува квантитативни релации помеѓу хроматографските променливи и ретенциското

однесување преку минимален сет стратешки планирани пилот експерименти (вообичаено, 2–12), со што овозможува предвидување на хроматографското однесување во широк опсег на услови (Fekete & Molnár, 2018). Овој софтверски поддржан пристап значително го забрзува преминот од иницијален развој на метод кон систематска оптимизација и им овозможува на истражувачите да идентификуваат оптимални услови за раздвојување без обемно емпириско тестирање. Способноста на софтверот да ја моделира ретенцијата како математичка функција од контролирани параметри го трансформира развојот на методот од емпириски OFAT пристап во рационален дизајн воден од предиктивни алгоритми. Оваа можност е нагласена и од Rácz & Kormányi (2018), кои го опишуваат DryLab[®] како компјутерска алатка заснована на ретенциски времиња, што имплементира равенки изведени од солвофобната теорија за предвидување на хроматографското однесување при променливи услови.

Софтверот применува мултиваријантно моделирање за симулација на хроматографските перформанси при повеќе комбинации на параметри истовремено, создавајќи квантитативен простор на дизајн кој опфаќа стотици или илјадници потенцијални конфигурации на методот (Ahmad et al., 2021). Оваа *in silico* можност за истражување значително го намалува потребниот број експерименти и потрошувачката на реагенси во споредба со традиционалните секвенцијални пристапи. Кога е интегриран со HPLC системи за директно собирање на податоци, DryLab[®] овозможува континуирана повратна врска меѓу симулацијата и експерименталната валидација, при што објавени студии покажуваат дека предвидувањата на моделот, вообичаено, се согласуваат со експерименталните ретенциски времиња со отстапување помало од 3,5% (Makey et al., 2020). Високата точност на овие предвидувања овозможува посигурен трансфер на методот и го намалува ризикот од неуспешна имплементација при трансфер на технологија во лаборатории за контрола на квалитетот.

Во развојот на SIM, DryLab[®] значително ја забрзува фазата на оптимизација преку предвидување на резолуцијата, факторот на капацитет и селективноста во рамките на просторот на дизајн. На тој начин се овозможува брза идентификација на робусни услови на методот, при кои се обезбедува соодветно раздвојување во однапред дефинирани опсези на параметри, во согласност со систематските пристапи за оптимизација на хроматографските

методи (Terzić et al., 2014). Софтверот генерира мапи на резолуција и мултидимензионални контури на оптимизација кои обезбедуваат визуелни насоки за избор на оптимални работни точки што балансираат повеќе цели на перформансите, како минимизирање на времето на анализа и максимизирање на резолуцијата на пиковите (Huang, 2016; Velichkovska et al., 2022). Овие компјутерски резултати им овозможуваат на аналитичарите да преминат од оптимизација во една точка кон воспоставување пошироки простори на дизајн кои ја демонстрираат внатрешната робусност на методот (Latrous, 2022). Со интеграција на податоците од форсирана деградација со предиктивно моделирање, DryLab® ја воспоставува квантитативната основа потребна за регулаторни поднесоци што ја демонстрираат и раздвојувачката моќ и соодветноста на аналитичкиот метод.

2.4.2.4.2. MODDE®: софтвер за дизајн на експерименти и статистичка организација

MODDE® обезбедува сеопфатни функционалности кои овозможуваат систематско испитување на CMPs преку повеќе ефикасни пристапи за DoE (Sartorius, n.d.). DoE софтверите, како MODDE®, поддржуваат функционален факторијален дизајн, централно-композилен дизајн и Plackett-Burman дизајн, при што генерираат експериментални матрици што ги водат истражувачите низ структурирани фази на скрининг и оптимизација на параметрите (Fukuda et al., 2018). Со истовремена евалуација на повеќе променливи, наместо секвенцијална оптимизација на поединечни фактори, MODDE® значително го намалува експерименталниот обем, а истовремено овозможува посигурни статистички заклучоци (Yeßen et al., 2023). Интегрираните алатки за анализа на аналитички одговор овозможуваат директно мерење и интерпретација на влијанието на CMPs (pH-вредност на мобилната фаза, состав на органскиот растворувач, температура на колоната, проток) врз CAAs, како што се резолуција на пиковите, ретенциско време, број на теоретски подови и фактор на симетрија (Peng et al., 2022).

Можностите за статистичко моделирање во MODDE® вклучуваат анализа базирана на RSM и мултиваријантни алгоритми за оптимизација, со кои се идентификуваат оптимални поставки на факторите што истовремено задоволуваат повеќе критериуми за перформанси (Zakrajšek et al., 2015). Софтверот конструира математички модели што ги квантифицираат односите

помеѓу независните параметри на методот и зависните показатели на аналитичките перформанси, при што визуелизацијата преку контурни графици и графици на површина на одговор го олеснува рационалното донесување одлуки при оптимизацијата на методот (Popovska Jakimovska et al., 2023). Дополнително, MODDE® ги пресметува границите на просторот на дизајн, дефинирајќи ја мултидимензионалната област во која CAAs остануваат во однапред дефинирани прифатливи опсези, при што се воспоставува аналитичката MODR што ја карактеризира робусноста на методот при контролирани варијации на параметрите (Zakrajšek et al., 2015; Peraman et al., 2015; Popovska Jakimovska et al., 2023). На овој начин, развојот на методот се поместува од оптимизација во една точка кон дефинирање пошироки работни области, што ја демонстрира робусноста и регулаторната оправданост на избраните услови.

Интеграцијата на MODDE® со работни текови за проценка на ризик го олеснува идентификувањето и приоритетизирањето на критичните параметри за кои се потребни построги контролни стратегии, врз основа на нивната статистичка значајност и практично влијание врз перформансите на методот (Deidda et al., 2018). Софтверот овозможува систематско „движење“ низ MODR преку квантификација на релативното влијание на секој параметар врз аналитичките перформанси, со што ресурсите за контрола може да се насочат кон параметрите со најголемо влијание врз клучните атрибути на квалитет (Zakrajšek et al., 2015; Deidda et al., 2018; Popovska Jakimovska et al., 2023). Преку документирање на квантитативните односи помеѓу параметрите на методот и перформансните исходи, MODDE® ја обезбедува научната основа потребна за воспоставување робусни контролни стратегии, дефинирање граници на прифатливост и поддршка на регулаторни поднесоци што демонстрираат сеопфатно разбирање на методот и неговата соодветност за следење на стабилноста во текот на животниот циклус на фармацевтскиот производ (Ellwanger et al., 2020; Bairagi et al., 2024).

2.4.2.4.3. Интеграција на DryLab® и MODDE® за развој на методи за следење на стабилноста

Комбинираната примена на DryLab® и MODDE® создава синергетски пристап во кој систематското истражување базирано на DoE со MODDE® се надополнува со предиктивно моделирање на ретенцијата во DryLab®,

овозможувајќи ефикасна идентификација на оптимални услови во рамките на дефинираниот простор на дизајн, со минимален број експерименти (Velichkovska et al., 2022). Ваквиот интегриран работен тек може значително да ги скрати временските рамки за развој на аналитички методи, од недели до денови, при истовремено задржување на научната ригорозност и регулаторна усогласеност (Mannochio-Russo et al., 2020).

Во ваквиот пристап, работниот тек типично започнува со проценка на ризик и факторијален скрининг, поддржани од MODDE®, со цел идентификација CMPs. Потоа следува примена централно-композиционен или Вох-Behnken дизајн за воспоставување квантитативни односи помеѓу факторите и аналитичките перформанси, како и за оценка на интеракциите помеѓу факторите (Fukuda et al., 2018; Sartorius, n.d.). DryLab®, пак, ги користи експериментално добиените податоци од ваквите структурирани студии за да изгради предиктивни модели на ретенција и да генерира мултидимензионални мапи на резолуција, овозможувајќи оптимизациски сценарија без потреба од дополнителни експерименти (Jayaraman et al., 2011).

На овој начин, секој експериментален чекор придонесува кон сеопфатно разбирање на хроматографскиот процес, при што се избегнуваат непотребни повторувања во скринингот на параметри и повеќекратни циклуси на оптимизација, кои се карактеристични за традиционалниот развој на аналитички методи. Комплементарните предности на двете софтверски алатки овозможуваат поцврста научна основа за воспоставување аналитички методи базирани на AqBd: MODDE® обезбедува статистичка сигурност при проценката на ефектите на параметрите и нивните интеракции (Zakrajšek et al., 2015), додека DryLab® овозможува предиктивна способност за брзо *in silico* истражување на голем број оптимизациски сценарија (Makey et al., 2020).

MODDE® ја квантифицира големината и статистичката значајност на влијанието на секој параметар врз CQAs, создавајќи емпириска основа за дефинирање на контролни стратегии и граници на просторот на дизајн (Popovska Jakimovska et al., 2023). Паралелно, симулациските можности на DryLab® овозможуваат истовремено разгледување на бројни конфигурации на методот во рамките на просторот на дизајн, на пример, преку максимизирање на резолуцијата и минимизирање на времето на анализа (Jayaraman et al., 2011). Дополнително, интеграцијата на двата пристапа овозможува и взаемна

верификација, при што резултатите добиени од моделите базирани на DoE можат да се потврдат експериментално, а евентуалните отстапувања да се искористат за понатамошно унапредување на моделите.

Кај SIMs, интегрираниот пристап DryLab[®]–MODDE[®] има особено значење, бидејќи овозможува систематско документирање на критичните параметри, контролните стратегии и границите на просторот на дизајн, што претставува силна аналитичка основа за трансфер на методот и негова примена низ животниот циклус (Jayaraman et al., 2021; Losacco et al., 2021). Документируваниот простор на дизајн може да се користи при трансфер на методот кон лаборатории за контрола на квалитетот, при што мапите на резолуција и предвидените перформанси во рамките на оперативните опсези овозможуваат побрза потврда на соодветноста на методот без потреба од дополнителни скрининг експерименти (Jayaraman et al., 2021; Agrawal & Kotadiya, 2024).

Во текот на програмите за испитување на стабилност, ваквиот пристап овозможува поефикасна реакција при појава на варијации во перформансите, преку идентификација на параметрите што треба да се следат и, по потреба, да се коригираат со цел да се одржат аналитичките перформанси во рамките на дефинираните работни опсези (Lebrun et al., 2013; Agrawal & Kotadiya, 2024). Критичните контролни точки идентификувани со MODDE[®] можат да служат како референтни цели за континуирана верификација на перформансите на методот (Lebrun et al., 2013; Deidda et al., 2018; Popovska Jakimovska et al., 2023). Конечно, интеграцијата на резултатите од студиите на форсирана деградација со статистичките модели во MODDE[®] и предиктивните модели во DryLab[®] овозможува појасно демонстрирање на селективноста на SIM во однос на релевантните деградациски сценарија и ја зајакнува довербата во способноста на методот сигурно да ги детектира и квантифицива очекуваните онечистувања под реални услови на чување (Jayaraman et al., 2021; Agrawal & Kotadiya, 2024).

Во Табела 3 се сумирани клучните предности и ограничувања поврзани со интегрираната употреба на софтверите DryLab[®] и MODDE[®].

Табела 3 Клучни предности и ограничувања на интегрираниот софтверски пристап DryLab®–MODDE® за развој на методи базирани на AQbD

Table 3 Key Advantages and Limitations of the Integrated DryLab®–MODDE® Software Approach in AQbD-Based Method Development

Аспект	Интегриран софтверски пристап
ПРЕДНОСТИ	
<i>Експериментална ефикасност</i>	Намален број експерименти преку статистички насочен DoE и предиктивно моделирање
<i>Дефинирање на простор на дизајн</i>	Брзо воспоставување мултидимензионален простор на дизајн
<i>Време на развој</i>	Скратено време за развој на метод во споредба со традиционалниот пристап
<i>Робусност на метод</i>	Подобрена робусност преку мултиваријантна оптимизација
<i>Регулаторна поддршка</i>	Структурирана документација што поддржува управување со животниот циклус
<i>Потрошувачка на ресурси</i>	Намалена потрошувачка на растворувачи и реагенси и помало создавање отпад
ОГРАНИЧУВАЊА	
<i>Барања за обука</i>	Потреба од експертиза во DoE и принципите на моделирање
<i>Почетна инвестиција</i>	Трошоци за софтвер и инфраструктурни трошоци
<i>Зависност од податоци</i>	Точноста на предвидувањата зависи од квалитетот на пилот експериментите
<i>Применливост на моделот</i>	Ограничена предиктивна сигурност кај многу сложени или нови системи
<i>Потреба од верификација</i>	Потребна е експериментална потврда пред имплементација
<i>Сложеност на имплементација</i>	Интеграција во постојните лабораториски работни текови

2.5. Валидација на аналитички метод

Валидацијата на аналитичкиот метод претставува процес базиран на лабораториски студии со кои се потврдува дека методот е соодветен за предвидената намена (ICH Q2(R2), 2023).

Валидацијата треба да се изврши пред имплементација на методот во рутинска употреба. Доколку аналитичкиот метод претрпи промени што излегуваат надвор од оперативните опсези опфатени со иницијалната валидација, потребна е ревалидација. Дополнително, може да се спроведува и периодична ревалидација во научно оправдани временски интервали (Marson et al., 2020).

Фармакопеите, како и водичите на ICH, обезбедуваат препораки и насоки за валидација на аналитичките методи преку дефинирање на параметрите што треба да се испитаат и критериумите што добиените резултати треба да ги исполнат за методот да се смета за валидиран. Сепак, овие препораки не треба да се толкуваат како апсолутни, бидејќи не претставуваат единствена рамка за спроведување на валидацијата (Marson et al., 2020).

2.5.1. Валидациски параметри: основни концепти и дефиниции

Во согласност со ICH Q2(R2), валидацијата на аналитички метод опфаќа испитување на релевантни валидациски параметри, во зависност од типот и намената на методот, како што се: специфичност/селективност, линеарност, опсег, точност, прецизност, граница на детекција, граница на квантификација и робусност.

2.5.1.1. Специфичност/селективност

Специфичноста/селективноста (Specificity/selectivity) на аналитичкиот метод се дефинира како способност на методот недвосмислено да го измери аналитичкиот одговор (сигналот) на аналитот во присуство на други компоненти што очекувано може да се наоѓаат во примерокот за анализа, како што се онечистување (сродни супстанции и/или деградациски производи), ексципиенси и/или компоненти во матриксот (ICH Q2(R2), 2023).

Во литературата, поимите специфичност и селективност често се користат како синоними. Сепак, во пракса може да се направи разлика меѓу нив, во зависност од аналитичката техника и целта на анализата. Специфичноста вообичаено се поврзува со добивање јасен и недвосмислен одговор за соединението од интерес, додека селективноста се користи како релативен поим што го опишува степенот до кој аналитот може да се определи во смеси и/или матрикс без интерференции од други компоненти (Marson et al., 2020; Ermer & Nethercote, 2025).

2.5.1.2. Линеарност и опсег

Линеарност (Linearity) се однесува на способноста на аналитичкиот метод, во даден работен опсег, да обезбеди аналитички одговори што се пропорционални со концентрацијата на аналитот (ICH Q2(R2), 2023).

Линеарноста треба да се испита и потврди во рамки на опсегот на аналитичкиот метод. Вообичаено, се оценува на најмалку пет различни концентрациски нивоа во рамки на работниот опсег. Добиените резултати се евалуираат статистички преку регресиона анализа со примена на методот на најмали квадрати, при што се добива регресиона права (Marson et al., 2020; ICH Q2(R2), 2023).

Регресионата анализа претставува математичка процена на степенот на зависност меѓу аналитичкиот одговор и концентрацијата. Во наједноставниот случај (линеарна регресија), зависноста се опишува со равенката на регресиона права (Miller & Miller, 2010):

$$y = a + bx$$

[Равенка 2]

каде што наклонот (slope, b) ја опишува промената на аналитичкиот одговор во зависност од концентрацијата, а отсечокот на ординатата (intercept, a) ја претставува вредноста на одговорот при нулта концентрација и во пракса може да укаже на присуство на систематско отстапување.

Како статистички показатели на линеарноста најчесто се користат коефициентот на корелација (Coefficient of Correlation, r) и коефициентот на детерминација (Coefficient of Determination, R^2).

Опсегот (Range) на аналитичкиот метод претставува интервал помеѓу највисоката и најниската концентрација (вклучувајќи ги и тие концентрации) во кој методот покажува задоволителна точност, прецизност и линеарност. Вообичаено, опсегот се утврдува врз основа на резултатите од испитувањето на линеарноста (ICH Q2(R2), 2023).

2.5.1.3. Точност

Точноста (Accuracy) на аналитички метод се дефинира како блискост на добиените резултати со вистинската (теоретска) вредност. Притоа, за определување на точноста, потребни се најмалку девет определувања кои се вршат на три концентрациски нивоа во рамки на пропишаниот опсег на методот (ICH Q2(R2), 2023).

Точноста се изразува како аналитички принос (recovery), кој се пресметува како процентуален однос помеѓу вредноста добиена со аналитичкиот метод и вистинската вредност (Marson et al., 2020; ICH Q2(R2), 2023).

2.5.1.4. Прецизност

Прецизноста (Precision) на аналитичкиот метод се дефинира како степен на блискост (степен на расејување) помеѓу серија мерења добиени со повеќекратно земање примероци од ист хомоген примерок, под пропишани услови (ICH Q2(R2), 2023).

Прецизноста се разгледува на три нивоа:

- Повторливост (Repeatability) – прецизност при работа под исти оперативни услови во краток временски интервал (на пример, ист аналитичар, ист инструмент, ист ден);
- Интермедиерна прецизност (Intermediate precision) – варијабилност на резултатите во рамки на една иста лабораторија при промена на услови (различни денови, различни аналитичари и/или различни инструменти);
- Репродуктивност (Reproducibility) – прецизност меѓу лаборатории (меѓулабораториски студии), односно степен на согласување на резултатите добиени во различни лаборатории при анализа на хомогени примероци (Marson et al., 2020; ICH Q2(R2), 2023).

Прецизноста најчесто се изразува преку стандардна девијација (Standard Deviation, SD), релативна стандардна девијација (Relative Standard Deviation, RSD) и/или коефициент на варијација (Coefficient of Variation, CV), а по потреба и како варијанса (Variance, s^2) (Marson et al., 2020; ICH Q2(R2), 2023).

2.5.1.5. Граница на детекција и граница на квантификација

Границата на детекција (Limit of Detection, LOD) претставува најмалата количина на аналит во примерокот за анализа што може да се детектира, но не мора да се квантификува, додека границата на квантификација (Limit of Quantification, LOQ) претставува најмалата количина на аналит во примерокот за анализа што може квантитативно да се определи со задоволителна точност и прецизност (ICH Q2(R2), 2023).

Во зависност од природата на техниката, за определување на LOD и LOQ се применуваат повеќе пристапи, вклучувајќи визуелна евалуација, пристап заснован на односот сигнал/шум (Signal-to-Noise Ratio, S/N), како и пристап

заснован на SD на аналитичкиот одговор и наклонот на калибрационата права (Marson et al., 2020; ICH Q2(R2), 2023). Најчесто, LOD и LOQ се определуваат врз основа на односот S/N, при што се споредува аналитичкиот одговор добиен од аналитот при ниски концентрации со шумот на базната линија (ICH Q2(R2), 2023).

2.5.1.6. Робусност

Робусноста (Robustness) на аналитичкиот метод претставува мерка за неговата способност да даде сигурни и споредливи резултати при мали, намерни (планирани) промени на параметрите на методот (ICH Q2(R2), 2023).

Кај аналитичките методи базирани на HPLC, робусноста може да се евалуира преку следење на промените кај параметрите за соодветност на систем (Heyden et al., 1999).

Во случај на HPLC метод со изократско елуирање, робусноста најчесто се оценува со промена на најмалку еден од следниве услови: рН-вредност на мобилната фаза, однос на компонентите во мобилната фаза, проток, колона (ист тип на колона, но од друга серија и/или од друг производител) и температура на колоната (Marson et al., 2020).

При евалуација на робусноста кај HPLC метод со градиентно елуирање, дозволено е да се разгледуваат промени на истите услови, со исклучок на директното менување на односот на компонентите во мобилната фаза на начин што би го компромитирал градиентот. Мали промени во составот на мобилната фаза се прифатливи само доколку се исполнети критериумите за прифатливост на параметрите за соодветност на систем и доколку ретенциските времиња останат во дозволени граници ($\pm 15\%$) (Heyden et al., 1999; Epshtein et al., 2018).

2.5.2. Избор на параметри при валидација на аналитички методи

Според ICH Q2(R2), аналитичките методи се класифицираат во четири општи типови:

- Идентификациски тестови;
- Квантитативни тестови за определување на онечистувања;
- Тестови за гранични вредности за контрола на онечистувања;
- Квантитативни тестови за определување на содржината на API во примероци од API или во готовиот фармацевтски производ, како и за определување на содржината на друга избрана супстанција во готовиот производ.

Поради различната намена на овие типови методи, при процесот на валидација, изборот на валидациските параметри што треба да се испитаат, како и критериумите за прифатливост, може да се разликуваат во зависност од типот на аналитичкиот метод.

Согласно ICH Q2(R2), задолжителни параметри за валидација на метод за определување на содржина на API во готов фармацевтски производ се: специфичност/селективност, линеарност, опсег, точност и прецизност. Иако робусноста не е дефинирана како задолжителен параметар, во одредени фази од развојот и примената на методот практично се наметнува потреба и од нејзино определување.

Согласно истиот водич, задолжителни параметри за валидација на метод за определување на онечистувања се: специфичност/селективност, линеарност, опсег, точност, прецизност, LOD и LOQ. Иако робусноста не е задолжителна, и кај овој тип методи се препорачува нејзино определување, со цел да се потврди сигурноста на резултатите при мали, намерни варијации на условите на методот.

2.6. Соодветност на систем

Испитувањето на соодветност на систем претставува составен дел на многу аналитички методи и се заснова на принципот дека опремата, електрониката, аналитичките операции и примероците што се анализираат функционираат како еден интегриран систем кој треба соодветно да се процени за да се утврди дали ги исполнува барањата на аналитичкиот метод (Epshtein, 2020; ICH Q2(R2), 2023).

Соодветноста на систем не треба да се поистоветува со валидацијата на аналитичкиот метод. Имено, валидацијата се спроведува иницијално (по потреба и ревалидација при значајни промени), додека испитувањата на соодветност на систем се изведуваат рутински, односно периодично, со цел да се потврди дека системот функционира правилно и дека е способен да ја изврши предвидената анализа под пропишаните услови (Watson, 2016).

Проверката на соодветност на систем се врши преку однапред дефинирани параметри, при што изборот на овие параметри зависи од типот на аналитичкиот метод и критичните перформанси што треба да се контролираат (Bliesner, 2005; Epshtein, 2020). Примери за параметри за соодветност на систем се: фактор на капацитет, фактор на симетрија, број на теоретски подови и резолуција.

2.6.1. Фактор на капацитет

Факторот на капацитет (Capacity Factor, k') претставува бездимензионална величина која го опишува степенот на задржување на анализот во хроматографскиот систем, односно односот помеѓу времето поминато во стационарната фаза и времето поминато во мобилната фаза (Watson, 2016).

k' се пресметува според следната равенка (Bliesner, 2005):

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{[Равенка 3]}$$

каде што t_R е ретенциското време на анализот, а t_0 е ретенциското време на незадржаната компонента.

Воспоставениот критериум за прифатливост за k' е неговата вредност да биде во интервал 2–10 (Bliesner, 2005).

2.6.2. Фактор на симетрија

Факторот на симетрија (Symmetry Factor, A_S) претставува мерка за степенот на симетрија на хроматографски пик (Council of Europe, 2026b).

A_S се пресметува според следната равенка (Council of Europe, 2026b):

$$A_S = \frac{\omega_{0,05}}{2d} \quad \text{[Равенка 4]}$$

каде што $\omega_{0,05}$ е ширината на пикот измерена на дваесетинка (5%) од неговата висина, а d е ширината на предната половина на пикот, исто така измерена на една дваесетинка (5%) од неговата висина.

Воспоставениот критериум за прифатливост за A_S е неговата вредност да биде во интервал 0,8–1,8 (Council of Europe, 2026b).

2.6.3. Број на теоретски подови

Бројот на теоретски подови (Number of Theoretical Plates, N) претставува мерка за ефикасноста на колоната, односно мерка за нејзината способност да обезбеди тесни и остри хроматографски пикови (Watson, 2016).

N се пресметува според следната равенка (Council of Europe, 2026b):

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad \text{[Равенка 5]}$$

каде што t_R е ретенциското време на анализот, а W_h е ширината на пикот измерена на половина од неговата висина.

Воспоставениот критериум за прифатливост за N е истиот да биде поголем или еднаков на 1000 (≥ 1000) (Bliesner, 2005).

2.6.4. Резолуција

Резолуцијата (Resolution, R_s) претставува мерка за степенот на раздвојување помеѓу два соседни хроматографски пика (Watson, 2016).

R_s се пресметува според следната равенка (Watson, 2016):

$$R_s = 1,18 \left(\frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{W_{h,1} + W_{h,2}} \right) \quad \text{[Равенка 6]}$$

каде што $t_{R,1}$ и $t_{R,2}$ се ретенциските времиња на двете компоненти, а $W_{h,1}$ и $W_{h,2}$ се ширините на соседните пикови на половина од нивната висина.

Воспоставениот критериум за прифатливост за R_s е нејзината вредност да биде поголема или еднаква на 1,5 ($\geq 1,5$) (Bliesner, 2005).

2.7. Мерна неодреденост

Мерната неодреденост е фундаментален концепт во аналитичката пракса и ја опишува дисперзијата на вредности што со разумна веројатност можат да се припишат на мерената величина (Funk et al., 2006). Истата може да произлезе од инструменталната варијабилност, влијанија од средината или недоследности во аналитичката постапка (Weitzel, 2012). Во фармацевтската контрола на квалитетот, точноста на мерењата е од суштинско значење за да се потврди дека фармацевтските производи ги исполнуваат однапред дефинираните спецификации за безбедност, ефикасност и квалитет (Lee et al., 2022).

Проценката на мерната неодреденост ги квантификува нивото на доверба во резултатите, ги истакнува клучните извори на варијабилност и укажува на области за унапредување на методот и процесот (Jameel et al., 2015). Кога варијабилноста е постојано висока, тоа може да укажува на недоволна контрола на процесот или на методолошки недостатоци (Lee et al., 2022). Транспарентното прикажување на неодреденоста ја зголемува довербата во аналитичките податоци преку признавање на потенцијалните ограничувања и преку овозможување информирани толкувања на резултатите (do Rosario & Mendes, 2025). Поради тоа, регулаторните стандарди, како ISO/IEC 17025:2017, бараат акредитираните лаборатории да ја прикажуваат и документираат мерната неодреденост, со што се обезбедува споредливост на резултатите помеѓу различни институции (ISO, 2017).

Во рамките на валидацијата на методи, мерната неодреденост претставува клучен показател за сигурноста на резултатите под дефинирани услови. Со

квантификување на можната отстапка на резултатот од вистинската вредност, таа помага да се процени дали методот е соодветен за предвидената намена (Feinberg et al., 2004). Јасното дефинирање на потребното ниво на прецизност ја олеснува селекцијата на соодветни методи и опрема, ги избегнува непотребните трошоци поврзани со прекумерни барања и овозможува навремено препознавање на случаи кога методот не ги исполнува поставените критериуми.

Во фармацевтската анализа, интегрирањето на ригорозна валидација на методот со сеопфатна евалуација на мерната неодреденост обезбедува робусна рамка за генерирање сигурни и следливи аналитички податоци (Feinberg et al., 2004). Тријадата составена од прецизно мерење, валидација на методи и евалуација на мерната неодреденост претставува темел на регулаторната усогласеност.

За проценка на мерната неодреденост, вообичаено, се користат два пристапи: пристап одозгора-надолу (Top-down) и пристап одоздола-нагоре (Bottom-up). Кај пристапот одозгора-надолу, неодреденоста се проценува врз основа на податоци од валидацијата на методот или од рутинската контрола на квалитетот. Овој пристап е ефикасен и практичен за воспоставени методи, иако може да биде ограничен од обемот и достапноста на перформансните податоци (Martinello et al., 2020). Наспроти тоа, пристапот одоздола-нагоре ги квантификува поединечните извори на неодреденост во секоја фаза од мерниот процес. Иако бара повеќе време и ресурси, тој обезбедува сеопфатен профил и е особено корисен во фазата на развој на методот (Lee et al., 2015). Комбинираната примена на двата пристапа овозможува поткрепена и сеопфатна евалуација на мерната неодреденост во фармацевтската анализа.

Од една страна, прецизноста го одразува степенот до кој повторените мерења меѓусебно се согласуваат, а од друга страна, прикажувањето на мерната неодреденост го комуницира нивото на доверба во тие резултати. Заедно, овие елементи се неопходни за обезбедување сигурност, интерпретабилност и регулаторна прифатливост на аналитичките податоци. Без нив, резултатите би биле само бројки без соодветен научен контекст (Cox & O'Hagan, 2022).

3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

Главните цели на истражувачката работа се насочени кон развој, оптимизација и валидација на два аналитички метода, и тоа:

- Развој, оптимизација и валидација на HPLC метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање, со примена на традиционален пристап за развој и оптимизација на аналитички методи;
- Развој, оптимизација и валидација на HPLC SIM за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања (сродни супстанции и/или деградациски производи), со примена на пристап базиран на AQbD, потпомогнат со DryLab® (за предиктивно моделирање на ретенцијата и рационална оптимизација на хроматографските услови) и MODDE® (за DoE-базирана квантитативна проценка на робусноста и дефинирање на MODR).

Покрај главните цели, при реализација на истражувачката работа се наметна и потребата од воспоставување на следниве дополнителни цели:

- Дизајн и изведба на студии на форсирана деградација под соодветни услови, со цел контролирана деградација на API во состав на готовиот фармацевтски производ и генерирање на примарните деградациски производи што разумно може да се формираат во текот на рокот на употреба, како и обезбедување нивно соодветно хроматографско раздвојување од API (без коелуирање), со што се потврдува дека методот е соодветен за следење на стабилноста;
- Евалуација на соодветноста на хроматографскиот систем за изведба на развиените и валидирани аналитички методи;
- Проценка на мерната неодреденост при определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање, со примена на пристапите одозгора-надолу и одоздола-нагоре.

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

4.1. Материјали на истражувачката работа

4.1.1. Хемикалии и реагенси

Главните хемиски референтни стандарди (Chemical Reference Standards, CRSs) претставуваат фармакопејски референтни супстанции. Како референтен стандард за квантификација на API се користи Meloxicam CRS, испорачан од Европскиот директорат за квалитет на лековите и здравствена заштита (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM). За потребите на анализата на онечистувања се користат следниве референтни стандарди: Meloxicam Impurity A CRS, Meloxicam Impurity B CRS, Meloxicam Impurity C CRS и Meloxicam Impurity D CRS, исто така испорачани од EDQM. Дополнително, се употребува и Meloxicam Impurity Standard според Британска фармакопеја (British Pharmacopoeia, BP), кој претставува смеса од мелоксикам и онечистувањата А, В и С, со цел потврда на хроматографското раздвојување и идентификација на пиковите.

За подготовка на плацебо растворот се користат следниве компоненти: меглумин, глукофузол и полксамер 188 (Sigma-Aldrich); глицин (Carl Roth); натриум хлорид, вода за инјекции и етанол (96%) (Алкалоид). Концентрациите на поединечните компоненти во плацебо растворот се усогласени со составот на готовиот фармацевтски производ, а pH-вредноста се прилагодува со помош на натриум хидроксид (Carl Roth) и хлороводородна киселина (Sigma-Aldrich).

Покрај натриум хидроксид (Carl Roth) и хлороводородна киселина (Sigma-Aldrich), за изведба на студиите на форсирана деградација се користи и водороден пероксид (Алкалоид).

Како органска компонента во мобилните фази кај изократскиот и градиентниот метод се употребува ацетонитрил ($\geq 99,9\%$, Carl Roth). Притоа, кај изократскиот метод, како водена компонента се користи ултрачиста вода, произведена во лабораториите на Факултетот за медицински науки при Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип, прилагодена на pH 3,1 со глацијална оцетна киселина ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich). Кај градиентниот метод, како водена компонента се употребува фосфатен пуфер, подготвен од калиум дихидроген фосфат (Carl Roth), прилагоден на pH 6,0 со натриум хидроксид (Carl Roth). Како растворувачи за подготовка на стандардните раствори и примероците за анализа се користат метанол ($\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich) и ултрачиста вода.

4.1.2. Тип, перформанси и услови на системот за хроматографија

Изократскиот и градиентниот метод се развиени, оптимизирани и валидирани на HPLC систем Waters Alliance (Waters Corporation, USA), опремен со модул за раздвојување е2695 и UV/Vis детектор со променлива бранова должина Waters 2489.

4.1.2.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање

Кај методот за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање се применува изократски тип на елуирање, при што составот на мобилната фаза останува константен во текот на целата хроматографска анализа.

За хроматографското раздвојување се користи колона од не'рфосувачки челик со димензии 25 cm × 4,0 mm, пакувана со октадецилсилил силика гел за хроматографија со големина на честици 5 μm (LiChrospher 100, RP-18). Како мобилна фаза се употребува смеса од ацетонитрил и ултрачиста вода во меѓусебен сооднос 60:40 (v/v), при што водената компонента се прилагодува на pH 3,1 со глацијална оцетна киселина.

Брзината на проток на мобилната фаза е 1,5 mL/min, температурата на системот се одржува на 25 °C, а детекцијата се врши на бранова должина од 360 nm. Волуменот на инјектирање изнесува 10 μL, додека вкупното времетраење на една хроматографска анализа е 10 минути.

4.1.2.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања

Кај методот за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања се применува градиентен тип на елуирање, при што составот на мобилната фаза се менува во текот на хроматографската анализа.

Како мобилна фаза се употребува смеса од фосфатен пуфер, подготвен од калиум дихидроген фосфат и прилагоден на pH 6,0 со 1 M натриум хидроксид (водена компонента), и ацетонитрил (органска компонента). Вкупното времетраење на една хроматографска анализа изнесува 41 минута. Програмата за градиентниот тип на елуирање е прикажана во Табела 4.

Табела 4 Програма за градиентен тип на елуирање**Table 4** Gradient elution program

Време (минути)	% на водена компонента (v/v)	% на органска компонента (v/v)	Коментар
0–12	80	20	Изократски режим
12–35	80 → 30	20 → 70	Линеарен градиент
35–36	30 → 80	70 → 20	Линеарен градиент
36–41	80	20	Рееквилибрација

За хроматографско раздвојување се користи колона од не'р'фосувачки челик со димензии 15 cm × 4,6 mm, пакувана со октадецилсилил силика гел за хроматографија со големина на честници 5 μm, со запечатени крајни силанолни групи (end-capped) (Inertsil ODS-2).

Брзината на проток на мобилната фаза изнесува 1,0 mL/min, температурата на автосемплерот се одржува на 25 °C, а температурата на колоната на 45 °C. Детекцијата се врши на две бранови должини, 260 nm и 350 nm, при волумен на инјектирање од 10 μL.

4.1.3. Останати материјали

4.1.3.1. Опрема

За изведба на студиите на форсирана деградација се користи лабораториска печка MRC DFO (MRC Laboratory Equipment Ltd., Israel), додека за подготовка на стандардните раствори и примероци за анализа се користи ултразвучна бања UD100SH-2.8LQ (China). Одмерувањето на референтните стандарди и примероците се изведува со помош на аналитичка вага со пет децимални места ABX 110X (ABX, Germany), а pH-вредноста при подготовка на мобилните фази се прилагодува со pH-метар Jenway 3510 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.1.3.2. Софтвери

За обработка на хроматографските податоци се користи Empower 3, со примена на алгоритмот ApexTrack за интеграција на пиковите.

Кај градиентниот метод, DryLab® се користи за предиктивно моделирање на ретенцијата и оптимизација на хроматографските услови, додека MODDE®, преку пристап базиран на DoE, се користи за проценка на робусноста.

4.2. Методи на истражувачката работа

4.2.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање

4.2.1.1. Протокол за подготовка на стандарден раствор

Стандардниот раствор се подготвува со растворање на Meloxicam CRS во 40% метанол. За таа цел, се одмеруваат 20,0 mg Meloxicam CRS и се префрлаат во одмерна тиквичка од 100,0 mL. Потоа, тиквичката се дополнува со 40% метанол малку повеќе од половина, се затвора, темелно се промешува и се поставува во ултразвучна бања 20 минути, со цел да се обезбеди целосно растворување на мелоксикам. На крај, тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката, при што се добива стандарден раствор со работна концентрација од 0,20 mg/mL.

Пред инјектирање во HPLC системот, стандардниот раствор се филтрира преку политетрафлуороетиленски (polytetrafluoroethylene, PTFE) филтер со големина на пори 0,45 μm .

4.2.1.2. Протокол за подготовка на примерок за анализа

За подготовка на примерокот за анализа, се зема 1,0 mL од растворот за инјектирање со јачина 15 mg/1,5 mL и се префрла во одмерна тиквичка од 50,0 mL. Потоа, тиквичката се дополнува со 40% метанол малку повеќе од половина, се затвора, темелно се промешува и се поставува во ултразвучна бања 20 минути, со цел подготовката на примерокот да биде еквивалентна на подготовката на стандардниот раствор. На крај, тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката, при што се добива работна концентрација еднаква на работната концентрација на стандардниот раствор, односно 0,20 mg/mL.

Пред инјектирање во HPLC системот, примерокот за анализа се филтрира преку PTFE филтер со големина на пори 0,45 μm .

4.2.1.3. Методологија за проценка на мерната неодреденост

Проценката на мерната неодреденост се спроведува согласно рамката на EDQM, која опфаќа четири последователни чекори (EDQM, 2020a):

- идентификација на мерната величина;
- идентификација на изворите на неодреденост;
- квантификација на неодреденоста;
- пресметка на комбинираната стандардна и проширена неодреденост.

Првиот чекор се состои од јасно дефинирање на мерената величина, со наведување на мерната единица и форматот на прикажување на резултатот (Dutta, 2024).

Вториот чекор е насочен кон идентификација на сите потенцијални извори на неодреденост. За структурирана визуелизација и категоризација често се користи дијаграм на причина и последица (Meuer, 2007).

Третиот чекор опфаќа квантификација на мерната неодреденост во согласност со документите за управување со квалитет издадени од EDQM, со примена на пристапите одозгора-надолу и одоздола-нагоре.

Во рамките на пристапот одозгора-надолу, мерната неодреденост се проценува врз основа на податоци од валидацијата на методот, поточно од податоците за интермедиерна прецизност и точност.

Релативната стандардна неодреденост поврзана со прецизноста се пресметува од податоците за интермедиерна прецизност според следната равенка (EDQM, 2020b):

$$Relative\ u(p) = \sqrt{\frac{(RSD_{BR})^2}{k} + \frac{(RSD_{WR})^2}{k \times n}} \quad \text{[Равенка 7]}$$

каде што: RSD_{BR} е релативна стандардна девијација добиена со комбинирање на резултатите од две независни серии (between-run); RSD_{WR} е релативна стандардна девијација добиена од резултатите од една независна серија (within-run); k е бројот на независни серии; n е бројот на изведени анализи во една независна серија.

Потоа, апсолутната стандардна неодреденост поврзана со прецизноста се пресметува според следната равенка (EDQM, 2020b):

$$Absolute\ u(p) = Relative\ u(p) \times \bar{X} \quad \text{[Равенка 8]}$$

каде што \bar{X} е средната вредност на мерената величина, добиена со комбинирање на резултатите од независните серии.

Стандардната неодреденост поврзана со точноста се пресметува од податоците за аналитички принос (recovery), добиени на сите концентрациски нивоа, според следната равенка (EDQM, 2020b):

$$u(rec) = \frac{SD_R/100}{\sqrt{n}} \quad \text{[Равенка 9]}$$

За да се процени дали средната вредност за аналитичкиот принос, добиена на сите концентрациски нивоа, статистички значајно отстапува од

целната вредност (100%) и да се утврди дали е потребна корекција на пристрасноста (bias), се применува Student-овиот t-тест. Потоа, стандардната неодреденост поврзана со пристрасноста се пресметува според следната равенка (EDQM, 2020b):

$$u(b) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^q b_i^2}{q}} \quad \text{[Равенка 10]}$$

каде што q е бројот на анализи, а b_i претставува отстапување на секој поединечен аналитички принос од 100% или, во случај на статистички значајна пристрасност, отстапување од средната вредност за аналитичкиот принос.

Во рамките на пристапот одоздола-нагоре, мерната неодреденост се проценува со земање предвид на поединечните извори на неодреденост во секоја фаза од мерниот процес. Во конкретниот случај, мерната неодреденост се проценува врз основа на четири компоненти: неодреденост поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор, неодреденост поврзана со концентрацијата на примерокот за анализа, како и неодреденостите поврзани со прецизноста и точноста на методот.

Во однос на концентрацијата на стандардниот раствор, мерната неодреденост се проценува со земање предвид на придонесите од измерената маса на референтниот стандард, одмерната тиквичка употребена за подготовка на стандардниот раствор и моларната маса на мелоксикам.

Калибрацијата на аналитичката вага се изведува со сертифицирани тегови, а придружната неодреденост се пресметува статистички врз основа на константен член и член зависен од масата, добиени во процесот на калибрација. Неодреденоста поврзана со декларираната чистота ($99,00\% \pm 0,08\%$, $k = 2$) се презема од сертификатот за анализа, при што стандардната неодреденост се добива со делење на наведената проширена неодреденост со факторот на покриеност (EDQM, 2020c).

Неодреденоста на одмерната тиквичка произлегува од толеранцијата при калибрација, повторливоста при мерењето и температурните ефекти. Придонесот од калибрацијата се моделира со триаголна распределба (EDQM, 2020c; BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, and OIML, 2008). Повторливоста се оценува врз основа на десет повторени мерења на масата на растворувачот (метанол), при што волуменот на метанолот се определува преку неговата густина ($0,7913 \text{ g/mL}$). Температурниот придонес се проценува за отстапување од

± 4 °C во однос на 20 °C, користејќи го волуметрискиот температурен коефициент на експанзија на метанолот ($0,00149$ °C⁻¹) (The Engineering ToolBox, 2009).

Придонесот од моларната маса се проценува врз основа на молекулската формула на мелоксикам (C₁₄H₁₃N₃O₄S₂) (Council of Europe, 2026a), со користење на атомските маси на составните хемиски елементи дефинирани од IUPAC и нивните соодветни неодредености, моделирани со правоаголна распределба (IUPAC, n.d.).

На крај, комбинираната стандардна неодреденост на концентрацијата на стандардниот раствор се добива со примена на методот на корен од збир на квадрати (Root-Sum-of-Squares, RSS), при што се земаат предвид релативните придонеси од измерената маса на референтниот стандард, одмерната тиквичка употребена за подготовка на стандардниот раствор и моларната маса на мелоксикам (EDQM, 2020c; EDQM, 2020d).

Во однос на концентрацијата на примерокот за анализа, мерната неодреденост се проценува со земање предвид на придонесите од пипетата употребена за пренос на растворот за инјектирање и одмерната тиквичка употребена за подготовка на примерокот за анализа, со соодветни прилагодувања врз основа на номиналните волумени и калибрационите толеранции на употребените одмерни садови.

За да се одржи конзистентност помеѓу двата пристапи за проценка на мерната неодреденост, придонесите од прецизноста и точноста на методот, како извори на неодреденост во пристапот одоздола-нагоре, не се пресметуваат повторно, туку се преземаат од пристапот одозгора-надолу. На тој начин се обезбедува методолошка усогласеност и се избегнува непотребно повторување на пресметките.

Во четвртиот чекор, комбинираната стандардна неодреденост се пресметува со примена на RSS методот за сите релевантни компоненти.

Кај пристапот одозгора-надолу, комбинираната релативна стандардна неодреденост се добива во вклучување на неодреденостите поврзани со прецизноста и пристрасноста, според следната равенка (EDQM, 2020b):

$$u_c = \sqrt{u(p)^2 + u(b)^2} \quad \text{[Равенка 11]}$$

Кај пристапот одоздола-нагоре, комбинираната релативна стандардна неодреденост се добива со вклучување на неодреденостите поврзани со концентрацијата на стандардниот раствор и концентрацијата на примерокот за

анализа, како и неодреденостите поврзани со прецизноста и пристрасноста, според следната равенка (EDQM, 2020c; EDQM, 2020d):

$$u_c = \sqrt{\left(\frac{u(C_{Standard})}{C_{Standard}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{Sample})}{C_{Sample}}\right)^2 + u(p)^2 + u(b)^2} \quad \text{[Равенка 12]}$$

Конечно, проширената неодреденост се пресметува со примена на соодветен фактор на покриеност врз комбинираната релативна стандардна неодреденост, според следната равенка (EDQM, 2020b; EDQM, 2020c; EDQM, 2020d):

$$U = k \times (u_c \times \bar{X}) \quad \text{[Равенка 13]}$$

4.2.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања

4.2.2.1. Протоколи за подготовка на стандардни раствори

Стандардниот раствор на мелоксикам се подготвува со растворање на Meloxicam CRS во 40% метанол. За таа цел, се одмерува 1,0 mg Meloxicam CRS и се префрла во одмерна тиквичка од 10,0 mL. Потоа се додаваат 0,3 mL 1 M натриум хидроксид, по што тиквичката се дополнува со 40% метанол малку повеќе од половина, се затвора, темелно се промешува и се поставува во ултразвучна бања 20 минути. На крај, тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката, при што се добива раствор со концентрација од 0,1 mg/mL.

Од првично подготвениот раствор со концентрација 0,1 mg/mL се зема 0,4 mL и се префрла во одмерна тиквичка од 10,0 mL, по што тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката. На тој начин се добива конечна концентрација од 0,004 mg/mL.

Поединечните стандардни раствори на онечистувањата А, В, С и D се подготвуваат според истиот протокол како и стандардниот раствор на мелоксикам, со додавање на 0,3 mL 1 M натриум хидроксид и последователно разредување од почетна концентрација 0,1 mg/mL до 0,004 mg/mL.

Мешаниот стандарден раствор (смеса од мелоксикам и онечистувањата А, В, С и D) се подготвува со мешање на еднакви волумени од поединечните почетни раствори (0,1 mg/mL). За таа цел, од секој почетен раствор се зема по 0,4 mL и се префрлаат во одмерна тиквичка од 10,0 mL. Потоа, тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката и се промешува, при што се добива

мешан стандарден раствор во кој концентрацијата на секоја компонента изнесува 0,004 mg/mL.

Пред инјектирање во HPLC системот, сите стандардни раствори се филтрираат преку PTFE филтер со големина на пори 0,45 μm .

4.2.2.2. Протокол за подготовка на примерок за анализа

За подготовка на примерокот за анализа, се земаат 2,0 mL од растворот за инјектирање со јачина 15 mg/1,5 mL и се префрлаат во одмерна тиквичка од 10,0 mL. Потоа се додаваат 0,3 mL 1 M натриум хидроксид, по што тиквичката се дополнува со 40% метанол малку повеќе од половина, се затвора, темелно се промешува и се поставува во ултразвучна бања 20 минути, со цел подготовката на примерокот да биде еквивалентна на подготовката на стандардниот раствор. На крај, тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката, при што се добива работна концентрација на примерокот од 2,0 mg/mL.

Пред инјектирање во HPLC системот, примерокот за анализа се филтрира преку PTFE филтер со големина на пори 0,45 μm .

4.2.3. Протоколи за изведба на студии на форсирана деградација

4.2.3.1. Хидролитичка деградација

4.2.3.1.1. Кисела хидролиза

Воспоставени услови: 2 M хлороводородна киселина, 50 °C, 45 минути.

Во одмерна тиквичка од 10,0 mL се додаваат 2,0 mL раствор за инјектирање (еквивалентно на 20,0 mg мелоксикам). Потоа се додаваат 0,4 mL 12 M хлороводородна киселина, по што растворот се третира на 50° C во траење од 45 минути. По киселата хидролиза, во одмерната тиквичка се додаваат 4,8 mL 1 M натриум хидроксид за неутрализација на киселината. Конечно, се додаваат уште 0,3 mL 1 M натриум хидроксид, согласно протоколот за подготовка на примерокот за анализа, по што тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката.

Пред инјектирање во HPLC системот, деградираниот примерок се филтрира преку PTFE филтер со големина на пори 0,45 μm .

4.2.3.1.2. Базна хидролиза

Воспоставени услови: 2 M натриум хидроксид, 50 °C, 45 минути.

Во одмерна тиквичка од 10,0 mL се додаваат 2,0 mL раствор за инјектирање (еквивалентно на 20,0 mg мелоксикам). Потоа се додаваат 1,3 mL 5 M натриум хидроксид, по што растворот се третира на 50 °C во траење од 45

минути. По базната хидролиза, во одмерната тиквичка се додаваат 1,1 mL 6 M хлороводородна киселина за неутрализација на базата. Конечно, се додаваат 0,3 mL 1 M натриум хидроксид, согласно протоколот за подготовка на примерокот за анализа, по што тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката.

Пред инјектирање во HPLC системот, деградираниот примерок се филтрира преку PTFE филтер со големина на пори 0,45 μm .

4.2.3.2. Оксидативна деградација

Воспоставени услови: 3% водороден пероксид, 40 °C, 45 минути.

Во одмерна тиквичка од 10,0 mL се додаваат 2,0 mL раствор за инјектирање (еквивалентно на 20,0 mg мелоксикам). Потоа се додаваат 0,2 mL 30% водороден пероксид, по што растворот се третира на 40 °C во траење од 45 минути. По оксидативната деградација, во одмерната тиквичка се додаваат 0,3 mL 1 M натриум хидроксид, согласно протоколот за подготовка на примерокот за анализа, по што тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката.

Пред инјектирање во HPLC системот, деградираниот примерок се филтрира преку PTFE филтер со големина на пори 0,45 μm .

4.2.3.3. Термална деградација

Воспоставени услови: 80 °C, 8 часа.

Во одмерна тиквичка од 10,0 mL се додаваат 2,0 mL раствор за инјектирање (еквивалентно на 20,0 mg мелоксикам). Потоа, растворот се третира на 80 °C во траење од 8 часа. По термалната деградација, во одмерната тиквичка се додаваат 0,3 mL 1 M натриум хидроксид, согласно протоколот за подготовка на примерокот за анализа, по што тиквичката се дополнува со 40% метанол до ознаката.

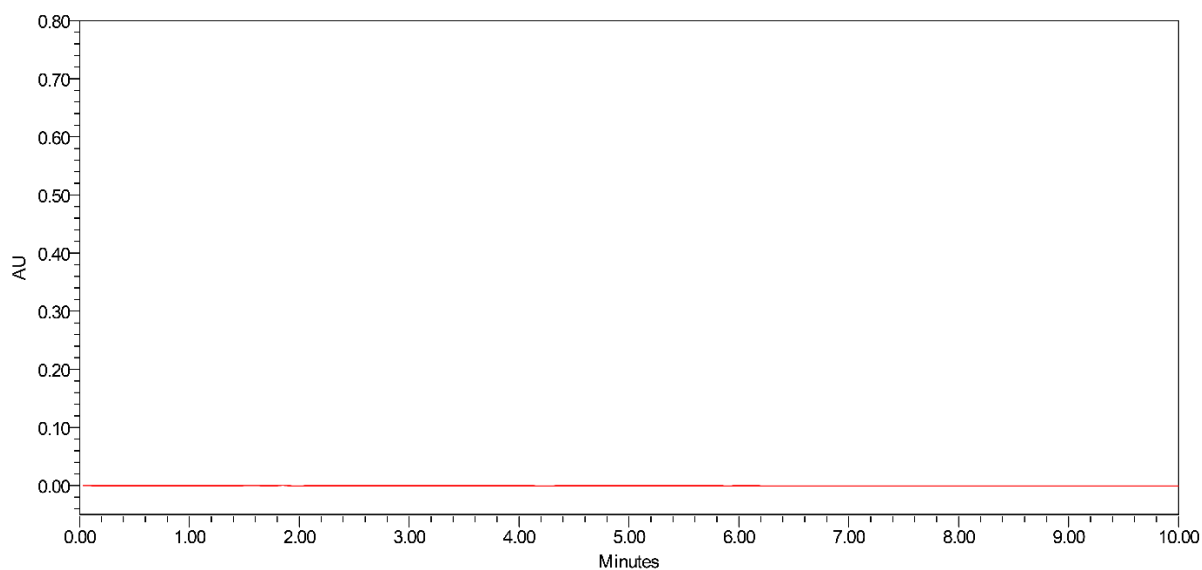
Пред инјектирање во HPLC системот, деградираниот примерок се филтрира преку PTFE филтер со големина на пори 0,45 μm .

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање

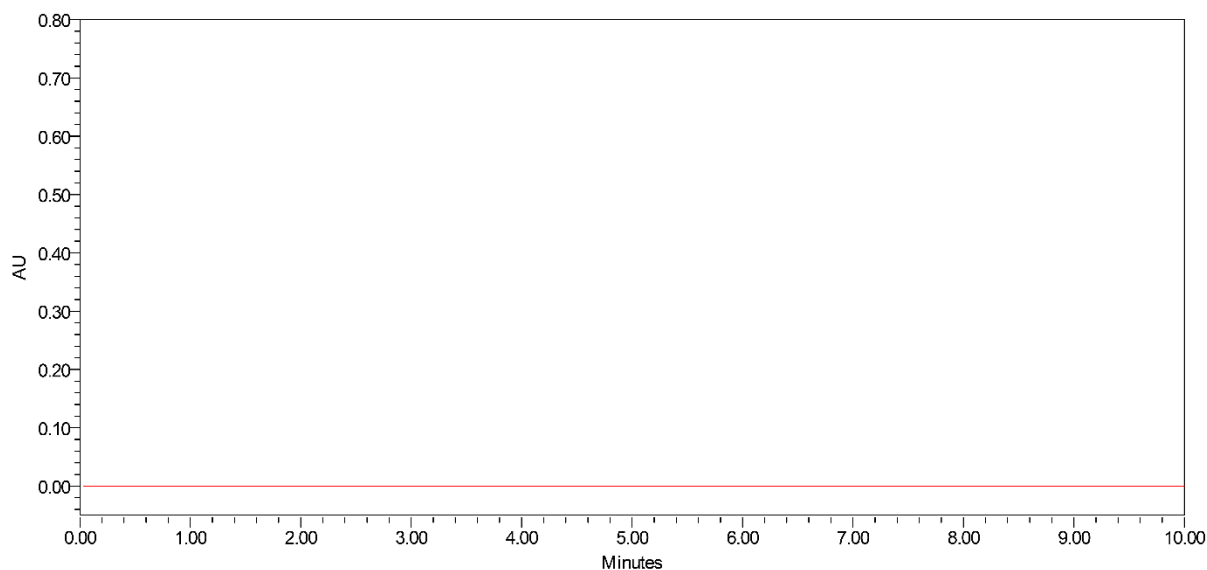
5.1.1. Валидација на аналитичкиот метод

За потврда на **специфичноста на аналитичкиот метод** беа анализирани четири репрезентативни хроматограми, добиени од: растворувачот, плацебо растворот, стандардниот раствор и примерокот за анализа.



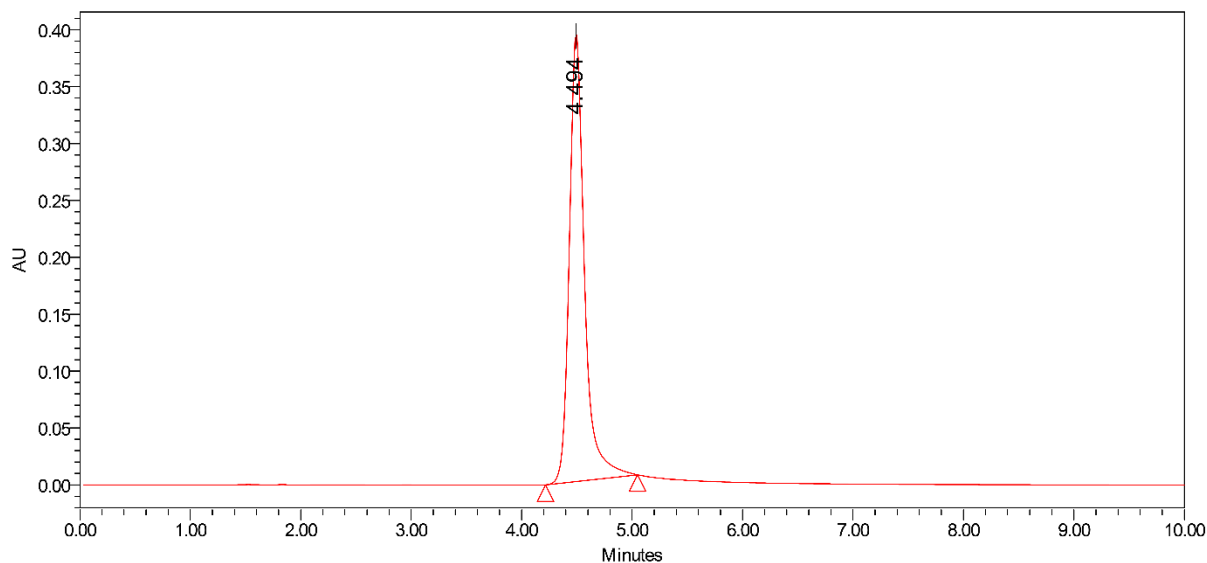
Слика 7 Хроматограм од растворувачот

Figure 7 Chromatogram of the solvent



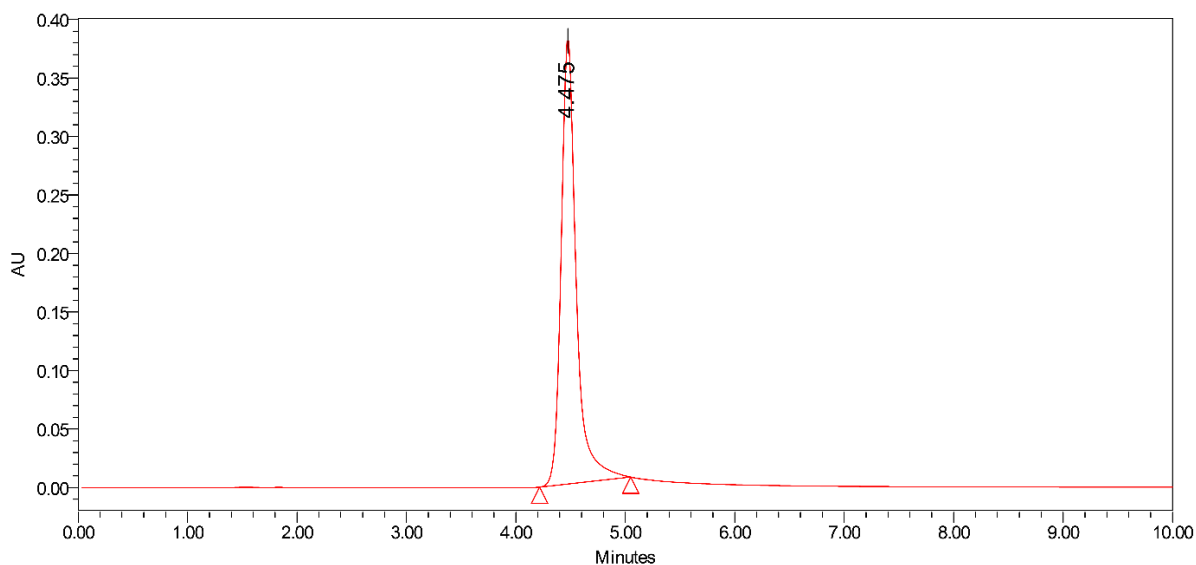
Слика 8 Хроматограм од плацебо растворот

Figure 8 Chromatogram of the placebo solution



Слика 9 Хроматограм од стандардниот раствор

Figure 9 Chromatogram of the standard solution



Слика 10 Хроматограм од примерокот за анализа

Figure 10 Chromatogram of the sample solution

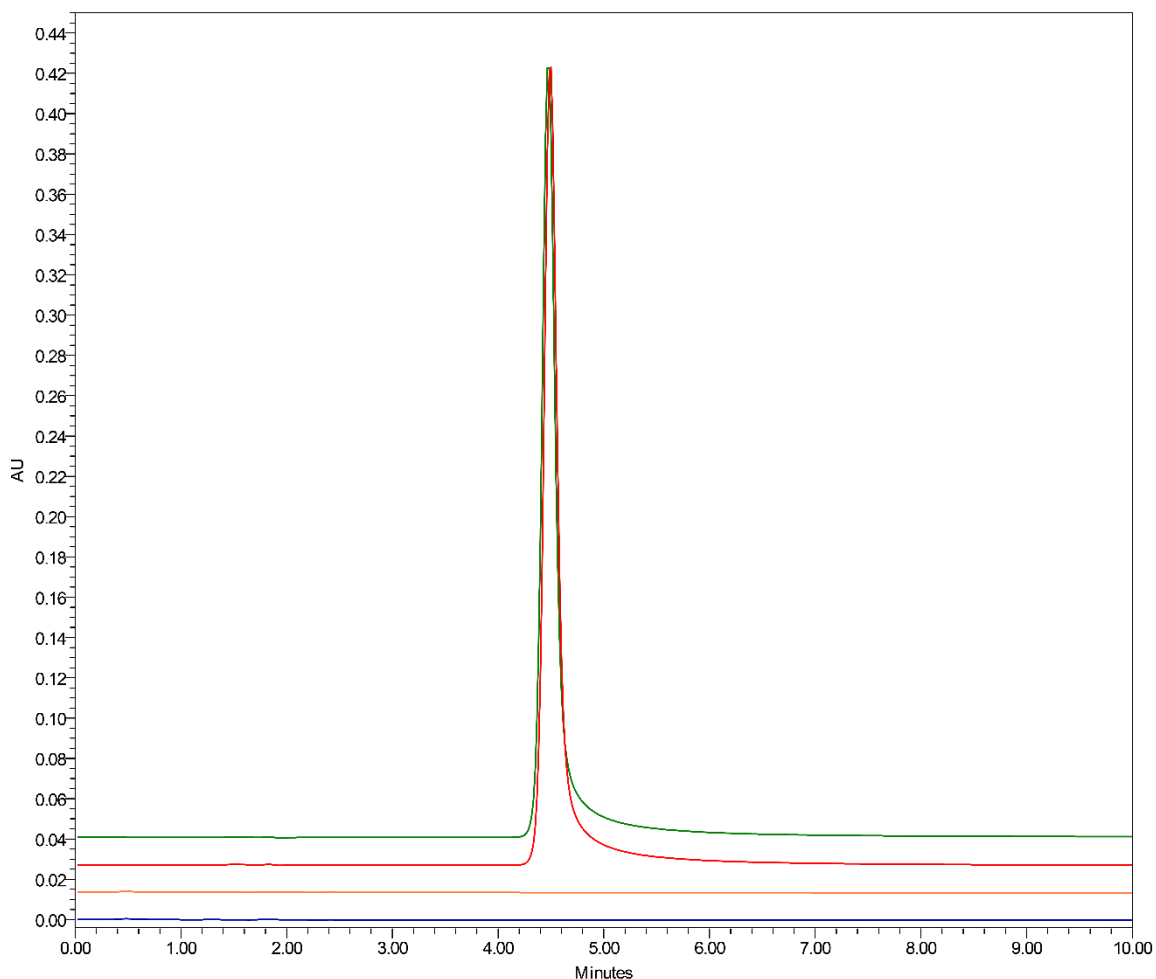
Во Табела 5 се прикажани ретенциското време и AUC за пикот на мелоксикам во хроматограмите добиени од стандардниот раствор и примерокот за анализа, при воспоставените хроматографски услови. Во хроматограмите од растворувачот и плацебо растворот не беше детектиран пик на ретенциското време карактеристично за мелоксикам.

Табела 5 Резултати за параметарот специфичност

Table 5 Results for the specificity parameter

Хроматограми	Ретенциско време на мелоксикам (min)	AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
Растворувач	/	/
Плацебо раствор	/	/
Стандарден раствор	4,494	3753008
Примерок за анализа	4,475	3642278

Преклопените хроматограми, прикажани на Слика 11, дополнително ја потврдуваат специфичноста на аналитичкиот метод.



Слика 11 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор**, **стандарден раствор** и **примерок за анализа**

Figure 11 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, **standard solution**, and **sample solution**

При определување на **линеарноста** и, следствено, **опсегот на аналитичкиот метод**, беше подготвен стандарден раствор во работната концентрација, согласно пропишаниот метод за подготовка. Останатите концентрации беа добиени со соодветни разредувања од еден заеднички основен раствор. На тој начин се обезбедија раствори со концентрации што се во директна корелација со работната концентрација и го опфаќаат потребниот минимален опсег на методот.

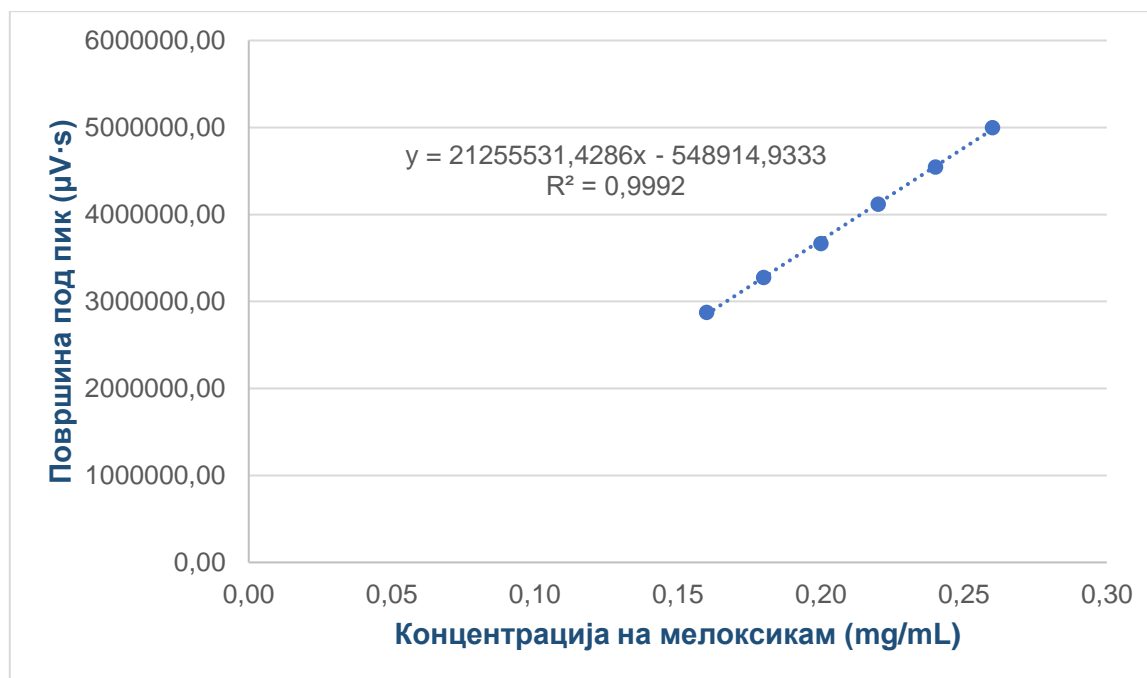
Конкретно, беа подготвени шест стандардни раствори (80–130% од работната концентрација). За секое концентрациско ниво беа изведени по три инјектирања, при што од добиените вредности за AUC беше пресметана средната вредност.

Табела 6 Резултати за параметарот линеарност

Table 6 Results for the linearity parameter

Концентрација (mg/mL), ниво (%)	Ред. бр. на инјектирање	AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Средна вредност од AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
0,16 mg/mL, 80%	1	2877994	2877405
	2	2890347	
	3	2863875	
0,18 mg/mL, 90%	1	3266302	3276284
	2	3270422	
	3	3292129	
0,20 mg/mL, 100%	1	3683516	3667858
	2	3686806	
	3	3627252	
0,22 mg/mL, 110%	1	4101733	4119710
	2	4117015	
	3	4140383	
0,24 mg/mL, 120%	1	4527205	4546609
	2	4555282	
	3	4557339	
0,26 mg/mL, 130%	1	5027853	5000614
	2	5036483	
	3	4937507	

Врз основа на средните вредности за AUC за секое концентрациско ниво беше спроведена регресиона анализа со методот на најмали квадрати. На Слика 12 е прикажана зависноста помеѓу концентрацијата на мелоксикам и одговорот на детекторот (AUC), при што беше утврдена равенката на регресиона права.



Слика 12 Регресиона права што ја прикажува зависноста помеѓу концентрацијата на мелоксикам и површината под пикот

Figure 12 Regression line showing the relationship between Meloxicam concentration and peak area

Точноста на аналитичкиот метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање беше оценета со подготовка на стандарден раствор и спајкувани примероци за анализа на три концентрациски нивоа: +30% (0,26 mg/mL), +50% (0,30 mg/mL) и +80% (0,36 mg/mL) од работната концентрација.

При подготовка на примероците, беше земен ист волумен од растворот на примерокот и беше извршено спајкување со познати количества мелоксикам, со цел да се добијат претходно дефинираните концентрации. За секое концентрациско ниво беа подготвени по три независни спајкувани проби, при што секоја проба беше инјектирана по еднаш.

Аналитичкиот принос на мелоксикам во спајкуваните проби беше пресметан со помош на еден стандарден раствор, подготвен во работната концентрација. Имено, од стандардниот раствор беа изведени три последователни инјектирања, а како референтна вредност беше земена средната вредност за AUC од трите инјектирања. Потоа, за секоја проба беше пресметан аналитичкиот принос, а за секое концентрациско ниво беа пресметани средната вредност и RSD за аналитичките приноси.

Табела 7 Резултати за параметарот точност

Table 7 Results for the accuracy parameter

+30%		+50%		+80%	
Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)
1	101,12	1	100,60	1	101,12
2	101,29	2	100,75	2	101,97
3	101,37	3	101,37	3	101,76
\bar{X}	101,26	\bar{X}	100,91	\bar{X}	101,62
RSD (%)	0,13	RSD (%)	0,40	RSD (%)	0,43

Според ICH Q2(R2), при определување на содржината на API во готов фармацевтски производ, **прецизноста на аналитичкиот метод** се оценува на две нивоа: повторливост и интермедиерна прецизност.

За оценка на повторливоста беше подготвен стандарден раствор во работната концентрација, согласно пропишаниот метод за подготовка. Потоа беа изведени шест последователни инјектирања, по што беа пресметани средната вредност и RSD за AUC.

Табела 8 Резултати за параметарот повторливост**Table 8** Results for the repeatability parameter

Реплика	AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
1	3642278
2	3742671
3	3735869
4	3718410
5	3662215
6	3726606
\bar{X}	3704675
RSD (%)	1,13

Интермедиерната прецизност беше оценета во ист ден, во иста лабораторија, од страна на два аналитичари. Секој аналитичар подготви по два стандардни раствори и по шест примероци за анализа во работната концентрација, согласно пропишаните методи за подготовка.

Од секој стандарден раствор беа изведени по три последователни инјектирања, а при определувањето на содржината на мелоксикам во примероците за анализа, како референтна вредност беше земена средната вредност за AUC од трите инјектирања.

Понатаму, за резултатите добиени од секој аналитичар поединечно, најпрво беа пресметани средната вредност, SD и RSD и s^2 од содржината, при што за секој примерок беше земена средната вредност добиена со квантификација според првиот и вториот стандарден раствор.

Табела 9 Резултати од Аналитичар 1 за параметарот интермедиерна прецизност**Table 9** Results from Analyst 1 for the intermediate precision parameter

Примерок за анализа	AUC ($\mu V \cdot s$) од примерок за анализа	Содржина (%) според стандарден раствор 1	Содржина според стандарден раствор 2	Средна вредност од содржина (%)
1	3710583	99,56	99,20	99,38
2	3749408	100,60	100,23	100,42
3	3842203	103,09	102,72	102,90
4	3817935	102,44	102,07	102,25
5	3845451	103,18	102,80	102,99
6	3704720	99,40	99,04	99,22
\bar{X}				101,19
SD				1,74
RSD (%)				1,72
s^2				3,01

Табела 10 Резултати од Аналитичар 2 за параметарот интермедиерна прецизност**Table 10** Results from Analyst 2 for the intermediate precision parameter

Примерок за анализа	AUC ($\mu V \cdot s$) од примерок за анализа	Содржина (%) според стандарден раствор 1	Содржина (%) според стандарден раствор 2	Средна вредност од содржина (%)
1	3642278	98,33	100,06	99,19
2	3742671	101,04	102,81	101,92
3	3735869	100,85	102,63	101,74
4	3718410	100,38	102,15	101,26
5	3662215	98,86	100,60	99,73
6	3726606	100,60	102,37	101,49
\bar{X}				100,89
SD				1,14
RSD (%)				1,13
s^2				1,30

Конечно, беше пресметана вредноста на комбинираната RSD, земајќи ги предвид комбинираната средна вредност и вредноста на комбинираната SD. Притоа, комбинираната средна вредност за содржината на мелоксикам во примероците за анализа изнесуваше 101,04%, вредноста на комбинираната SD 1,41, додека вредноста на комбинираната RSD изнесуваше 1,39%.

Робусноста на аналитичкиот метод беше определена со OFAT пристап, преку последователни мали промени на поединечните услови на методот и следење на влијанието врз параметрите за соодветност на систем. Како критични услови беа разгледани: протокот на мобилната фаза, односот на компонентите во мобилната фаза и рН-вредноста на мобилната фаза. Ефектот од промените беше оценет преку следење на три параметри за соодветност на систем: k' , A_s и N .

За таа цел беше подготвен стандарден раствор во работната концентрација, согласно пропишаниот метод за подготовка. Потоа беа изведени по три последователни инјектирања од стандардниот раствор за секој од променетите услови на методот.

Протокот на мобилната фаза беше променет за $\pm 0,2$ mL/min во однос на работниот проток (1,5 mL/min), односно беа разгледани два случаи, кога протокот е 1,3 mL/min и кога истиот е 1,7 mL/min.

Табела 11 Резултати за параметарот робусност (промена на проток)

Table 11 Results for the robustness parameter (change in flow rate)

Променет услов	Реплика	k'	A_s	N
1,3 mL/min	1	2,371	1,313	7075,546
	2	2,368	1,313	6998,395
	3	2,368	1,320	6986,685
RSD (%)		0,069	0,305	0,688
1,7 mL/min	1	2,298	1,287	5486,364
	2	2,295	1,285	5562,234
	3	2,294	1,286	5576,572
RSD (%)		0,100	0,093	0,875

Односот на компонентите во мобилната фаза беше променет за $\pm 5\%$ во однос на доминантната компонента (ацетонитрил) од работниот состав (60:40). Така, беа воспоставени два случаи: 55:45 и 65:35.

Табела 12 Резултати од параметарот робусност (промена на односот на компонентите на мобилната фаза)

Table 12 Results for the robustness parameter (change in mobile-phase composition ratio)

Променет услов	Репликат	k'	A_s	N
55:45	1	2,493	1,388	6883,365
	2	2,501	1,365	6923,378
	3	2,509	1,368	6906,825
RSD (%)		0,320	0,910	0,291
65:35	1	3,222	1,304	5644,213
	2	3,214	1,318	5525,244
	3	3,187	1,338	5713,004
RSD (%)		0,572	1,295	1,688

pH-вредноста на ултрачистата вода во состав на мобилната фаза беше променета за $\pm 0,2$ pH-единици во однос на работната pH-вредност (3,1). Притоа, беа воспоставени два случаи: pH = 2,9 и pH = 3,3, при што прилагодувањето на pH-вредноста во двата случаи беше изведено со глацијална оцетна киселина.

Табела 13 Резултати за параметарот робусност (промена на pH)**Table 13** Results for the robustness parameter (change in pH)

Променет услов	Репликат	k'	A_s	N
pH = 2,9	1	2,142	1,182	6292,174
	2	2,142	1,193	6308,980
	3	2,141	1,194	6278,083
RSD (%)		0,027	0,560	0,246
pH = 3,3	1	2,469	1,536	5964,647
	2	2,464	1,549	6058,946
	3	2,461	1,548	6096,781
RSD (%)		0,164	0,467	1,127

5.1.2. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод

Соодветноста на систем беше оценета преку следење на параметрите: k' , A_s и N . За таа цел беше подготвен стандарден раствор во работната концентрација, согласно пропишаниот метод на подготовка. Потоа беа изведени шест последователни инјектирања од стандардниот раствор, при што за секое инјектирање беа определени параметрите за соодветност на систем.

Табела 14 Резултати за соодветност на систем**Table 14** System suitability results

Репликат	k'	A_s	N
1	7,801	1,233	6399,015
2	7,807	1,233	6333,210
3	7,814	1,236	6244,254
4	7,818	1,226	6242,267
5	7,822	1,221	6304,205
6	7,828	1,230	6364,568
RSD (%)			
	0,126	0,447	1,008

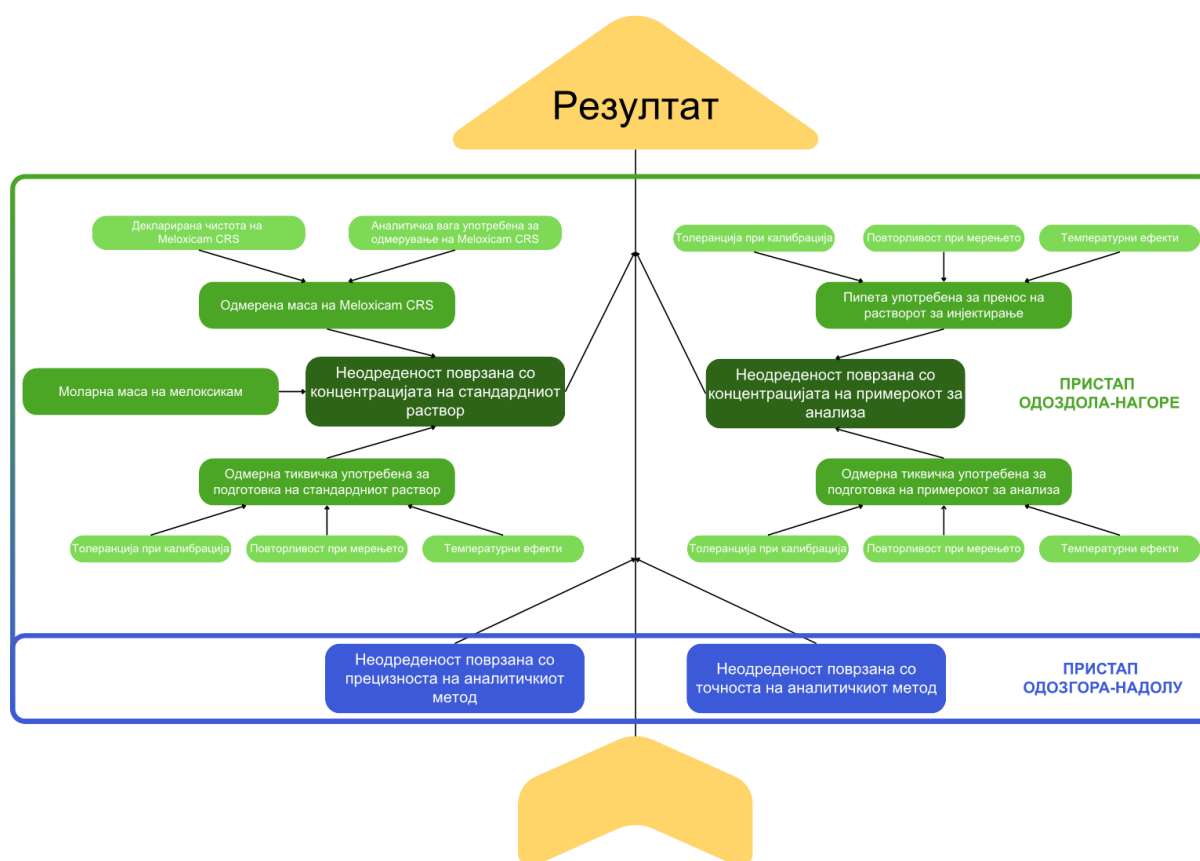
5.1.3. Проценка на мерната неодреденост

5.1.3.1. Идентификација на мерената величина

Во согласност со првиот чекор при проценката на мерната неодреденост, мерената величина беше дефинирана како концентрација на мелоксикам во раствор за инјектирање, изразена во mg/mL.

5.1.3.2. Идентификација на изворите на неодреденост

Во вториот чекор беше изработен дијаграм на причина и последица со цел систематска идентификација и визуелизација на релевантните извори на мерна неодреденост (Слика 13). Притоа, беа разграничени четири главни категории на извори, и тоа: извори поврзани со прецизноста и точноста на аналитичкиот метод, како и извори поврзани со концентрацијата на стандардниот раствор и концентрацијата на примерокот за анализа.



Слика 13 Извори на мерна неодреденост (пристапи одоздола-нагоре и одозгора-надолу)

Figure 13 Sources of measurement uncertainty (Top-down and Bottom-up approaches)

Неодреденостите поврзани со прецизноста и точноста на аналитичкиот метод беа утврдени врз основа на резултатите добиени при валидацијата на методот, поточно од експериментите за интермедиерна прецизност и аналитички принос. Овие компоненти, како директен одраз на аналитичките перформанси на методот, беа третирани како примарни извори во рамките на пристапот одозгора-надолу.

Пристапот одоздола-нагоре ги опфаќа истите извори, но концептот дополнително го проширува преку идентификација на поединечни придонеси што произлегуваат од подготовката на растворите и директно влијаат врз нивната концентрација. Во тој контекст, при проценка на неодреденоста поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор беа земени предвид придонесите од одмерената маса на Meloxicam CRS (вклучувајќи ја декларираната чистота и перформансите на аналитичката вага), одмерната тиквичка употребена за негова подготовка (со влијание на толеранцијата при калибрација, повторливоста при мерењето и температурните ефекти), како и моларната маса на мелоксикам. Кај концентрацијата на примерокот за анализа, мерната неодреденост во најголем дел произлегува од одмерните садови што се користат при неговата подготовка, односно од пипетата и одмерната тиквичка, при што беа земени предвид толеранцијата при калибрација, повторливоста при мерењето и температурните ефекти.

Потоа, идентификуваните извори на мерна неодреденост (Слика 13) беа вклучени во чекорот за квантификација, врз основа на кој беа пресметани комбинираната стандардна и проширената неодреденост.

5.1.3.3. Квантификација на неодреденоста

Квантификацијата на мерната неодреденост според пристапот одозгора-надолу започнува со анализа на резултатите за интермедиерна прецизност, прикажани во Табели 9 и 10. Во овие табели се сумирани вредностите добиени од двата аналитичари при определувањето на содржината на мелоксикам во подготвените примероци за анализа. Средната вредност кај првиот аналитичар изнесува 101,19%, а кај вториот 100,89%. Притоа, вредностите на RSD изнесуваат 1,72% и 1,13%, а варијансите (s^2) изнесуваат 3,01 и 1,30, соодветно.

Врз основа на истите податоци, најпрво беа определени вредностите на RSD_{BR} и RSD_{WR} , кои во конкретниот случај изнесуваат 1,39% и 1,13%. Ако се земе предвид дека станува збор за две независни серии ($k = 2$), а во рамките на

секоја серија биле изведени по шест анализи ($n = 6$), тогаш со замена на овие вредности во Равенка 7 се добива 1,035% (0,01035) како релативна стандардна неодреденост поврзана со прецизноста.

Понатаму, со комбинирање на резултатите добиени од двата аналитичари, беше пресметана средната вредност за содржината на мелоксикам во примероците за анализа, која изнесува 101,04%. Оттука, имајќи предвид дека една дозирана единица содржи 15,00 mg мелоксикам во 1,5 mL раствор за инјектирање (100%), средната вредност за содржината на мелоксикам по дозирана единица изнесува 15,156 mg. Со замена на оваа вредност во Равенка 8 се добива 0,157 mg како апсолутна стандардна неодреденост поврзана со прецизноста.

Потоа, за квантификација на неодреденоста поврзана со точноста, беа земени предвид резултатите од определувањето на аналитичкиот принос. Со оглед на тоа што на секое концентрациско ниво биле изведени по три независни анализи, вкупниот број на анализи изнесува 9 ($n = 9$). Поединечните вредности за аналитичкиот принос на трите концентрациски нивоа се движат во интервал од 100,60% до 101,97%, при што средната вредност изнесува 101,26%, а комбинираната SD 0,435. Со замена на овие вредности во Равенка 9 се добива 0,00145 како стандардна неодреденост поврзана со аналитичкиот принос.

За да се утврди дали средната вредност за аналитичкиот принос статистички значајно отстапува од целната вредност (100%), беше применет Student-овиот t-тест. Притоа, најпрво беше пресметана t-вредноста, земајќи ги предвид средната вредност за аналитичкиот принос (101,26%) и стандардната неодреденост поврзана со аналитичкиот принос (0,00145), по што добиената вредност беше споредена со критичната t-вредност од статистичките табели за еднострано тестирање при избраното ниво на значајност ($\alpha = 0,05$) и осум степени на слобода ($df = 8$) (Miller & Miller, 2010).

Бидејќи пресметаната t-вредност (8,69) е поголема од критичната t-вредност (2,31), може да се заклучи дека средната вредност за аналитичкиот принос статистички значајно отстапува од 100%, што укажува на присуство на пристрасност. Следствено, за пресметка на стандардната неодреденост поврзана со пристрасноста беше применета Равенка 10, при што b_i го претставува отстапувањето на поединечните вредности за аналитичкиот принос од нивната средна вредност.

Табела 15 Пресметка на b_i и b_i^2 Table 15 Calculation of b_i and b_i^2

b_i	b_i^2
0,0014	0,00000196
-0,0003	0,00000009
-0,0011	0,00000121
0,0066	0,00004356
0,0051	0,00002601
-0,0011	0,00000121
0,0014	0,00000196
-0,0071	0,00005041
-0,0050	0,00002500

Збирот на квадратите на отстапувањата изнесува 0,00015141, при што со замена на оваа вредност во Равенка 10 се добива 0,0041 како стандардна неодреденост поврзана со пристрасноста.

Квантификацијата на мерната неодреденост според пристапот одоздола-нагоре започнува со определување на неодреденоста поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор. Најпрво беше оценет придонесот од одмерената маса на Meloxicam CRS.

При калибрација на аналитичката вага со сертифицирани тегови беше добиена проширена неодреденост од 0,0533 mg. Стандардната неодреденост поврзана со аналитичката вага беше пресметана со примена на фактор на покриеност $k = 2$ врз проширената неодреденост, при што се добива 0,0267 mg. Оттука, релативната стандардна неодреденост беше пресметана како однос помеѓу стандардната неодреденост (0,0267 mg) и одмерената маса на Meloxicam CRS (20,14 mg), при што се добива 0,00133.

Декларираната чистота на Meloxicam CRS (99,00% \pm 0,08%, $k = 2$) беше преземена од сертификатот за анализа. Стандардната неодреденост поврзана со чистотата беше пресметана со примена на фактор на покриеност $k = 2$ врз проширената неодреденост (0,08%), при што се добива 0,04%. Потоа, релативната стандардна неодреденост беше пресметана како однос помеѓу стандардната неодреденост (0,04%) и декларираната чистота (99,00%), при што се добива 0,000404.

Со комбинирање на придонесите од аналитичката вага и декларираната чистота, релативната стандардна неодреденост поврзана со одмерената маса на Meloxicam CRS беше пресметана со примена на RSS методот, односно:

$$\frac{u(m_{\text{Standard}})}{m_{\text{Standard}}} = \sqrt{(0,00133)^2 + (0,000404)^2} = 0,00139$$

Следствено, за одмерена маса од 20,14 mg, оваа релативна стандардна неодреденост соодветствува на стандардна неодреденост од 0,028 mg.

Дополнително влијание врз неодреденоста поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор има и одмерната тиквичка употребена за негова подготовка, со номинален волумен од 100,0 mL и толеранција $\pm 0,1$ mL на 20 °C. Бидејќи не беа достапни податоци за факторот на покриеност и нивото на доверба, неодреденоста поврзана со толеранцијата при калибрација беше моделирана со триаголна распределба, при што стандардната неодреденост изнесува 0,0408 mL.

Стандардната неодреденост поврзана со повторливоста при мерењето беше оценета врз основа на десет повторени мерења на масата на метанолот, при што волуменот на метанолот беше определен преку неговата густина. Следствено, стандардната неодреденост поврзана со повторливоста при мерењето изнесува 0,0444 mL.

Потенцијалната промена на волуменот поради температурна варијација (± 4 °C), при примена на волуметрискиот температурен коефициент на експанзија на метанолот ($0,00149$ °C⁻¹), изнесува 0,596 mL. Оттука, неодреденоста поврзана со температурните ефекти беше моделирана со правоаголна распределба во температурниот интервал 16–24 °C, при што стандардната неодреденост изнесува 0,344 mL.

Со комбинирање на придонесите од калибрацијата, повторливоста и температурата, комбинираната стандардна неодреденост поврзана со одмерната тиквичка беше пресметана со примена на RSS методот, при што се доби вредност од 0,349 mL. Следствено, релативната стандардна неодреденост поврзана со волуменот на стандардниот раствор беше определена како однос помеѓу комбинираната стандардна неодреденост (0,349 mL) и номиналниот волумен (100,0 mL), односно:

$$\frac{u(V_{\text{Standard}})}{V_{\text{Standard}}} = \frac{0,349 \text{ mL}}{100,0 \text{ mL}} = 0,00349$$

Следејќи ја воспоставената методологија, како дополнителен придонес кон неодреденоста на концентрацијата на стандардниот раствор беше земена предвид и неодреденоста поврзана со моларната маса на мелоксикам. Како што е прикажано во Табела 16, таа беше проценета со користење на атомските маси и придружните стандардни неодредености за секој од составните хемиски елементи во молекулата.

Табела 16 Атомски маси и елементарни стандардни неодредености на елементите во молекулата на мелоксикам

Table 16 Atomic weights and elemental standard uncertainties of the elements in the Meloxicam molecule

Елемент	Максимална атомска маса	Минимална атомска маса	Средна вредност	Опсег (\pm)	Елементарна стандардна неодреденост
<i>Јаглерод</i> (C)	12,0116	12,0096	12,0106	$\pm 0,001$	0,000577
<i>Водород</i> (H)	1,00811	1,00784	1,007975	$\pm 0,000135$	0,0000779
<i>Азот</i> (N)	14,00728	14,00643	14,006855	$\pm 0,000425$	0,000245
<i>Кислород</i> (O)	15,99977	15,99903	15,9994	$\pm 0,00037$	0,000214
<i>Сулфур</i> (S)	32,076	32,059	32,0675	$\pm 0,0085$	0,00491

Врз основа на податоците во Табела 16, моларната маса на мелоксикам изнесува 351,405 g/mol. Како што е прикажано во Табела 17, во следниот чекор, најпрво беа пресметани варијансите поврзани со елементарните стандардни неодредености (u^2), по што секоја варијанса беше помножена со бројот на атоми (n) на соодветниот елемент во молекулата. На тој начин беа определени поединечните придонеси на елементите кон вкупната варијанса на моларната маса.

Табела 17 Придонес на елементарните стандардни неодредености кон стандардната неодреденост на моларната маса на мелоксикам

Table 17 Contribution of elemental standard uncertainties to the standard uncertainty of the molar mass of Meloxicam

Елемент	Број на атоми (n)	Елементарна стандардна неодреденост (u)	u^2	$n \cdot u^2$
Јаглерод (C)	14	0,000577	0,000000333	0,00000466
Водород (H)	13	0,0000779	0,0000000607	0,000000789
Азот (N)	3	0,000245	0,00000006	0,00000018
Кислород (O)	4	0,000214	0,0000000458	0,000000183
Сулфур (S)	2	0,00491	0,0000241	0,0000482

Добиените придонеси беа сумирани и комбинирани со примена на RSS методот, при што за комбинираната варијанса беше добиена вредност од 0,0000533, а за стандардната неодреденост вредност од 0,0073 g/mol. Следствено, релативната стандардна неодреденост на моларната маса на мелоксикам беше пресметана на следниов начин:

$$\frac{u(M_{\text{Meloxicam}})}{M_{\text{Meloxicam}}} = \frac{0,0073 \text{ g/mol}}{351,405 \text{ g/mol}} = 0,0000208$$

Релативната стандардна неодреденост поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор беше пресметана земајќи ги предвид придонесите од одмерената маса на Meloxicam CRS, одмерната тиквичка употребена за подготовка на стандардниот раствор и моларната маса на мелоксикам, со примена на RSS методот, односно:

$$\frac{u(C_{\text{Standard}})}{C_{\text{Standard}}} = \sqrt{(0,00139)^2 + (0,00349)^2 + (0,0000208)^2} = 0,00375$$

Оттука, концентрацијата на стандардниот раствор беше пресметана на следниов начин:

$$C_{\text{Standard}} = \frac{20,14 \text{ mg} \times 0,99}{100,0 \text{ mL}} = 0,199386 \text{ mg/mL}$$

На крај, апсолутната стандардна неодреденост поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор беше определена како производ од концентрацијата на стандардниот раствор и соодветната релативна стандардна неодреденост, при што беше добиена вредност од 0,000748 mg/mL.

Освен неодреденоста поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор, пристапот одоздола-нагоре опфаќа и определување на неодреденоста поврзана со концентрацијата на примерокот за анализа. На оваа компонента влијае одмерната опрема употребена при подготовката на примерокот, односно пипетата за пренос на растворот за инјектирање со номинален волумен од 1,0 mL (толеранција $\pm 0,006$ mL на 20 °C) и одмерната тиквичка со номинален волумен од 50,0 mL (толеранција $\pm 0,06$ mL на 20 °C).

Со примена на истиот статистички пристап како и при проценката на неодреденоста поврзана со концентрацијата на стандардниот раствор, за комбинираниите стандардни неодредености се добија вредности од 0,0177 mL за пипетата и 0,182 mL за одмерната тиквичка. Следствено, релативните стандардни неодредености изнесуваат 0,0177 и 0,00364, соодветно.

Понатаму, релативната стандардна неодреденост поврзана со концентрацијата на примерокот за анализа беше пресметана земајќи ги предвид придонесите од двата одмерни сада, со примена на RSS методот, при што се доби вредност од 0,0181. Оттука, за работна концентрација од 0,20 mg/mL, апсолутната стандардна неодреденост изнесува 0,00362 mg/mL.

5.1.3.4. Пресметка на комбинираната стандардна и проширена неодреденост

Во рамките на пристапот одозгора-надолу, комбинираната стандардна неодреденост, која ги опфаќа придонесите од прецизноста и пристрасноста, беше пресметана со примена на Равенка 11, при што се доби вредност од 0,0111 (1,11%). Потоа, со примена на Равенка 13 и фактор на покриеност $k = 2$ (ниво на доверба 95%), за проширената неодреденост се доби вредност од 0,336 mg. Бидејќи средната вредност за аналитичкиот принос статистички значајно отстапуваше од целната вредност, беше извршена корекција земајќи ја предвид утврдената пристрасност, при што конечната средна вредност за содржината на мелоксикам изнесуваше 14,967 mg.

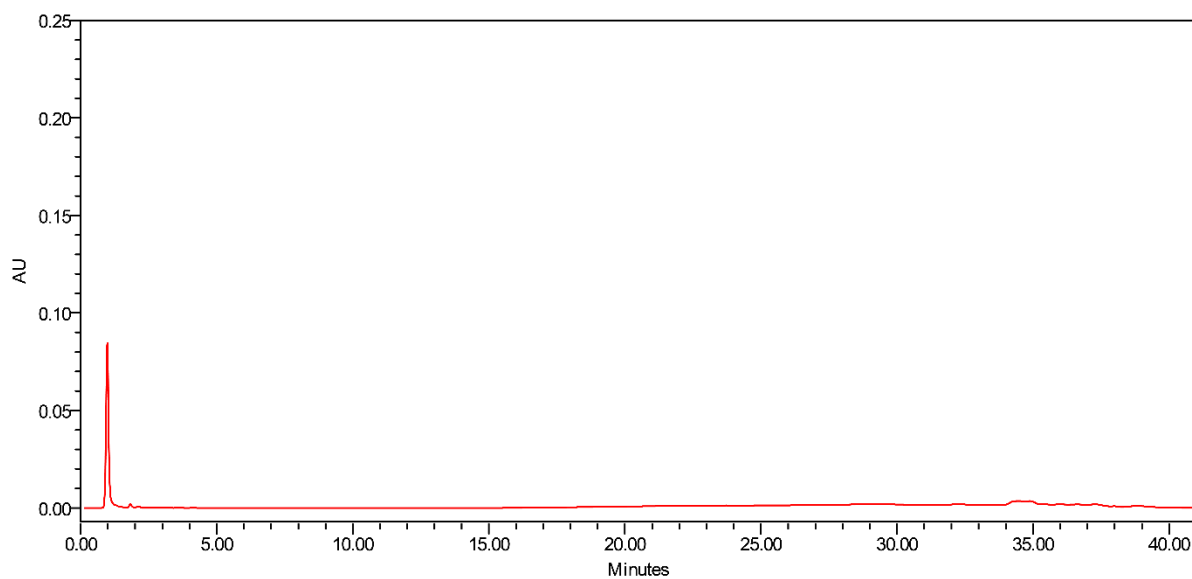
Во рамките на пристапот одоздола-нагоре, во пресметката беа вклучени сите релевантни придонеси, односно неодреденостите поврзани со концентрацијата на стандардниот раствор и примерокот за анализа, како и придонесите од прецизноста и пристрасноста на методот. Комбинираната стандардна неодреденост беше пресметана со примена на Равенка 12, при што се доби вредност од 0,02156 (2,156%). Со примена на Равенка и фактор на покриеност $k = 2$ (ниво на доверба 95%), за проширената неодреденост се доби вредност од 0,646 mg.

5.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања

5.2.1. Валидација на аналитичкиот метод

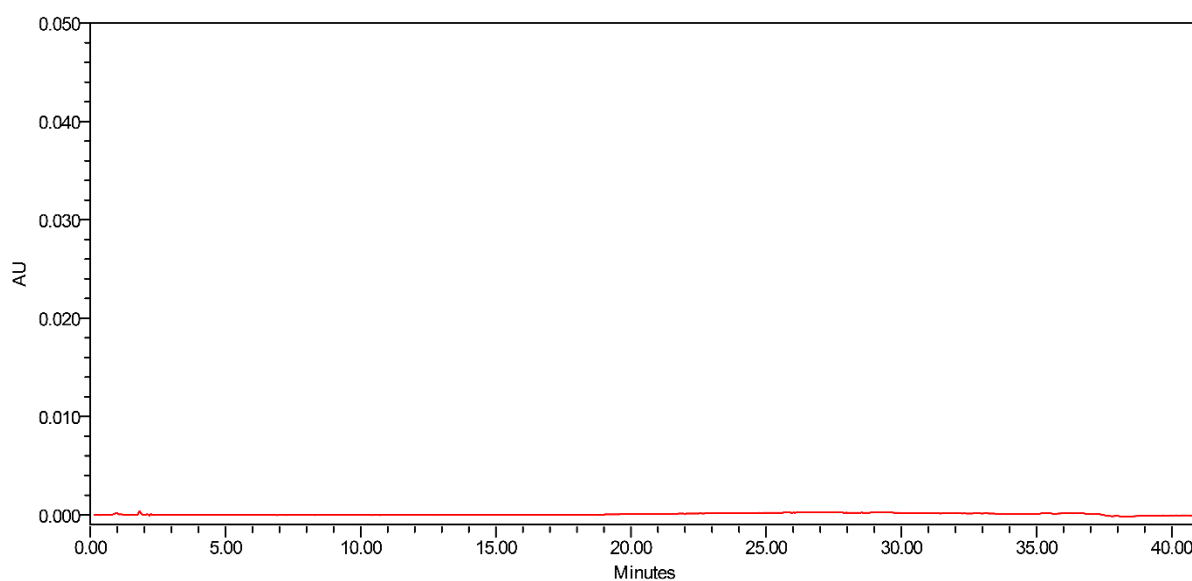
За потврда на **селективноста на аналитичкиот метод** беа анализирани репрезентативни хроматограми добиени од растворувачот, плацебо растворот, стандардниот раствор на мелоксикам и поединечните стандардни раствори на онечистувањата А, В, С и D.

Бидејќи онечистувањето В се следи на 260 nm, а мелоксикам и останатите онечистувања на 350 nm, сите хроматограми беа снимени на двете бранови должини.



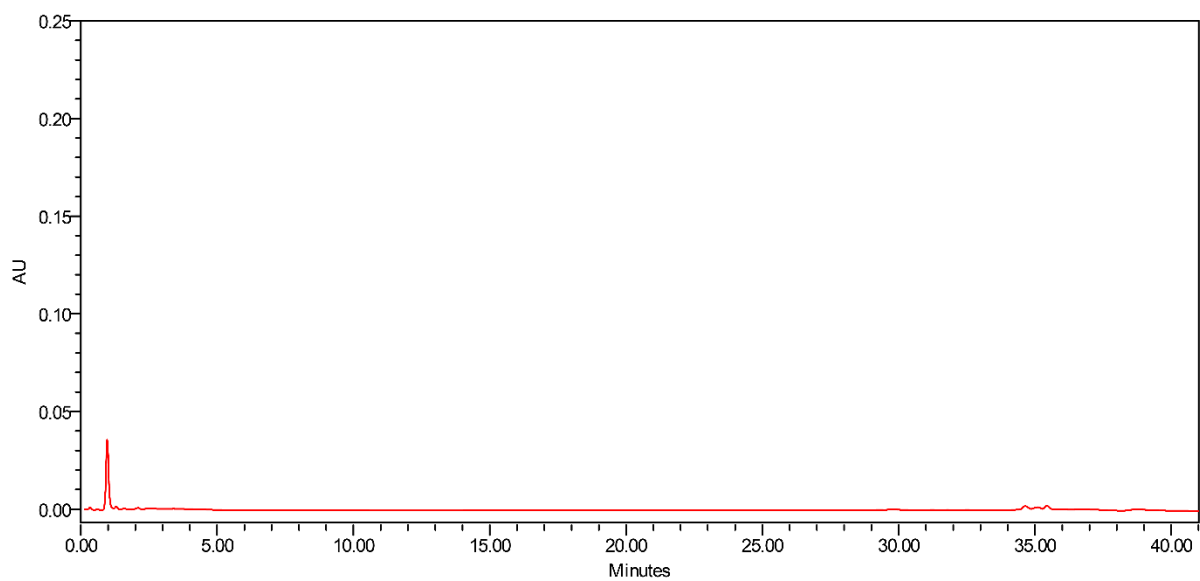
Слика 14 Хроматограм од растворувачот (260 nm)

Figure 14 Chromatogram of the solvent (260 nm)



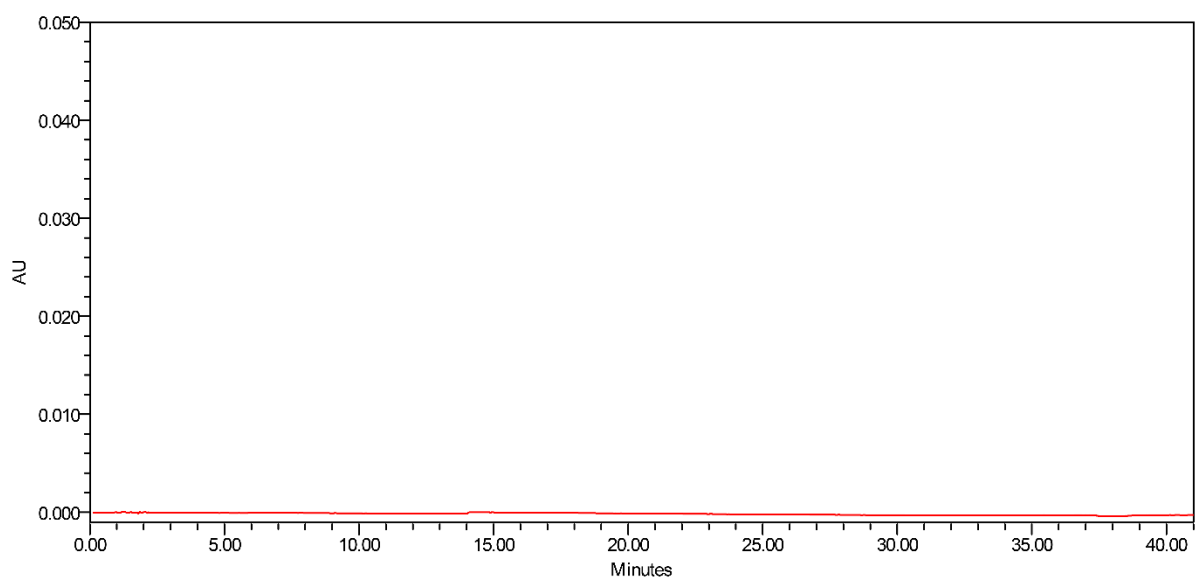
Слика 15 Хроматограм од растворувачот (350 nm)

Figure 15 Chromatogram of the solvent (350 nm)



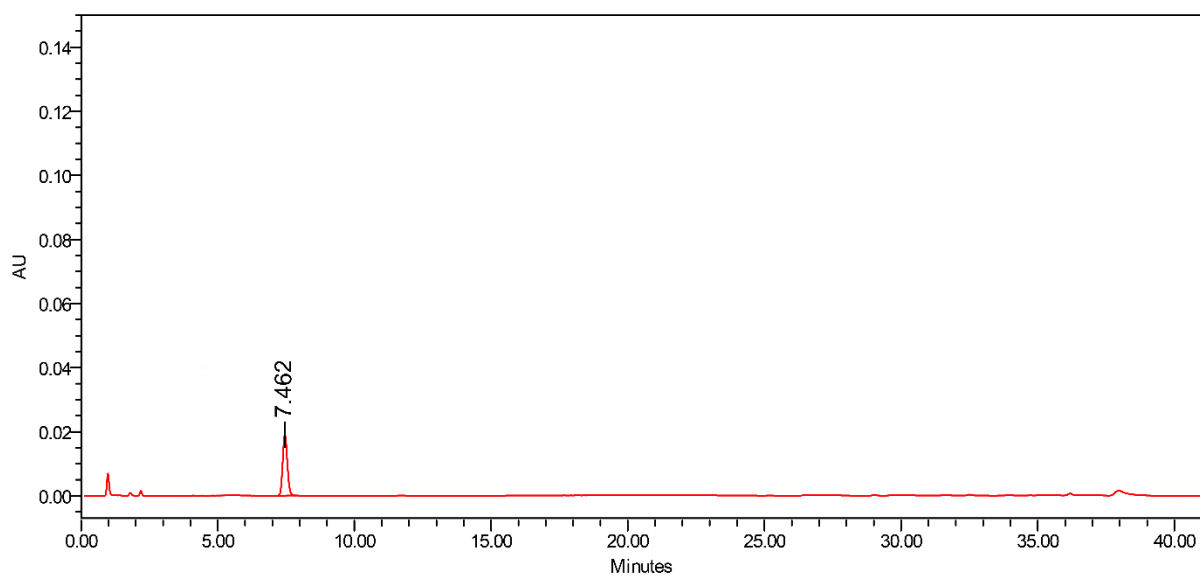
Слика 16 Хроматограм од плацебо растворот (260 nm)

Figure 16 Chromatogram of the placebo solution (260 nm)



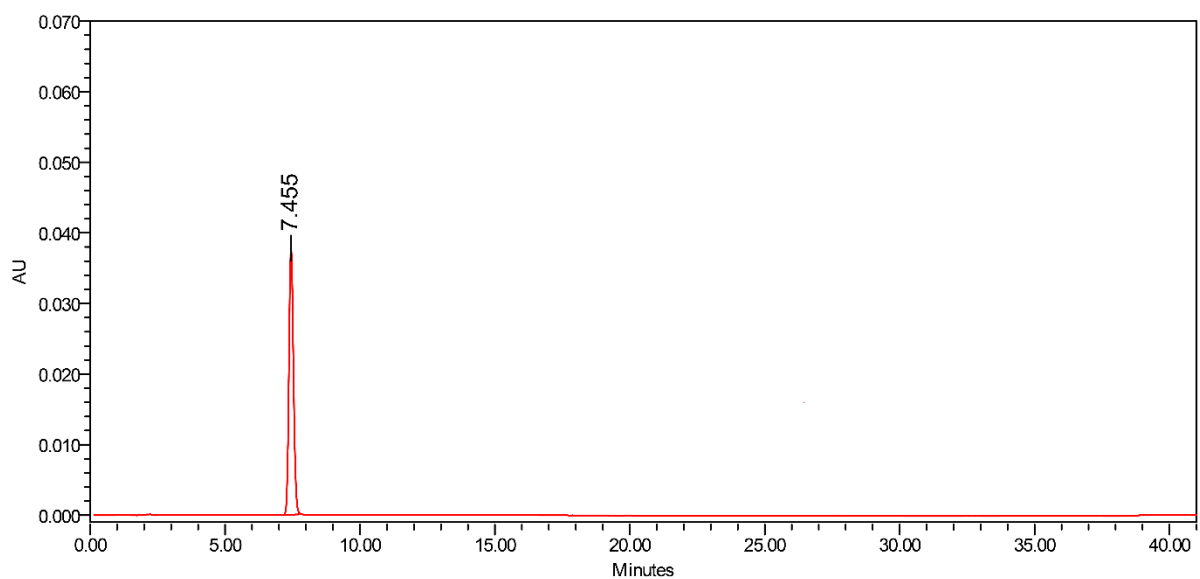
Слика 17 Хроматограм од плацебо растворот (350 nm)

Figure 17 Chromatogram of the placebo solution (350 nm)



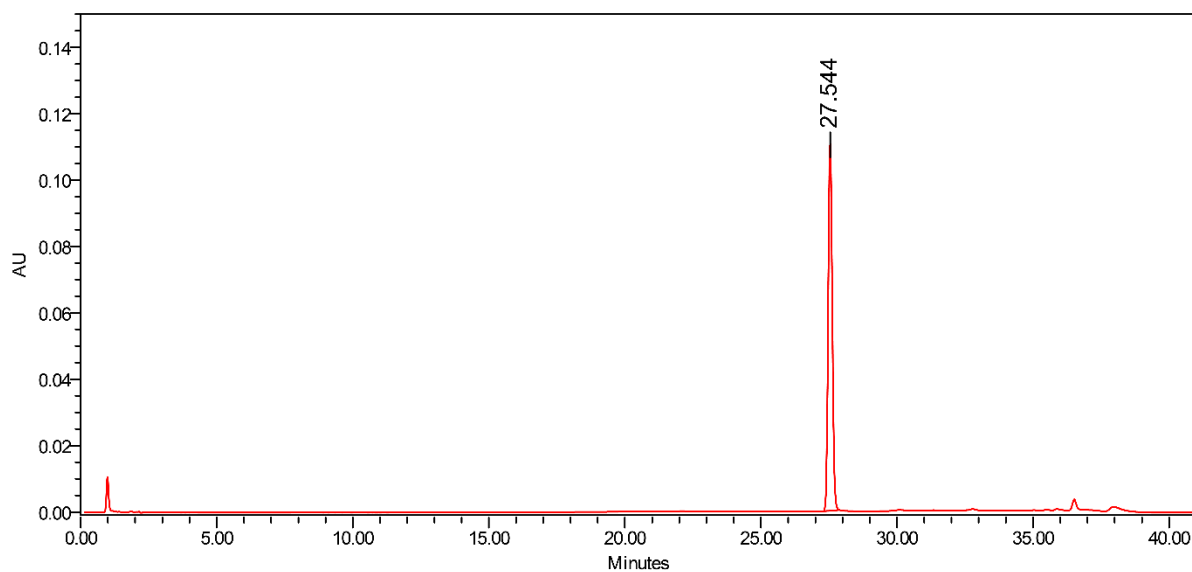
Слика 18 Хроматограм од стандардниот раствор на мелоксикам (260 nm)

Figure 18 Chromatogram of the standard solution of Meloxicam (260 nm)



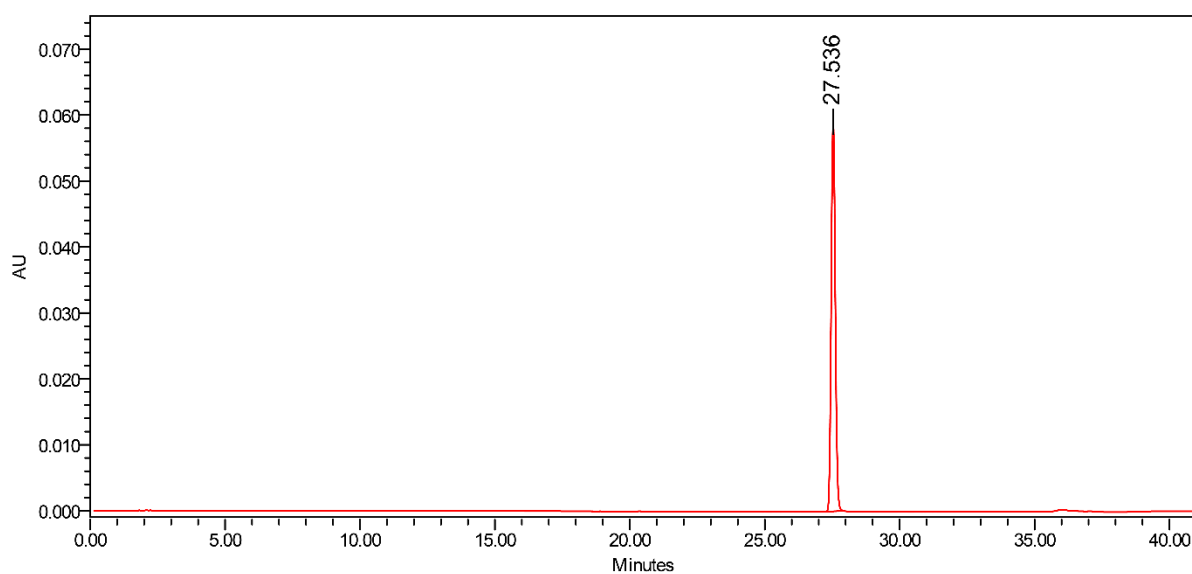
Слика 19 Хроматограм од стандардниот раствор на мелоксикам (350 nm)

Figure 19 Chromatogram of the standard solution of Meloxicam (350 nm)



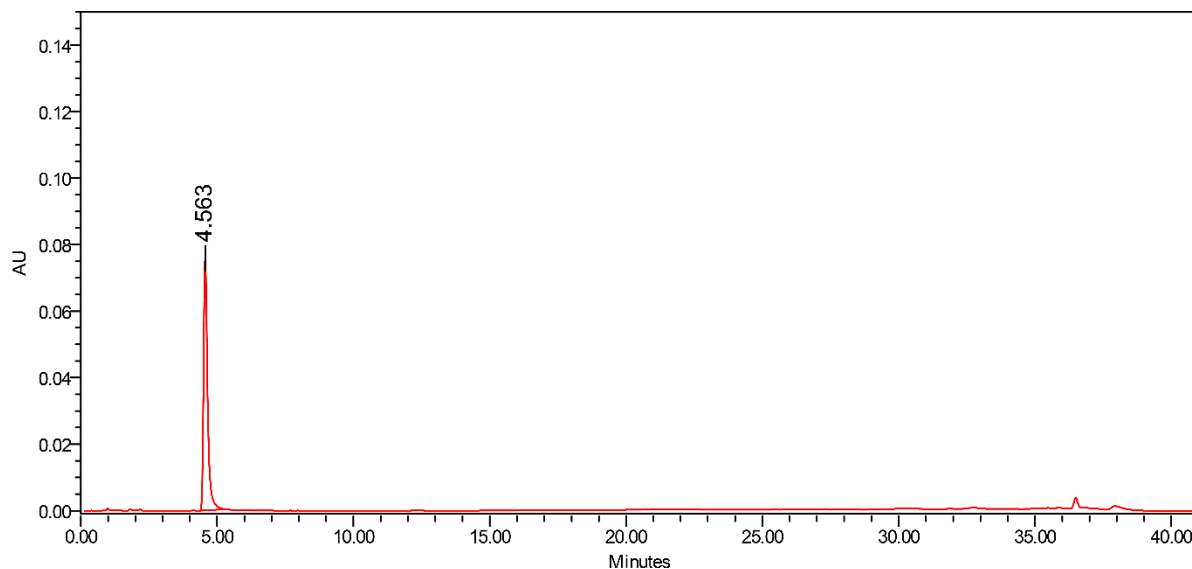
Слика 20 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување А (260 nm)

Figure 20 Chromatogram of the standard solution of Impurity A (260 nm)



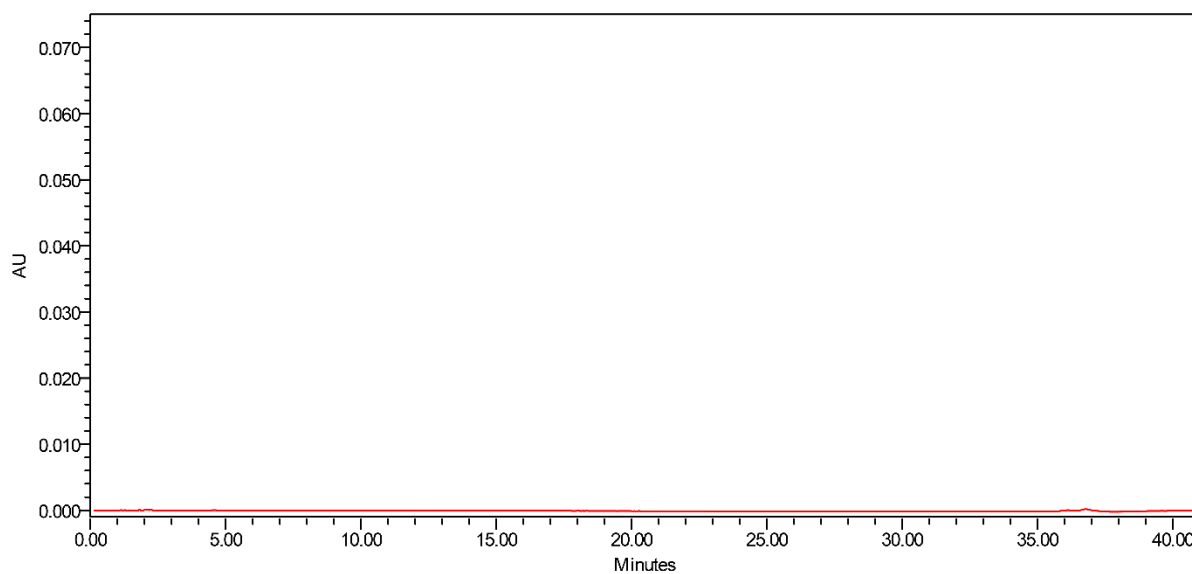
Слика 21 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување А (350 nm)

Figure 21 Chromatogram of the standard solution of Impurity A (350 nm)



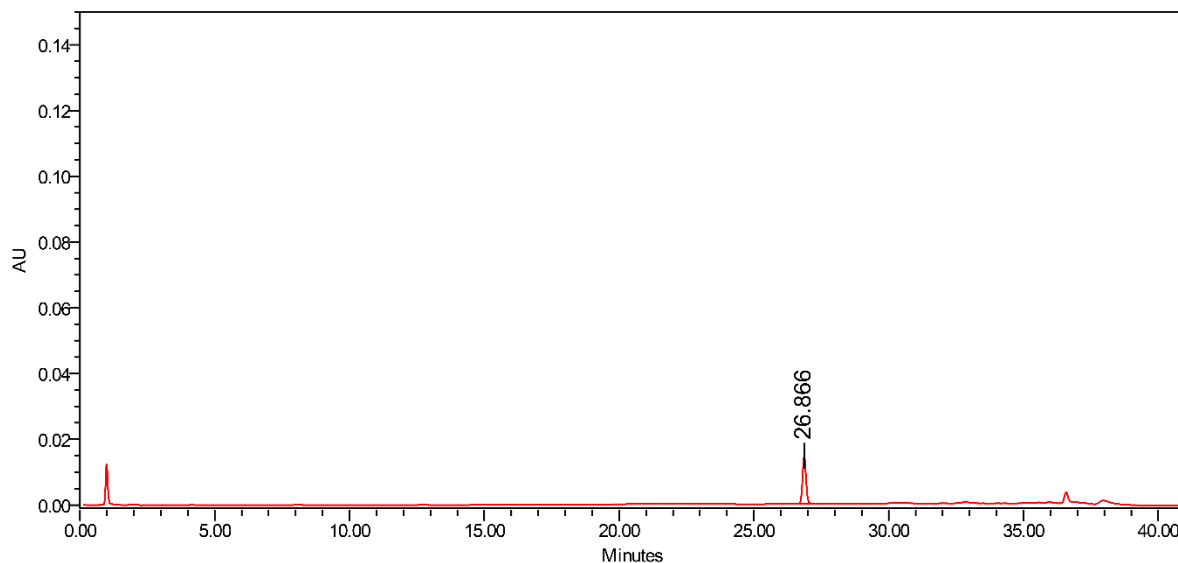
Слика 22 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување В (260 nm)

Figure 22 Chromatogram of the standard solution of Impurity B (260 nm)



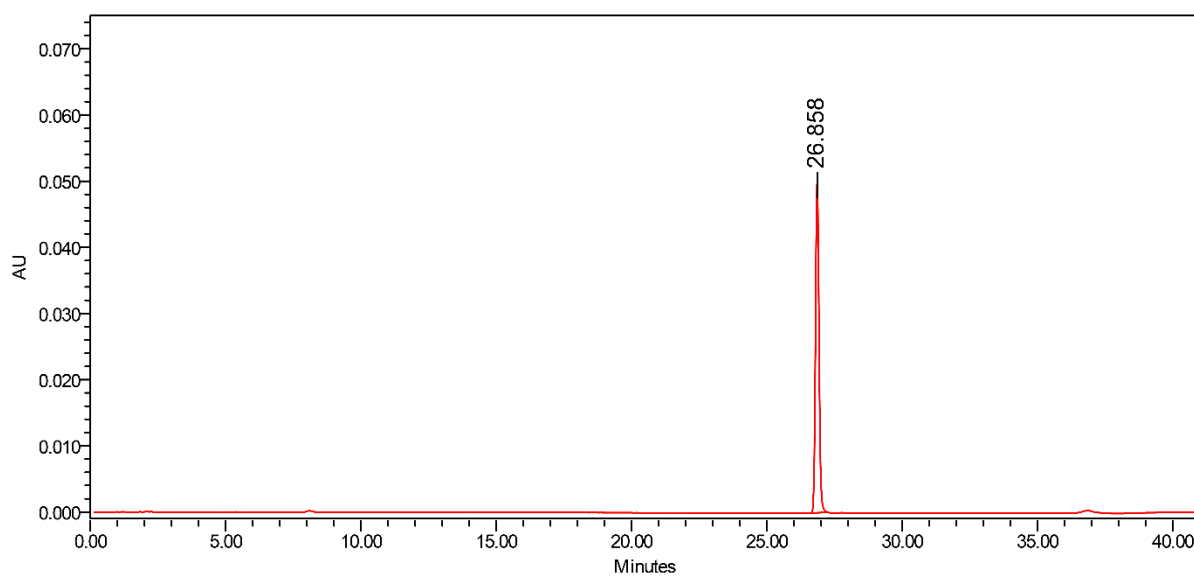
Слика 23 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување В (350 nm)

Figure 23 Chromatogram of the standard solution of Impurity B (350 nm)



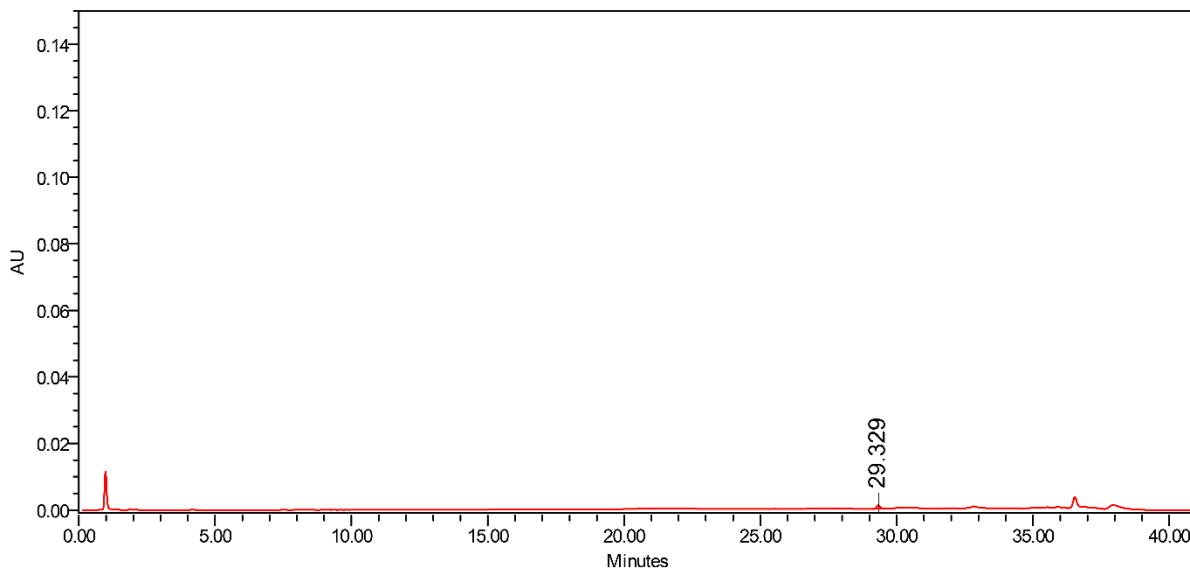
Слика 24 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување С (260 nm)

Figure 24 Chromatogram of the standard solution of Impurity C (260 nm)



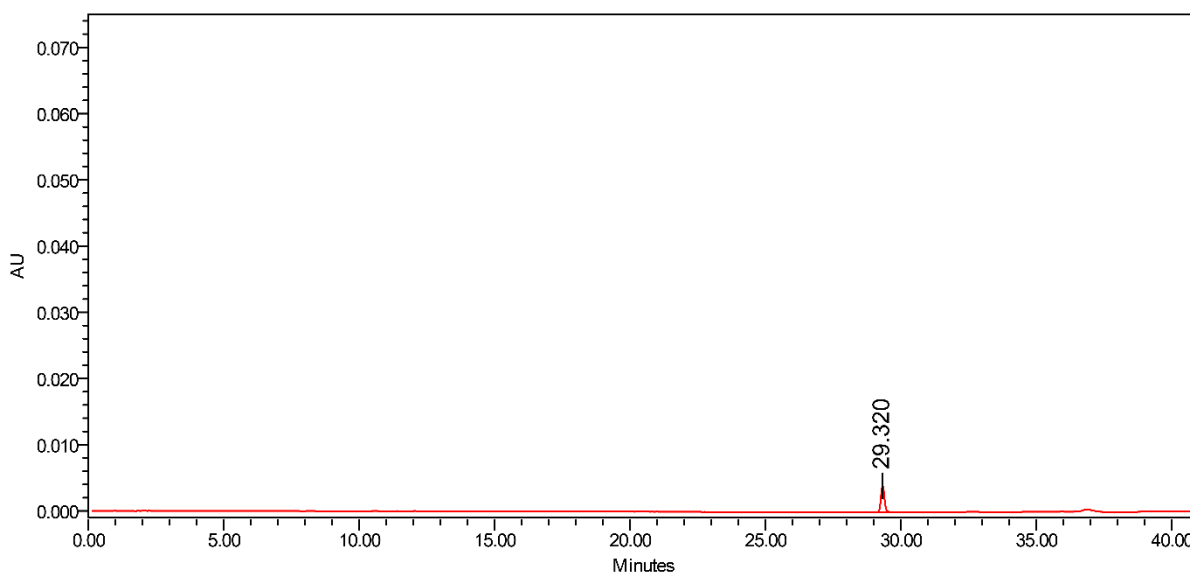
Слика 25 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување С (350 nm)

Figure 25 Chromatogram of the standard solution of Impurity C (350 nm)



Слика 26 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување D (260 nm)

Figure 26 Chromatogram of the standard solution of Impurity D (260 nm)



Слика 27 Хроматограм од стандардниот раствор на онечистување D (350 nm)

Figure 27 Chromatogram of the standard solution of Impurity D (350 nm)

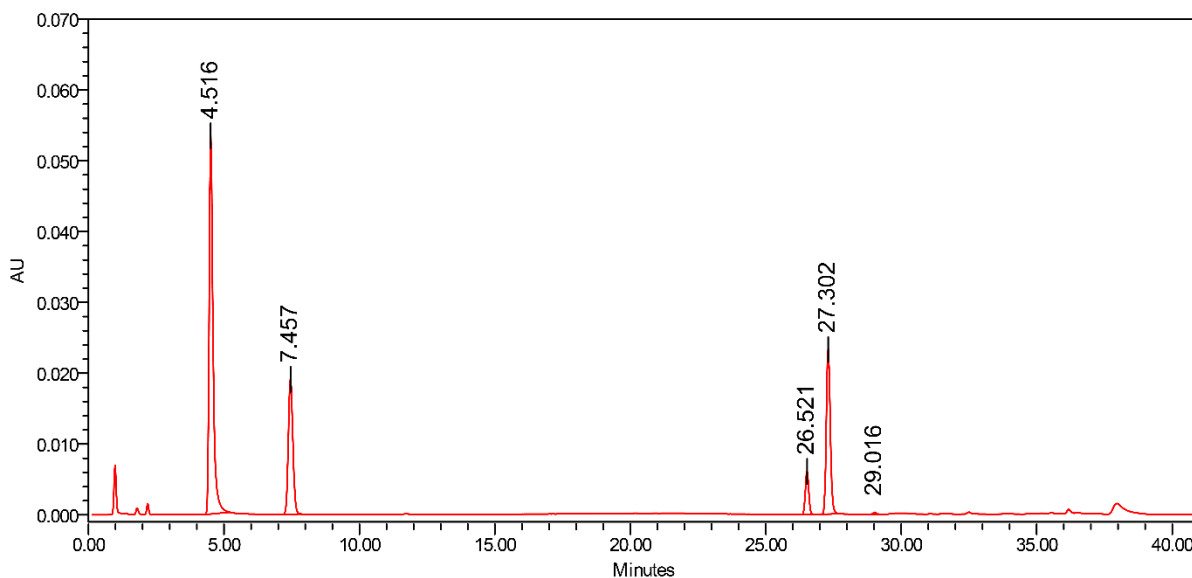
Во Табела 18 се прикажани ретенциските времиња на мелоксикам и онечистувањата А, В, С и D, добиени од хроматограмите на поединечните стандардни раствори при воспоставените хроматографски услови. Во хроматограмите од растворувачот и плацебо растворот не беа детектирани пикови на ретенциските времиња карактеристични за мелоксикам и соодветните онечистувања.

Табела 18 Резултати за параметарот селективност

Table 18 Results for the selectivity parameter

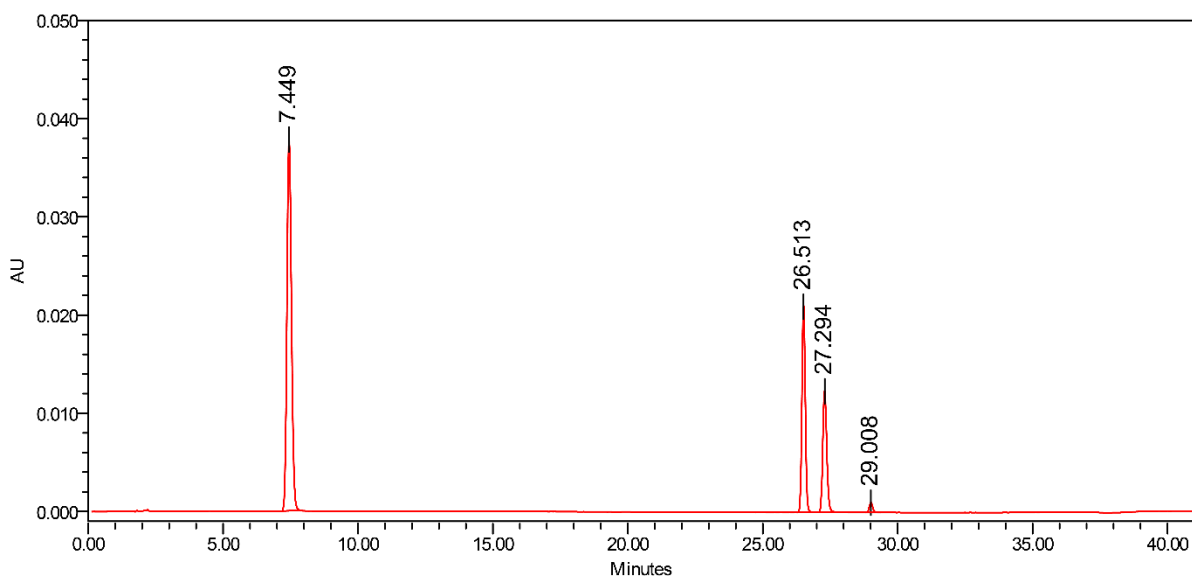
Хроматограм	Ретенциско време на 260 nm (min)	Ретенциско време на 350 nm (min)
Растворувач	/	/
Плацебо раствор	/	/
Мелоксикам	7,462	7,455
Онечистување А	27,544	27,536
Онечистување В	4,563	/
Онечистување С	26,866	26,858
Онечистување D	29,329	29,320

За дополнителна потврда на селективноста на аналитичкиот метод беше анализиран мешан стандарден раствор, подготвен со комбинирање на стандардниот раствор на мелоксикам и поединечните стандардни раствори на онечистувањата А, В, С и D. Хроматограмите од мешаниот стандарден раствор, прикажани на Слики 28 и 29, покажуваат јасно раздвојување на пиковите за сите компоненти.



Слика 28 Хроматограм од мешаниот стандарден раствор (260 nm)

Figure 28 Chromatogram of the mixed standard solution (260 nm)



Слика 29 Хроматограм од мешаниот стандарден раствор (350 nm)

Figure 29 Chromatogram of the mixed standard solution (350 nm)

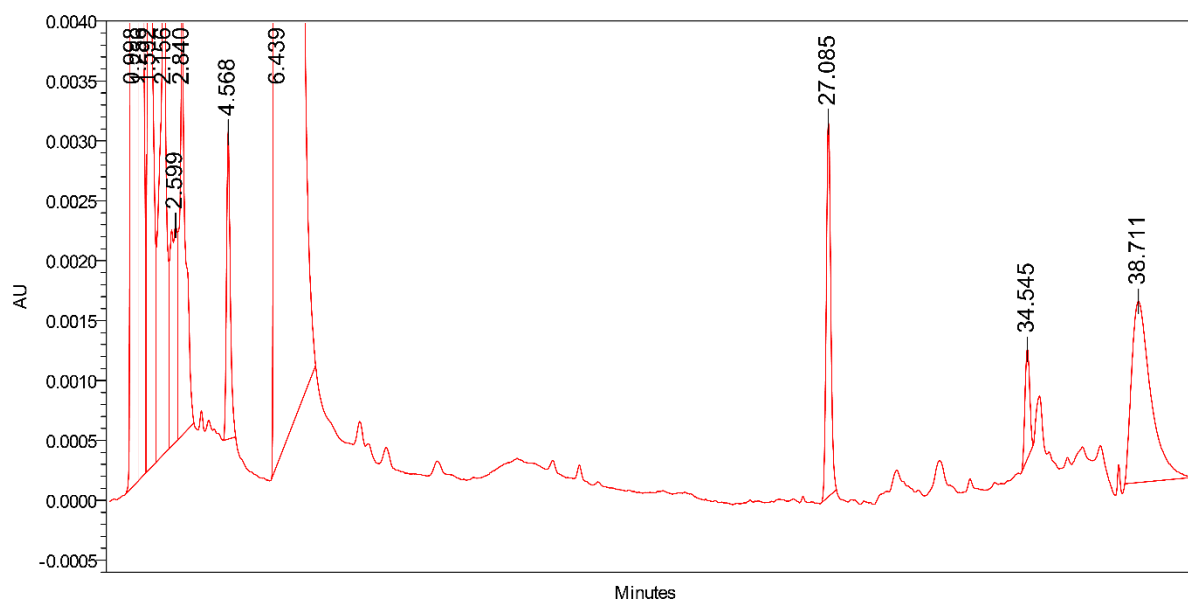
За да се потврди способноста на аналитичкиот метод да го раздвои пикот на мелоксикам од пиковите на деградациските производи што може да се формираат во текот на рокот на употреба, беа разгледани и резултатите од студиите на форсирана деградација.

Бидејќи онечистувањето В се следи на 260 nm, а мелоксикам и останатите онечистувања на 350 nm, деградираниите примероци беа снимени на двете бранови должини, со цел да се опфати целиот профил на деградациски производи.

Табела 19 Резултати од студиите на форсирана деградација (260 nm)

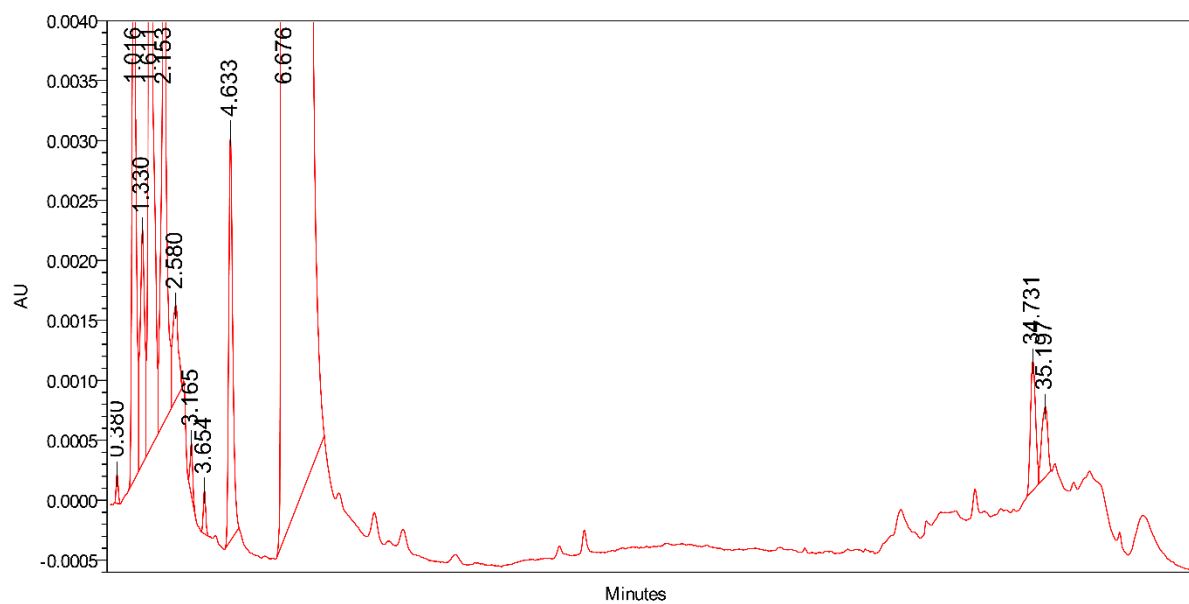
Table 19 Results of forced degradation studies (260 nm)

Соединение	Содржина пред деградација (%)	Содржина по кисела хидролиза (%)	Содржина по базна хидролиза (%)	Содржина по оксидативна деградација (%)	Содржина по термална деградација (%)
Мелоксикам	99,00	92,95	93,96	85,78	93,86
Онечистување А	<LOQ	3,21	<LOQ	4,57	1,01
Онечистување В	0,15	3,05	0,97	6,16	4,10
Онечистување С	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,52	<LOQ
Онечистување D	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,94	<LOQ
Други онечистувања	0,63	2,10	2,94	3,58	0,64
Баланс на маса (%)					
		101,53	98,09	101,77	99,83



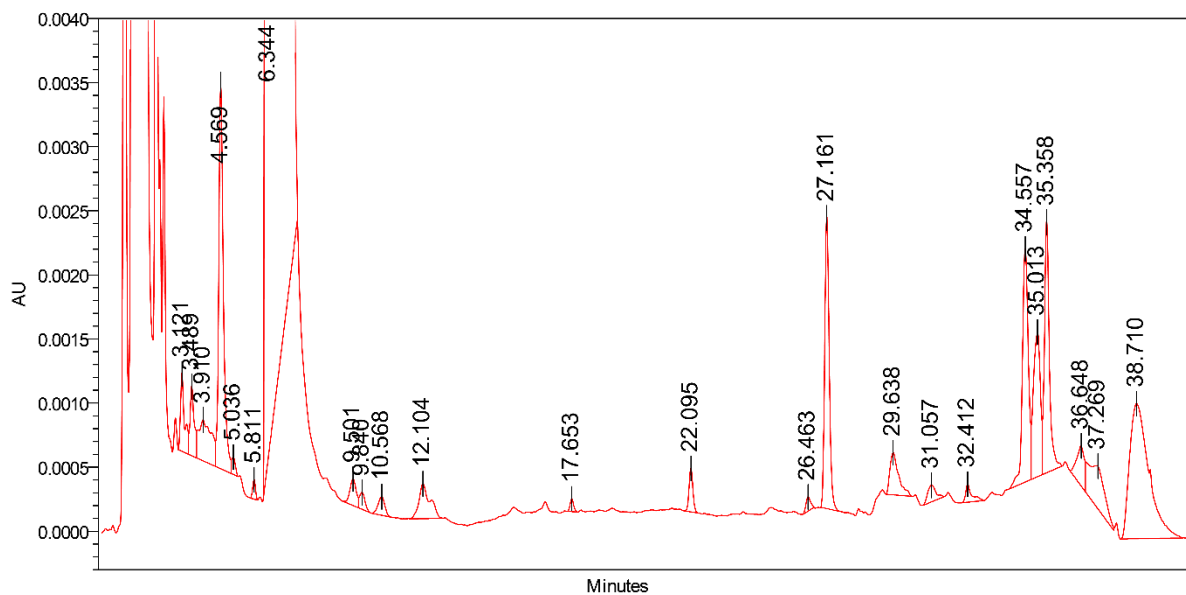
Слика 30 Хроматограм по кисела хидролиза (260 nm)

Figure 30 Chromatogram after acidic hydrolysis (260 nm)



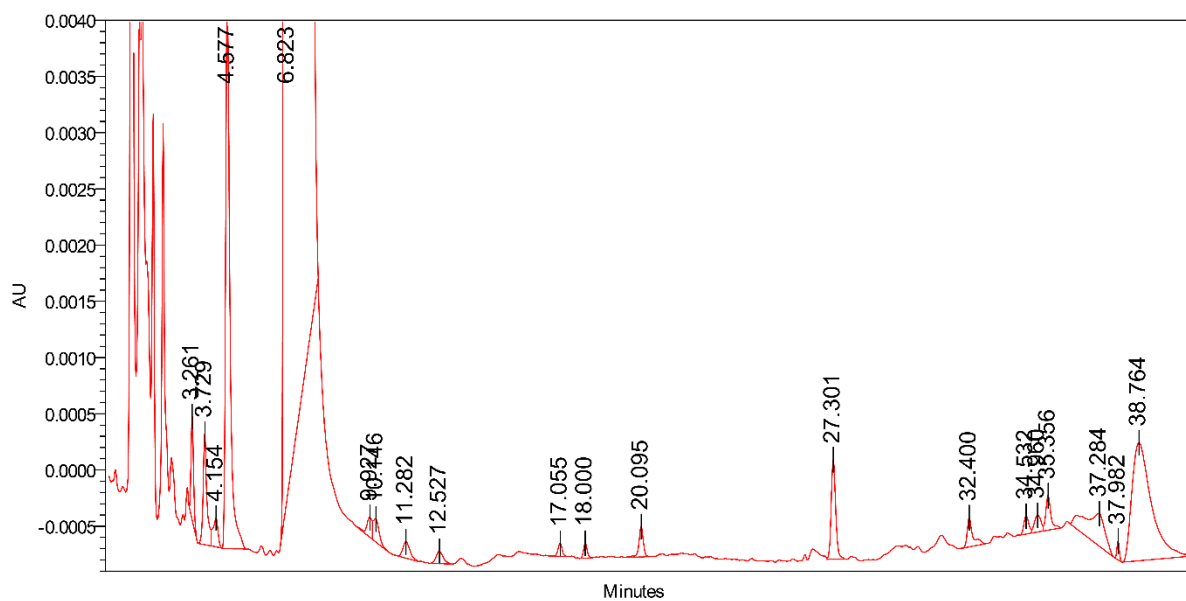
Слика 31 Хроматограм по базна хидролиза (260 nm)

Figure 31 Chromatogram after alkaline hydrolysis (260 nm)



Слика 32 Хроматограм по оксидативна деградација (260 nm)

Figure 32 Chromatogram after oxidative degradation (260 nm)

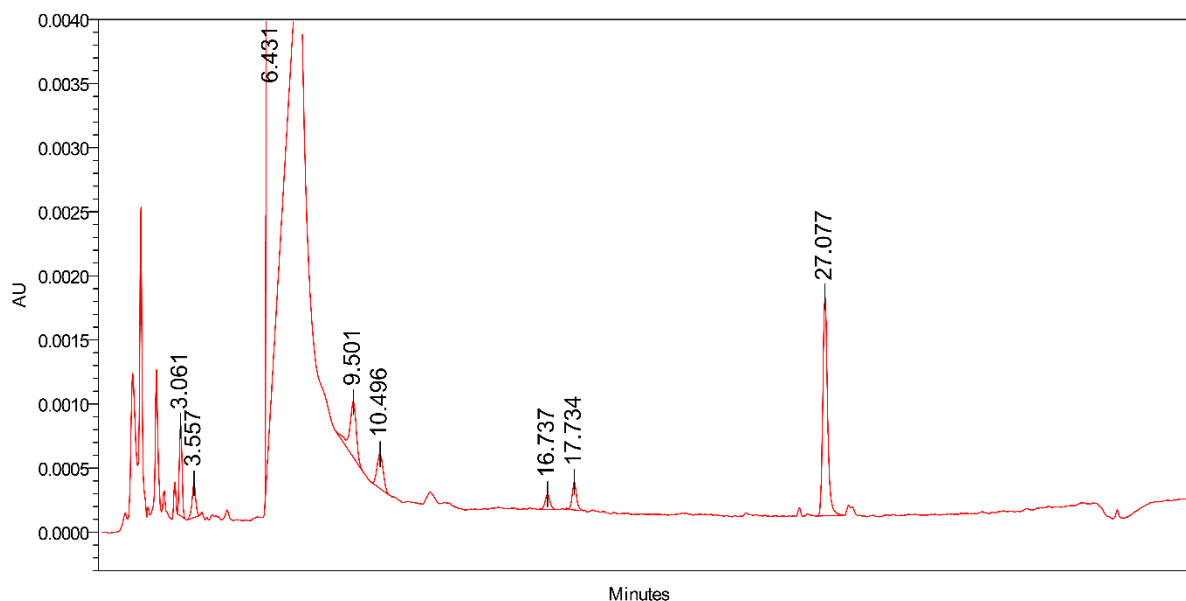


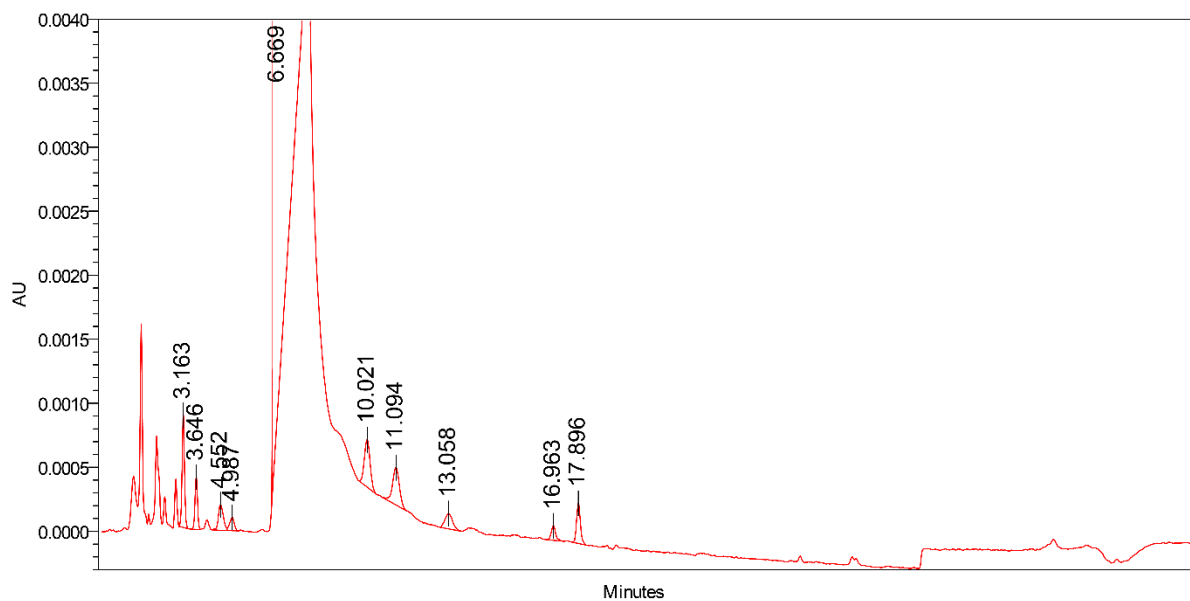
Слика 33 Хроматограм по термална деградација (260 nm)

Figure 33 Chromatogram after thermal degradation (260 nm)

Табела 20 Резултати од студиите на форсирана деградација (350 nm)**Table 20** Results of forced degradation studies (350 nm)

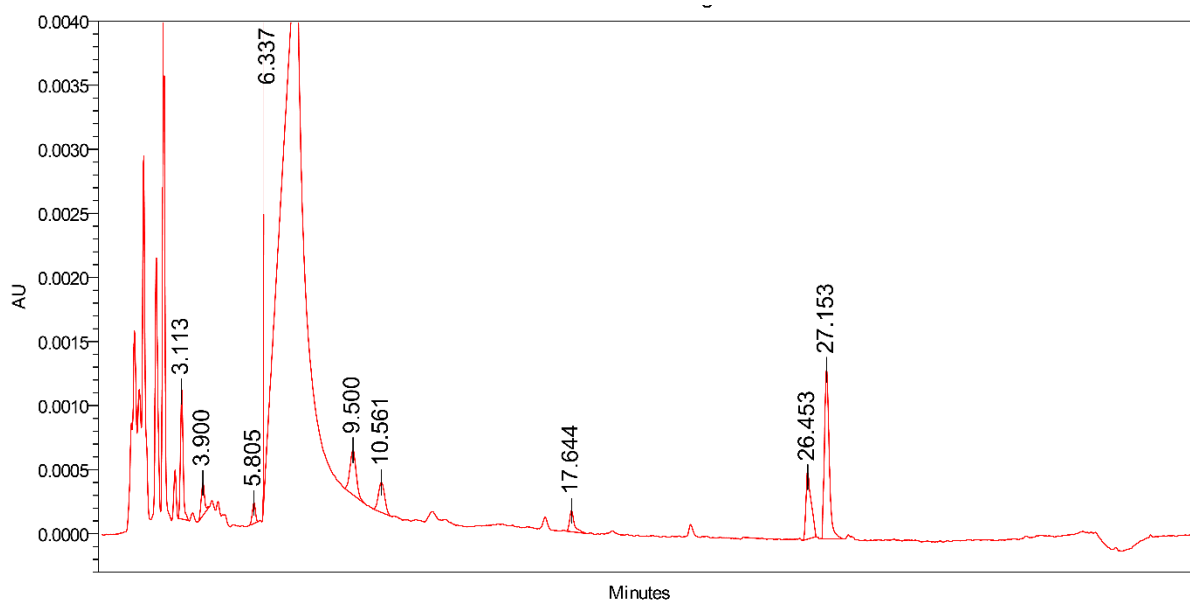
Соединение	Содржина пред деградација (%)	Содржина по кисела хидролиза (%)	Содржина по базна хидролиза (%)	Содржина по оксидативна деградација (%)	Содржина по термална деградација (%)
Мелоксикам	99,91	94,61	94,31	84,43	93,78
Онечистување А	<LOQ	4,45	<LOQ	10,22	2,11
Онечистување В	<LOQ	<LOQ	0,57	<LOQ	<LOQ
Онечистување С	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,15	1,82
Онечистување D	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Други онечистувања	0,54	1,62	4,46	1,19	3,24
Баланс на маса (%)					
		100,23	98,89	98,55	100,50

**Слика 34** Хроматограм по кисела хидролиза (350 nm)**Figure 34** Chromatogram after acidic hydrolysis (350 nm)



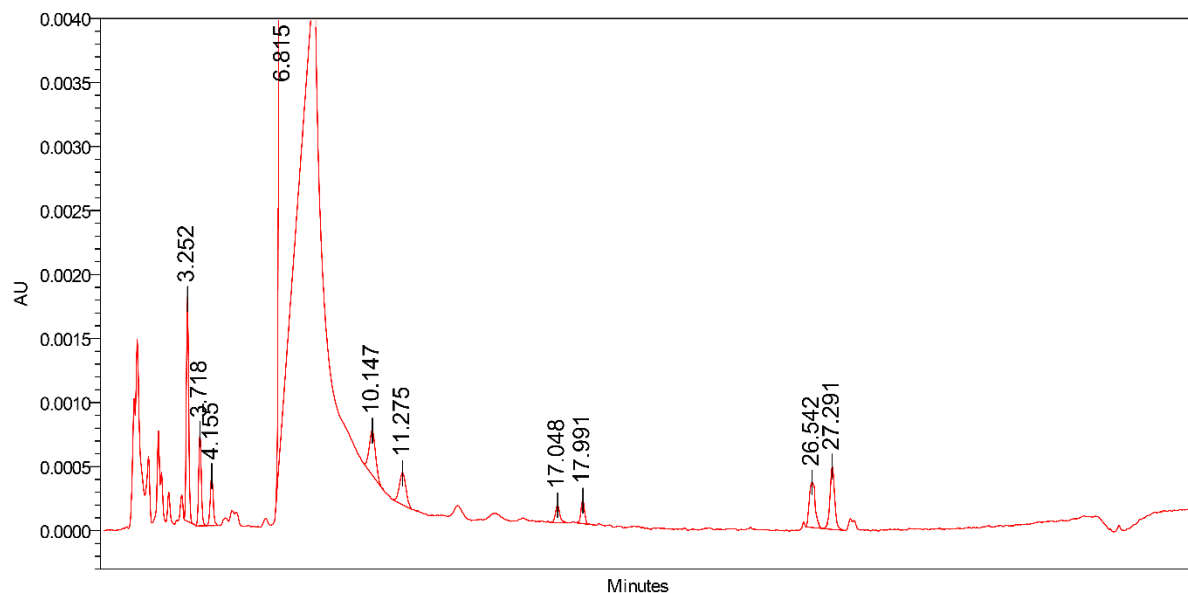
Слика 35 Хроматограм по базна хидролиза (350 nm)

Figure 35 Chromatogram after alkaline hydrolysis (350 nm)



Слика 36 Хроматограм по оксидативна деградација (350 nm)

Figure 36 Chromatogram after oxidative degradation (350 nm)



Слика 37 Хроматограм по термална деградација (350 nm)

Figure 37 Chromatogram after thermal degradation (350 nm)

Линеарноста, а со тоа и **опсегот на аналитичкиот метод**, беа проценети за мелоксикам и за секое поединечно онечистување.

За процена на овие валидациски параметри беше дефинирана работна концентрација поставена на 0,2% во однос на концентрацијата на примерокот за анализа (2,0 mg/mL). Согласно тоа, работната концентрација при испитување на линеарноста изнесуваше 0,004 mg/mL. Останатите концентрациски нивоа беа добиени со соодветни разредувања од еден заеднички основен раствор, со што се обезбедија раствори со концентрации што се во директна корелација со работната концентрација и го опфаќаат потребниот минимален опсег на методот.

Врз основа на максималната дневна доза (Maximum Daily Dose, MDD), прагот на пријавување беше определен на 0,1%, што соодветствува на концентрација од 0,002 mg/mL во однос на концентрацијата на примерокот за анализа (2,0 mg/mL). Следствено, за мелоксикам и за секое поединечно онечистување (A, B, C и D) беа подготвени по пет стандардни раствори во интервал 25–120% од работната концентрација за испитување на линеарноста. За секое концентрациско ниво беа изведени по три инјектирања, при што од добиените вредности за AUC беше пресметана средната вредност.

Табела 21 Концентрациски нивоа за испитување на линеарноста и опсегот**Table 21** Concentration levels used for the evaluation of linearity and range

% од концентрацијата на примерокот за анализа	Концентрација (mg/mL)	% од работната концентрација за испитување на линеарноста
0,05	0,0010	25
0,10	0,0020	50
0,15	0,0030	75
0,20	0,0040	100
0,24	0,0048	120

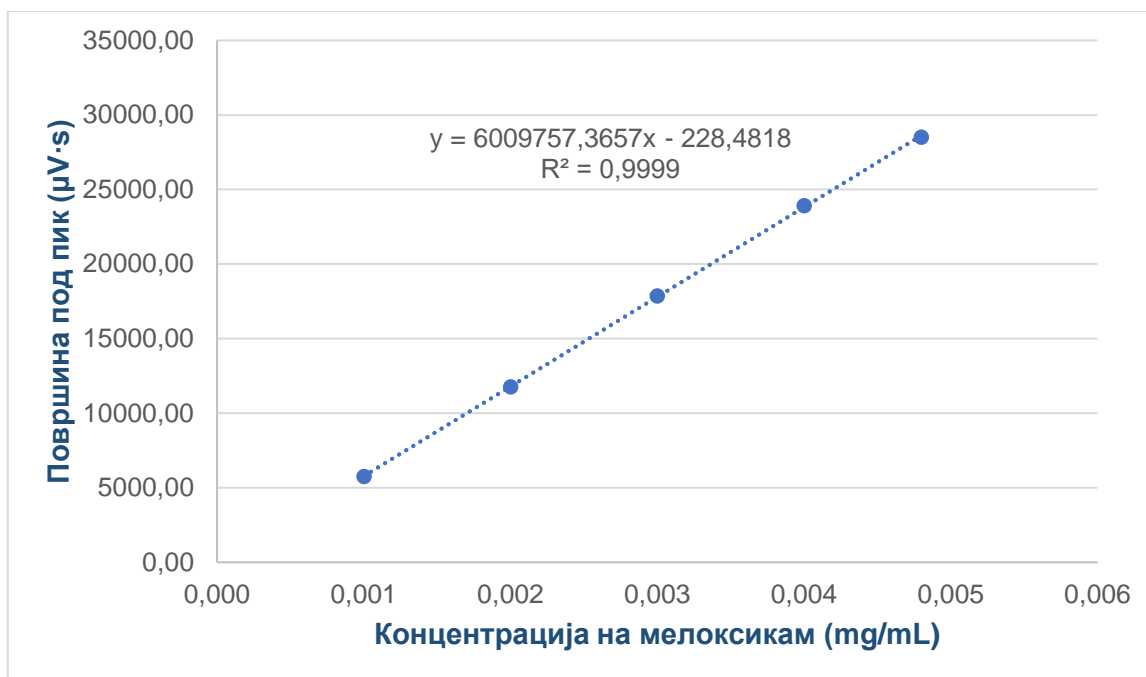
Понатаму, добиените резултати од параметарот линеарност беа искористени како основа за проценка на **LOD** и **LOQ на аналитичкиот метод**. Имено, LOD и LOQ беа определени врз основа на односот S/N, преку споредување на аналитичкиот одговор добиен при ниски концентрации со шумот на базната линија. За таа цел, на овие концентрациски нивоа беа направени по три инјектирања, при што од добиените вредности за односот S/N беше пресметана средната вредност.

Табела 22 Резултати за параметарот линеарност (мелоксикам)

Table 22 Results for the linearity parameter (Meloxicam)

Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Средна вредност од AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
0,0010 mg/mL, 25%	1	26	25	5521	5756
	2	26		5903	
	3	24		5844	
0,0020 mg/mL, 50%	1	45	44	11793	11754
	2	43		11719	
	3	45		11749	
0,0030 mg/mL, 75%	1	50	47	17674	17864
	2	46		17941	
	3	45		17976	
0,0040 mg/mL, 100%	1	52	53	23986	23918
	2	51		23854	
	3	55		23915	
0,0048 mg/mL, 120%	1	62	64	28515	28510
	2	69		28620	
	3	62		28394	

Врз основа на средните вредности за AUC за секое концентрациско ниво беше спроведена регресиона анализа со методот на најмали квадрати. На Слика 38 е прикажана зависноста помеѓу концентрацијата на мелоксикам и одговорот на детекторот (AUC), при што беше утврдена равенката на регресиона права.



Слика 38 Регресиона права што ја прикажува зависноста помеѓу концентрацијата на мелоксикам и површината под пикот

Figure 38 Regression line showing the relationship between Meloxicam concentration and peak area

Табела 23 Резултати за определување на LOD и LOQ (мелоксикам)

Table 23 Results for the determination of LOD and LOQ (Meloxicam)

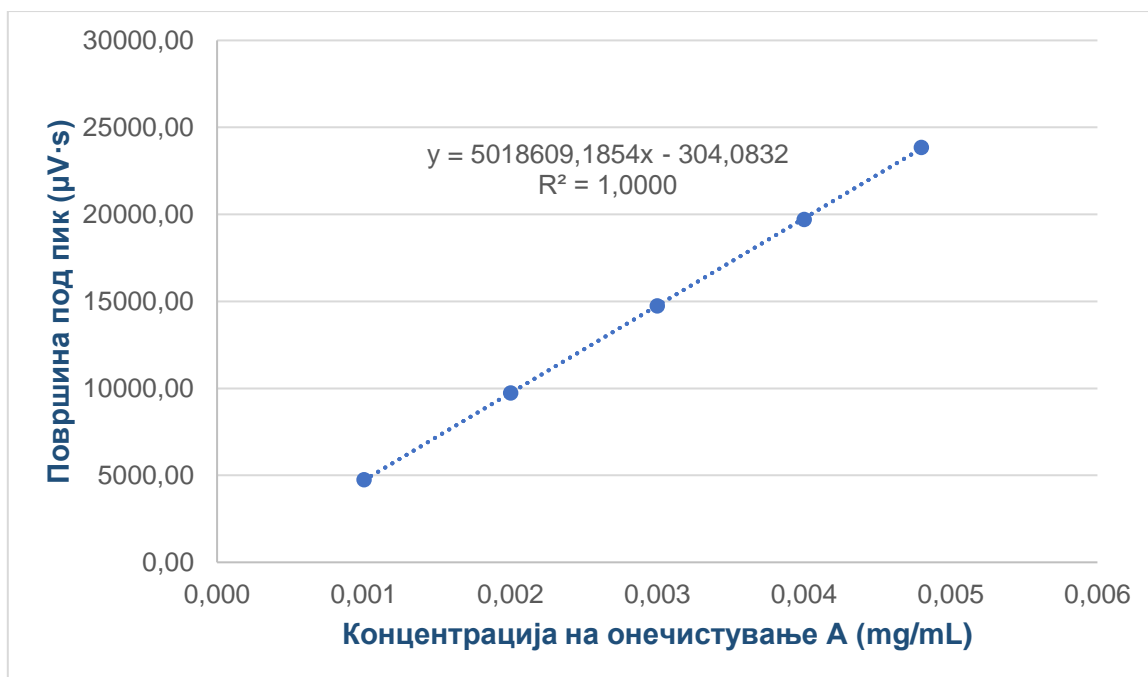
Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC (µV·s)	Средна вредност од AUC (µV·s)
0,0002 mg/mL, 5%	1	3	3	869	914
	2	4		958	
	3	3		914	
0,00072 mg/mL, 18%	1	16	15	4085	4056
	2	14		4229	
	3	16		3854	

Табела 24 Резултати за параметарот линеарност (онечистување А)

Table 24 Results for the linearity parameter (Impurity A)

Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Средна вредност од AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
0,0010 mg/mL, 25%	1	21	19	4510	4739
	2	15		4817	
	3	21		4889	
0,0020 mg/mL, 50%	1	37	40	9801	9729
	2	41		9710	
	3	41		9676	
0,0030 mg/mL, 75%	1	46	45	14796	14732
	2	43		14511	
	3	47		14888	
0,0040 mg/mL, 100%	1	54	55	19744	19713
	2	57		19575	
	3	55		19821	
0,0048 mg/mL, 120%	1	61	62	23796	23842
	2	64		23861	
	3	62		23870	

Врз основа на средните вредности за AUC за секое концентрациско ниво беше спроведена регресиона анализа со методот на најмали квадрати. На Слика 39 е прикажана зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување А и одговорот на детекторот (AUC), при што беше утврдена равенката на регресиона права.



Слика 39 Регресиона права што ја прикажува зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување А и површината под пикот

Figure 39 Regression line showing the relationship between Impurity A concentration and peak area

Табела 25 Резултати за определување на LOD и LOQ (онечистување А)

Table 25 Results for the determination of LOD and LOQ (Impurity A)

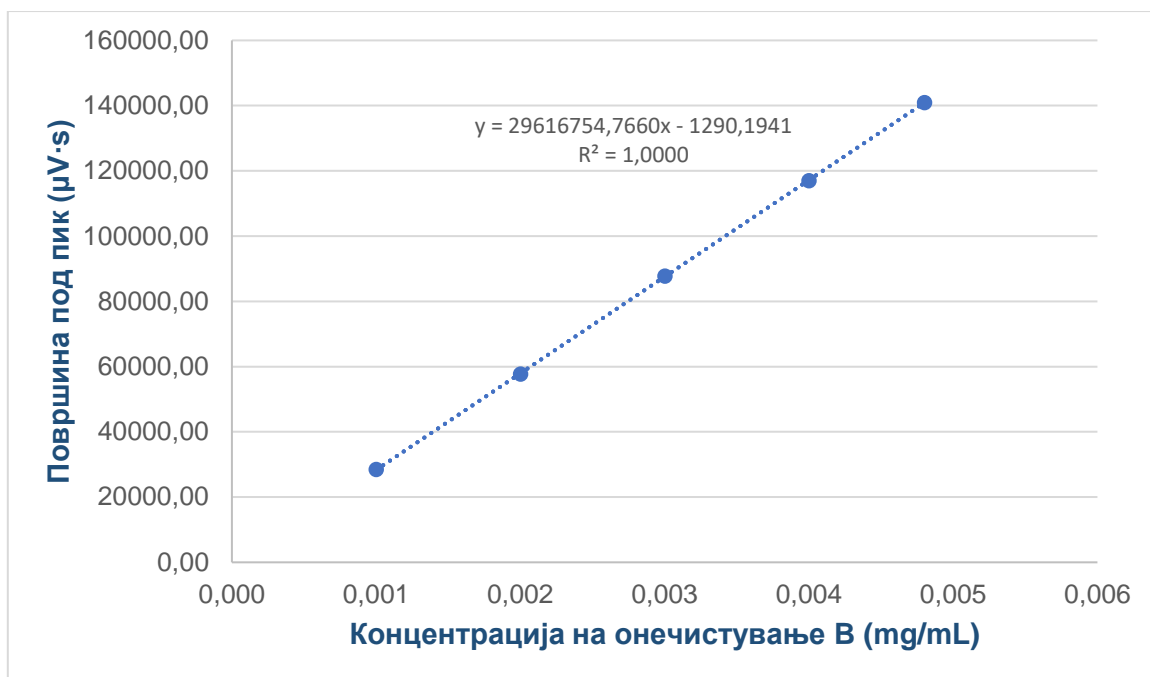
Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC (µV·s)	Средна вредност од AUC (µV·s)
0,00032 mg/mL, 8%	1	5	5	1432	1426
	2	4		1461	
	3	5		1385	
0,0010 mg/mL, 25%	1	21	19	4510	4739
	2	15		4817	
	3	21		4889	

Табела 26 Резултати за параметарот линеарност (онечистување В)

Table 26 Results for the linearity parameter (Impurity B)

Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC ($\mu V \cdot s$)	Средна вредност од AUC ($\mu V \cdot s$)
0,0010 mg/mL, 25%	1	45	44	28760	28447
	2	45		28480	
	3	43		28102	
0,0020 mg/mL, 50%	1	76	74	57872	57717
	2	74		58026	
	3	73		57253	
0,0030 mg/mL, 75%	1	100	100	87586	87724
	2	100		87759	
	3	99		87826	
0,0040 mg/mL, 100%	1	113	117	116787	117028
	2	123		116657	
	3	114		117639	
0,0048 mg/mL, 120%	1	125	124	141104	140961
	2	123		140238	
	3	123		141540	

Врз основа на средните вредности за AUC за секое концентрациско ниво беше спроведена регресиона анализа со методот на најмали квадрати. На Слика 40 е прикажана зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување В и одговорот на детекторот (AUC), при што беше утврдена равенката на регресиона права.



Слика 40 Регресиона права што ја прикажува зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување В и површината под пикот

Figure 40 Regression line showing the relationship between Impurity B concentration and peak area

Табела 27 Резултати за определување на LOD и LOQ (онечистување В)

Table 27 Results for the determination of LOD and LOQ (Impurity B)

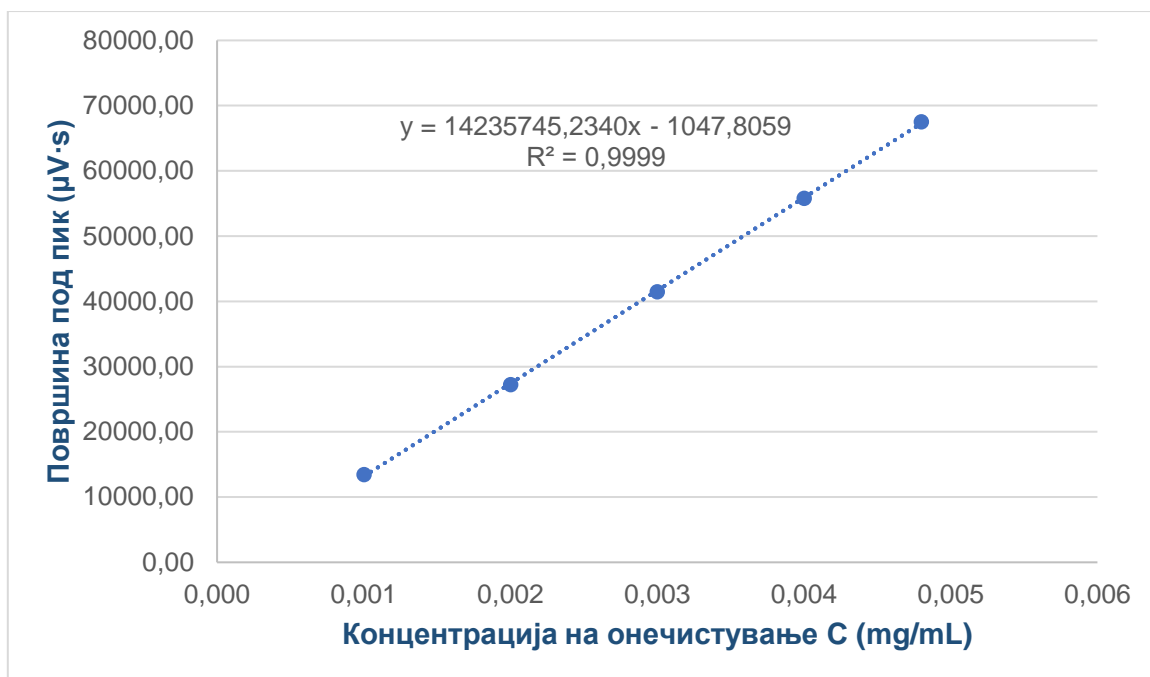
Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC (µV·s)	Средна вредност од AUC (µV·s)
0,00008 mg/mL, 2%	1	4	4	1855	1769
	2	4		1682	
	3	4		1769	
0,00028 mg/mL, 7%	1	19	19	7399	7389
	2	20		7295	
	3	18		7475	

Табела 28 Резултати за параметарот линеарност (онечистување С)

Table 28 Results for the linearity parameter (Impurity C)

Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC ($\mu V \cdot s$)	Средна вредност од AUC ($\mu V \cdot s$)
0,0010 mg/mL, 25%	1	66	67	13375	13450
	2	60		13603	
	3	76		13371	
0,0020 mg/mL, 50%	1	123	121	27352	27240
	2	109		26713	
	3	130		27654	
0,0030 mg/mL, 75%	1	145	138	41909	41444
	2	139		41175	
	3	131		41247	
0,0040 mg/mL, 100%	1	138	153	55236	55778
	2	163		55942	
	3	158		56155	
0,0048 mg/mL, 120%	1	183	179	67410	67538
	2	187		67732	
	3	167		67673	

Врз основа на средните вредности за AUC за секое концентрациско ниво беше спроведена регресиона анализа со методот на најмали квадрати. На Слика 41 е прикажана зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување С и одговорот на детекторот (AUC), при што беше утврдена равенката на регресиона права.



Слика 41 Регресиона права што ја прикажува зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување C и површината под пикот

Figure 41 Regression line showing the relationship between Impurity C concentration and peak area

Табела 29 Резултати за определување на LOD и LOQ (онечистување C)

Table 29 Results for the determination of LOD and LOQ (Impurity C)

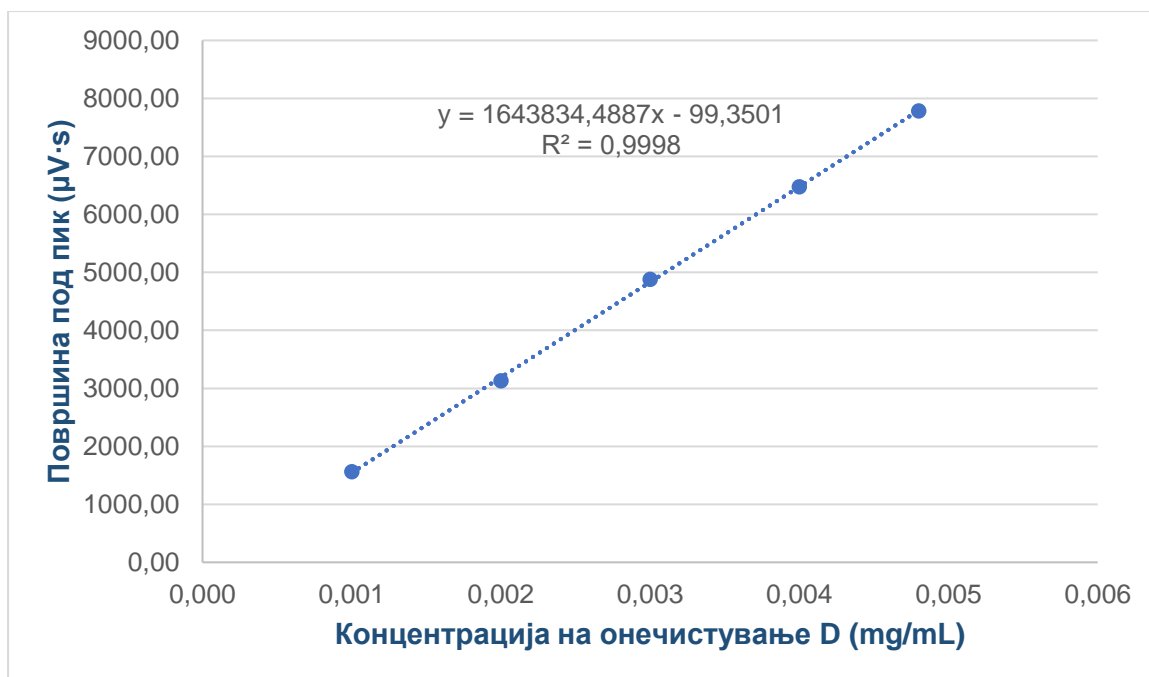
Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC (µV·s)	Средна вредност од AUC (µV·s)
0,00004 mg/mL, 1%	1	4	4	695	635
	2	3		483	
	3	4		728	
0,0002 mg/mL, 5%	1	10	12	2683	2799
	2	9		2752	
	3	18		2961	

Табела 30 Резултати за параметарот линеарност (онечистување D)

Table 30 Results for the linearity parameter (Impurity D)

Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC ($\mu V \cdot s$)	Средна вредност од AUC ($\mu V \cdot s$)
0,0010 mg/mL, 25%	1	9	8	1606	1564
	2	8		1467	
	3	8		1618	
0,0020 mg/mL, 50%	1	15	14	3239	3132
	2	12		3062	
	3	15		3096	
0,0030 mg/mL, 75%	1	17	17	4889	4879
	2	16		4951	
	3	18		4799	
0,0040 mg/mL, 100%	1	17	18	6509	6475
	2	20		6469	
	3	18		6446	
0,0048 mg/mL, 120%	1	19	22	7723	7782
	2	22		7767	
	3	24		7856	

Врз основа на средните вредности за AUC за секое концентрациско ниво беше спроведена регресиона анализа со методот на најмали квадрати. На Слика 42 е прикажана зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување D и одговорот на детекторот (AUC), при што беше утврдена равенката на регресиона права.



Слика 42 Регресиона права што ја прикажува зависноста помеѓу концентрацијата на онечистување D и површината под пикот

Figure 42 Regression line showing the relationship between Impurity D concentration and peak area

Табела 31 Резултати за определување на LOD и LOQ (онечистување D)

Table 31 Results for the determination of LOD and LOQ (Impurity D)

Концентрација (mg/mL), НИВО (%)	Ред. бр. на инјектирање	S/N однос	Средна вредност од S/N односот	AUC (µV·s)	Средна вредност од AUC (µV·s)
0,0008 mg/mL, 20%	1	6	5	1267	1282
	2	5		1296	
	3	5		1282	
0,002 mg/mL, 50%	1	15	14	3239	3132
	2	12		3062	
	3	15		3096	

Точноста на аналитичкиот метод беше оценета со подготовка на спајкувани примероци за анализа на четири концентрациски нивоа: LOQ (поединечно за секое онечистување), 50% (0,002 mg/mL), 100% (0,004 mg/mL) и 150% (0,006 mg/mL) од работната концентрација.

При подготовката на примероците, беше земен ист волумен од плацебо растворот и беше извршено спајкување со познати количества од поединечните онечистувања, со цел да се добијат претходно дефинираните концентрации. За секое концентрациско ниво беа подготвени по три независни спајкувани проби, при што секоја проба беше инјектирана по еднаш.

Аналитичкиот принос на онечистувањата во спајкуваните проби беше пресметан со помош на мешан стандарден раствор, подготвен во работната концентрација. Имено, од стандардниот раствор беа изведени три последователни инјектирања, а како референтна вредност беше земена средната вредност за AUC од трите инјектирања. Потоа, за секоја проба беше пресметан аналитичкиот принос, а за секое концентрациско ниво беа пресметани средната вредност и RSD за аналитичките приноси.

Табела 32 Резултати за параметарот точност (онечистување A)

Table 32 Results for the accuracy parameter (Impurity A)

LOQ		50%		100%		150%	
Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)
1	106,69	1	102,29	1	100,23	1	102,43
2	103,86	2	102,71	2	99,25	2	100,10
3	106,21	3	102,75	3	99,39	3	102,32
\bar{X}	105,59	\bar{X}	102,59	\bar{X}	99,62	\bar{X}	101,62
RSD (%)	1,44	RSD (%)	0,25	RSD (%)	0,53	RSD (%)	1,29

Табела 33 Резултати за параметарот точност (онечистување В)**Table 33** Results for the accuracy parameter (Impurity B)

LOQ		50%		100%		150%	
Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)
1	97,22	1	100,64	1	95,60	1	94,60
2	97,81	2	100,45	2	95,78	2	91,95
3	98,59	3	100,58	3	95,26	3	94,31
\bar{X}	97,87	\bar{X}	100,56	\bar{X}	95,55	\bar{X}	93,62
RSD (%)	0,70	RSD (%)	0,10	RSD (%)	0,28	RSD (%)	1,55

Табела 34 Резултати за параметарот точност (онечистување С)**Table 34** Results for the accuracy parameter (Impurity C)

LOQ		50%		100%		150%	
Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)
1	101,53	1	99,18	1	103,34	1	109,68
2	106,00	2	101,24	2	104,11	2	109,45
3	103,39	3	107,53	3	97,24	3	107,35
\bar{X}	103,64	\bar{X}	102,65	\bar{X}	101,56	\bar{X}	108,83
RSD (%)	2,17	RSD (%)	4,24	RSD (%)	3,71	RSD (%)	1,18

Табела 35 Резултати за параметарот точност (онечистување D)**Table 35** Results for the accuracy parameter (Impurity D)

LOQ		50%		100%		150%	
Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)	Проба	Аналитички принос (%)
1	103,69	1	97,94	1	100,37	1	107,35
2	101,12	2	97,62	2	93,28	2	108,93
3	103,92	3	101,19	3	100,42	3	109,72
\bar{X}	102,91	\bar{X}	98,92	\bar{X}	98,02	\bar{X}	108,67
RSD (%)	1,51	RSD (%)	2,00	RSD (%)	4,19	RSD (%)	1,11

Согласно ICH Q2(R2), при квантитативно определување на онечистувања во одредена дозирана форма, **прецизноста на аналитичкиот метод** се оценува на две нивоа: повторливост и интермедиерна прецизност.

За оценка на повторливоста беше подготвен мешан стандарден раствор во работната концентрација, согласно пропишаниот метод за подготовка. Потоа беа изведени шест последователни инјектирања, при што за секое онечистување беа пресметани средната вредност и RSD за AUC.

Табела 36 Резултати за параметарот повторливост

Table 36 Results for the repeatability parameter

Реплика	AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) за онечистувањата			
	A	B	C	D
1	19384	117279	51027	5994
2	19027	116336	50223	6158
3	18893	116624	50882	5980
4	18117	118141	54721	6282
5	17846	114477	55322	6665
6	18633	112952	54961	6635
\bar{X}	18650	115968	52856	6286
RSD (%)	3,10	1,65	4,49	4,83

Интермедиерната прецизност беше оценета во ист ден, во иста лабораторија и од страна на два аналитичари. На тој начин беше опфатена варијабилноста поврзана со операторот и подготовката на раствори. Секој аналитичар подготви по два независни мешани стандардни раствори и изведе по шест определувања на содржината на онечистувањата.

За да се обезбеди присуство на секое онечистување и да се овозможи оценка на интермедиерната прецизност за сите онечистувања, секоја примерок беше спајкуван со познати количества од онечистувањата, така што номиналната концентрација на секое онечистување во примероците изнесуваше 0,2 mg/mL. Оваа повисока концентрација беше целно избрана за да се обезбедат порепрезентативни услови за оценка на параметарот.

Од секој мешан стандарден раствор беа изведени по три последователни инјектирања, а при квантификација на онечистувањата во примероците, како референтна вредност беше земена средната вредност за AUC од трите инјектирања на соодветниот стандарден раствор.

Понатаму, за резултатите добиени од секој аналитичар поединечно беа пресметани средната вредност, SD, RSD и s^2 за содржината на онечистувањата, при што за секој примерок беше земена средната вредност добиена со квантификација во однос на првиот и вториот мешан стандарден раствор.

Табела 37 Резултати од Аналитичар 1 за параметарот интермедиерна прецизност**Table 37** Results from Analyst 1 for the intermediate precision parameter

Примерок за анализа	Содржина на онечистување A (mg/mL)	Содржина на онечистување B (mg/mL)	Содржина на онечистување C (mg/mL)	Содржина на онечистување D (mg/mL)
1	0,22	0,23	0,22	0,20
2	0,20	0,23	0,20	0,20
3	0,21	0,22	0,21	0,19
4	0,21	0,22	0,22	0,18
5	0,22	0,23	0,21	0,20
6	0,22	0,23	0,22	0,20
\bar{X}	0,21	0,23	0,21	0,20
SD	0,00816	0,00516	0,00816	0,00806
RSD (%)	3,83	2,28	3,83	4,14
s^2	0,00007	0,00003	0,00007	0,00007

Табела 38 Резултати од Аналитичар 2 за параметарот интермедиерна прецизност**Table 38** Results from Analyst 2 for the intermediate precision parameter

Примерок за анализа	Содржина на онечистување A (mg/mL)	Содржина на онечистување B (mg/mL)	Содржина на онечистување C (mg/mL)	Содржина на онечистување D (mg/mL)
1	0,24	0,24	0,21	0,23
2	0,24	0,24	0,22	0,22
3	0,24	0,24	0,22	0,22
4	0,23	0,23	0,21	0,21
5	0,22	0,24	0,20	0,21
6	0,24	0,24	0,23	0,23
\bar{X}	0,24	0,24	0,22	0,22
SD	0,00837	0,00408	0,01049	0,00894
RSD (%)	3,56	1,71	4,88	4,07
s^2	0,00007	0,00002	0,00011	0,00008

Конечно, беа пресметани вредностите на комбинираната RSD. Притоа, комбинираната RSD за онечистување А изнесуваше 6,15%, за онечистување В 3,24%, за онечистување С 4,20% и за онечистување D 7,44%.

Робусноста на аналитичкиот метод беше оценета со примена на DoE, со статистичка обработка на резултатите во софтверот MODDE®.

Како CPPs беа разгледани температурата на колоната, рН-вредноста на пуферот и протокот на мобилната фаза. Сите CPPs беа анализирани на две нивоа (пониско и повисоко) во однос на основното ниво. Така, температурата на колоната беше променета за ± 2 °C во однос на работната температура (45 °C), односно на 43 °C и 47 °C. рН-вредноста на пуферот беше променета за $\pm 0,2$ рН-единици во однос на работната рН (6,0), односно на 5,8 и 6,2. Конечно, протокот на мобилната фаза беше променет за $\pm 0,2$ mL/min во однос на работниот проток (1,0 mL/min), односно на 0,8 mL/min и 1,2 mL/min.

Како CQAs беа разгледани R_s помеѓу пиковите на онечистувањата С и А, N за онечистување В (N_B) и N за мелоксикам (N_M). R_s се смета за најкритичен параметар, бидејќи пиковите за онечистувањата С и А се најблиску елуирани, па постои најголем ризик од недоволно раздвојување при мали варијации на хроматографските услови. Параметарот N_B беше вклучен бидејќи онечистување В претставува репрезентативно онечистување, односно е релевантно како доминантен деградациски производ во испитуваните услови. Параметарот N_M , пак, беше вклучен како показател за ефикасноста на колоната и стабилноста на системот при анализа на главниот аналит. Воспоставениот критериум за прифатливост за R_s беше нејзината вредност да биде поголема или еднаква на 1,5 ($R_s \geq 1,5$), додека критериумот за прифатливост за N беше истиот да биде поголем или еднаков на 2000 ($N \geq 2000$).

Имајќи предвид дека беа анализирани три фактори (температура на колоната, рН-вредност на пуферот и проток на мобилната фаза) на две нивоа (пониско и повисоко), беше применет целосен факторијален дизајн 2^3 , при што беа воспоставени осум експерименти (N1–8), дополнети со три централни точки (N9–11).

Табела 39 Целосен факторијален дизајн (2^3) за потврда на робусноста на аналитичкиот метод

Table 39 Full factorial (2^3) design for verification of robustness of the analytical method

Информации за експериментите		CPPs			CQAs		
Име	Реден број	T (°C)	pH	Проток (mL/min)	R_s	N_B	N_M
N1	9	43	5,8	0,8	4,9	5197	9221
N2	3	47	5,8	0,8	4,6	5430	9365
N3	7	43	6,2	0,8	1,6	6092	9249
N4	8	47	6,2	0,8	–	6145	9105
N5	2	43	5,8	1,2	4,2	3973	7574
N6	6	47	5,8	1,2	3,6	4221	7445
N7	10	43	6,2	1,2	–	4411	7529
N8	1	47	6,2	1,2	–	4594	7292
N9	11	45	6,0	1,0	2,4	4825	9350
N10	5	45	6,0	1,0	2,4	5012	8461
N11	4	45	6,0	1,0	2,4	4950	8493

5.2.2. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод

Соодветноста на систем беше оценета преку следење на следните параметри: ретенциско време (Retention time, R_t), A_s и N за сите компоненти, како и R_s помеѓу онечистувањата С и А. Параметарот R_s беше вклучен како критичен, бидејќи пиковите на онечистувањата С и А се најблиску елуирани, па кај нив постои најголем ризик од недоволно раздвојување, односно појава на коелуирање.

За таа цел беше подготвен мешан стандарден раствор во работната концентрација, согласно пропишаниот метод на подготовка. Потоа беа изведени шест последователни инјектирања на стандардниот раствор, при што за секое инјектирање беа определени параметрите за соодветност на систем.

Табела 40 Резултати за соодветност на систем (ретенциско време)**Table 40** System suitability results (retention time)

Реплика	Мелоксикам	Онечистувања			
		A	B	C	D
1	7,449	27,290	4,516	26,513	29,008
2	7,479	27,289	4,525	26,506	29,004
3	7,481	27,298	4,514	26,513	29,010
4	7,468	27,296	4,519	26,513	29,008
5	7,462	27,276	4,512	26,493	28,988
6	7,469	27,289	4,518	26,505	29,001
RSD (%)	0,16	0,03	0,10	0,03	0,03

Табела 41 Резултати за соодветност на систем (фактор на симетрија)**Table 41** System suitability results (symmetry factor)

Реплика	Мелоксикам	Онечистувања			
		A	B	C	D
1	1,11	1,12	1,49	1,04	1,07
2	1,11	1,12	1,51	1,05	1,07
3	1,11	1,12	1,49	1,04	1,04
4	1,11	1,12	1,49	1,04	1,05
5	1,11	1,12	1,50	1,04	1,06
6	1,11	1,12	1,49	1,04	1,06
RSD (%)	0,00	0,00	0,56	0,39	1,11

Табела 42 Резултати за соодветност на систем (број на теоретски подови)**Table 42** System suitability results (number of theoretical plates)

Репликат	Мелоксикам	Онечистувања			
		A	B	C	D
1	9449	163533	5579	213790	242679
2	9476	163884	5543	213187	252333
3	9416	165557	5537	214455	248307
4	9541	165453	5625	216183	249858
5	9477	163843	5559	213234	250137
6	9484	165346	5594	214764	254188
RSD (%)	0,44	0,57	0,60	0,53	1,59

Табела 43 Резултати за соодветност на систем (резолюција)**Table 43** System suitability results (resolution)

Репликат	R_s
1	3,13
2	3,15
3	3,17
4	3,16
5	3,15
6	3,16
RSD (%)	0,43

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Изократски метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање

6.1.1. Развој и оптимизација на аналитичкиот метод

Пред да се пристапи кон развој, оптимизација и валидација, аналитичкиот метод мора да биде јасно и недвосмислено дефиниран. Во конкретниот случај, станува збор за квантитативен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање, при што квантификацијата се врши со надворешен стандард. Според бројот на APIs, готовиот фармацевтски производ е монокомпонентен, односно содржи само мелоксикам.

Како аналитички систем за развој, оптимизација и валидација на методот беше применет HPLC систем со UV детекција. Овој пристап претставува еден од најчесто користените во рутинската контрола на квалитет на фармацевтски производи што содржат мелоксикам (Brezovska et al., 2013).

Врз основа на анализата на хемиската структура на мелоксикам беше потврдено присуство на хромофорни групи, што ја прави UV детекцијата целосно оправдана. Согласно литературните податоци, за бранова должина на детекција беше избрана 360 nm (Banerjee et al., 2003), бидејќи мелоксикам покажува изразена апсорпција на оваа бранова должина, со што се обезбедуваат соодветна чувствителност и јасен аналитички сигнал.

Развојот и оптимизацијата на методот беа насочени кон воспоставување селективен метод кој ќе биде линеарен во дефинираниот опсег, точен, повторлив, репродуктивен и робустен во дефинираниот оперативен опсег. За таа цел, применет беше конвенционален методолошки концепт со систематско испитување на клучните хроматографски параметри кои влијаат врз ретенцијата, ефикасноста на колоната и обликот на хроматографскиот пик. Оптимизацијата беше спроведена со OFAT пристап, односно со поединечно варирање на еден параметар додека останатите се одржуваат константни. Овој пристап е особено погоден за оптимизација на HPLC методи за определување на содржина, кај кои е потребна брза идентификација на услови што обезбедуваат остар и симетричен пик, со прифатливо време на анализа и минимални ефекти од матриксот. Ваквите методи и понатаму имаат значајно место во аналитичката пракса, бидејќи претставуваат едноставно и економично решение за рутинска контрола на квалитет.

Имајќи ги предвид физичко-хемиските својства на мелоксикам (слабо кисел карактер, релативно висока липофилност и присуство на ароматични и хетероциклични структури), за развој, оптимизација и валидација на аналитичкиот метод беше избрана реверзно-фазна хроматографија. Притоа, изборот на стационарна фаза беше насочен кон испитување на колони од не'рѓосувачки челик, пакувани со модифициран силика гел со јаглородни ланци од 8 и 18 јаглородни атоми (C8 и C18).

При оптимизацијата беа споредени хроматографските перформанси (ретенција, ефикасност на колоната и облик на хроматографскиот пик), при што беше забележано дека употребата на стационарна фаза со подолги јаглородни ланци доведува до поизразена ретенција и поповолен облик на пикот. Оттука, најдобри резултати беа добиени со употреба на колоната LiChrospher 100, RP-18 (Merck), со должина 25 cm, внатрешен дијаметар 4,0 mm и големина на честици 5 μ m. Следствено, оваа колона, пакувана со C18 стационарна фаза, обезбеди стабилни хроматографски перформанси и соодветен хроматографски одговор, што ја прави погодна за рутинска примена при определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање.

Температурата на колоната се одржуваше на 25 °C, со што се минимизираа варијациите во вискозноста на мобилната фаза и се обезбеди конзистентно ретенциско време на хроматографскиот пик за мелоксикам.

Основната улога на мобилната фаза е да овозможи сигурно елуирање на мелоксикам, со стабилна базна линија и поволен облик на хроматографскиот пик. За таа цел беа тестирани различни комбинации на компоненти, при што како најсоодветна мобилна фаза се покажа смесата од ацетонитрил и ултрачиста вода во заемен однос 60:40 (v/v).

Избраниот состав на мобилната фаза подразбира повисок удел на органската компонента во споредба со водената, што е оправдано имајќи предвид дека фармацевтскиот производ е монокомпонентен, а единствената API претставува липофилно органско соединение. Во тој контекст, како режим на елуирање беше избран изократскиот пристап, со цел да се обезбеди константен, повисок удел на органската компонента во мобилната фаза. На овој начин се постигнува пократко време на анализа, при истовремено обезбедување соодветна ретенција на API, што го прави методот практичен и поефикасен за рутинска контрола на квалитет во споредба со градиентниот пристап.

pH-вредноста на мобилната фаза беше дефинирана врз основа на pK_a-вредностите на мелоксикам, 1,1 и 4,2 (Oliveira et al., 2009). За да се обезбеди соодветна ретенција во реверзно-фазен систем и стабилен облик на пикот, pH-вредноста на ултрачистата вода беше прилагодена на 3,1 со додавање глацијална оцетна киселина. При оваа pH-вредност мелоксикам се наоѓа претежно во нејонизирана форма, што придонесува за поизразена интеракција со стационарната фаза и поволен облик на хроматографскиот пик.

Изборот на глацијална оцетна киселина за прилагодување на pH-вредноста е оправдан, бидејќи станува збор за слаба киселина која во условите на хроматографскиот метод не се очекува да предизвика деградација на мелоксикам. Дополнително, киселината не предизвикува интерференции на избраната бранова должина.

Брзината на проток беше оптимизирана со цел да се обезбеди рационално време на анализа и стабилни хроматографски перформанси. При развојот на методот беше утврдено дека зголемувањето на протокот доведува до побрзо елуирање и пократко време на анализа, но при повисоки вредности се забележа нарушување на симетријата на хроматографскиот пик. Оттука, како оптимална беше избрана брзината на проток од 1,5 mL/min.

За подготовка на стандардниот раствор и примерокот за анализа беше користен 40% метанол, како погоден растворувач за ефикасно растворување на мелоксикам и добивање јасен и повторлив аналитички сигнал.

Конечно, изократскиот метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање беше успешно развиен и оптимизиран, со следниве карактеристики: разумно време на анализа, едноставна подготовка на стандардниот раствор и примерокот за анализа, едноставна изведба со робусни перформанси и економска исплатливост на целата хроматографска анализа. Ваквите карактеристики се во согласност со општите препораки за развој на HPLC методи за рутинска контрола на квалитет, кај кои се нагласуваат едноставноста, робусноста и економичноста на постапката. Ова претставува доволна основа да се продолжи со валидација на аналитичкиот метод, утврдување на соодветноста на хроматографскиот систем и процена на мерната неодреденост.

6.1.2. Валидација на аналитичкиот метод

За да се потврди специфичноста кај HPLC метод за определување на содржината на API во готов фармацевтски производ, потребно е да се прикажат репрезентативни хроматограми и да се докаже дека пикот од интерес не е предмет на интерференции од растворувачот, плацебо растворот или други компоненти што можат да бидат присутни во примерокот за анализа (Bliesner, 2005; ICH Q2(R2), 2023).

Во конкретниот случај, специфичноста беше оценета преку анализа и споредба на хроматограмите добиени од растворувачот (Слика 7), плацебо растворот (Слика 8), стандардниот раствор (Слика 9) и примерокот за анализа (Слика 10), при што беше следено постоењето на евентуални интерферирачки пикови на ретенциското време на мелоксикам.

Како што е прикажано во Табела 4, во хроматограмот добиен од примерокот за анализа беше детектиран пик кој, според ретенциското време, соодветствува со пикот добиен од стандардниот раствор, додека во хроматограмите од растворувачот и плацебо растворот не беше детектиран пик на истото ретенциско време.

Отсуството на интерферирачки пикови на ретенциското време на мелоксикам во хроматограмите од растворувачот и плацебо растворот, заедно со совпаѓањето на ретенциското време на пикот во стандардниот раствор и примерокот за анализа, потврдува дека развиениот аналитички метод е специфичен. Методот овозможува јасно и недвосмислено мерење на сигналот на мелоксикам во матрицот на примерокот, без интерференции од останатите компоненти, како што се ексципиенсите.

За метод за определување на содржината на API во готов фармацевтски производ, линеарноста се смета за прифатлива доколку вредноста на r е поголема или еднаква на 0,999 ($\geq 0,999$), а опсегот на методот, вообичаено, треба да изнесува 80–120% од работната концентрација (Kazusaki et al., 2012; ICH Q2(R2), 2023).

Како што е прикажано во Табела 5, линеарноста беше оценета во работниот опсег од 80–120%, а дополнително беше опфатено и ниво од 130% од работната концентрација. Врз основа на обработените податоци, беше добиена следнава равенка на регресиона права:

$$y = 21255531,4286x - 548914,9333$$

каде што x ја карактеризира концентрацијата на мелоксикам, а y ја карактеризира AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$).

Вредноста на R^2 изнесува 0,9992, а пресметаната вредност на r е 0,9996, што е во согласност со критериумот за прифатливост. Ова потврдува линеарна зависност помеѓу концентрацијата на мелоксикам и аналитичкиот одговор во испитуваниот опсег, при што линеарноста останува задоволителна и на ниво од 130% од работната концентрација.

Точноста на аналитичкиот метод беше оценета преку аналитичкиот принос, при што беа воспоставени два критериуми за прифатливост:

- поединечните вредности на аналитичкиот принос на секое од трите концентрациски нивоа треба да се движат во интервал 98,00–102,00% (Bliesner, 2005; Marson et al., 2020);
- вредностите на RSD за аналитичките приноси на секое од трите концентрациски нивоа не треба да бидат поголеми од 2,00% ($\leq 2,00\%$) (Bliesner, 2005; Marson et al., 2020).

Како што е прикажано во Табела 6, поединечните вредности на аналитичките приноси на сите три концентрациски нивоа се во рамки на критериумот за прифатливост. Дополнително, вредностите на RSD за аналитичките приноси на секое од трите нивоа се под 2,00%. Овие резултати потврдуваат дека методот обезбедува точна квантификација на мелоксикам во раствор за инјектирање.

Повторливоста се смета за прифатлива доколку вредноста на RSD за AUC од шесте последователни инјектирања на стандардниот раствор не е поголема од 2,00% ($\leq 2,00\%$) (Bliesner, 2005).

Како што е прикажано во Табела 7, при оценувањето на повторливоста, вредноста на RSD е во рамки на критериумот за прифатливост, што укажува дека методот е прецизен при работа под исти услови, за краток временски период, на ист стандарден раствор.

При оценување на интермедиерната прецизност беа воспоставени три критериуми за прифатливост:

- вредноста на RSD за резултатите добиени во една независна серија, односно од еден аналитичар, не треба да биде поголема од 2,00% ($\leq 2,00\%$) (Bliesner, 2005);

- вредноста на комбинираната RSD за резултатите добиени од двете независни серии, односно од двата аналитичари, не треба да биде поголема од 3,00% ($\leq 3,00\%$) (Bliesner, 2005);
- односот на варијансите пресметан со F-тест треба да биде помал од критичната вредност при избраното ниво на значајност ($\alpha = 0,05$) (Marson et al., 2020).

Во однос на првиот критериум, вредноста на RSD кај првиот аналитичар изнесува 1,72% (Табела 8), а вредноста на RSD кај вториот аналитичар изнесува 1,13% (Табела 9), што значи дека двете вредности се $\leq 2,00\%$ и го задоволуваат воспоставениот критериум за прифатливост.

Во однос на вториот критериум, вредноста на комбинираната RSD изнесува 1,40%, што значи дека и овој критериум е исполнет, бидејќи вредноста за комбинираната RSD е $\leq 3,00\%$

F-тестот се користи за споредба на две варијанси со цел да се утврди дали разликата меѓу нив е поголема од онаа што би се очекувала поради случајни грешки. За таа цел, најпрво се пресметува F-вредноста како однос меѓу поголемата и помалата варијанса, а потоа добиената вредност се споредува со критичната F-вредност од статистички табели за еднострано тестирање при $\alpha = 0,05$ и степени на слобода df_1 и df_2 . Притоа, за секоја серија, $df = N - 1$, каде што N е бројот на добиени резултати (Miller & Miller, 2010).

Бидејќи s^2 на првиот аналитичар (3,01) е поголема од s^2 на вториот аналитичар (1,30), пресметаната F-вредност изнесува 2,32. Со оглед дека секој аналитичар изведе по шест анализи ($N = 6$), вредноста на степените на слобода за секоја серија изнесува $df_1 = df_2 = 6 - 1 = 5$. Врз основа на статистичките табели за еднострано тестирање при $\alpha = 0,05$ и $df_1 = df_2 = 5$, критичната F-вредност изнесува 5,05. Бидејќи пресметаната F-вредност (2,32) е помала од критичната F-вредност (5,05), се прифаќа нултата хипотеза и може да се заклучи дека не постои статистички значајна разлика помеѓу варијансите на резултатите добиени од двата аналитичари.

Со оглед дека сите три критериуми за прифатливост се задоволени, може да се заклучи дека развиениот метод е прецизен при работа во еден ден, во иста лабораторија, од страна на два аналитичари.

При оценка на робусноста беа земени предвид следниве критериуми за прифатливост:

- $k' = 2-10$ (Bliesner, 2005);
- $A_s = 0,8-1,8$ (Council of Europe, 2026b);
- $N \geq 1000$ (Bliesner, 2005).

Дополнително, за да се потврди стабилноста на системот, беше применет уште еден критериум: вредностите на RSD за резултатите добиени за параметрите за соодветност на систем при секоја направена промена, не треба да биде поголема од 2,00% ($\leq 2,00\%$) (Bliesner, 2005).

Како што е прикажано во Табела 10, при промена на протокот (1,3 и 1,7 mL/min), вредностите на параметрите за соодветност на систем остануваат во рамки на прифатливите граници, а вредностите на RSD за сите параметри се $\leq 2,00\%$, што укажува на стабилност на системот при варијации на протокот.

Слично, при промена на составот на мобилната фаза (55:45 и 65:35), како што е прикажано во Табела 11, параметрите за соодветност на систем ги задоволуваат воспоставените критериуми за прифатливост, а вредностите на RSD остануваат $\leq 2,00\%$, што потврдува дека малите варијации во односот на компонентите од мобилната фаза не влијаат значајно врз соодветноста на систем.

При варијација на рН-вредноста (2,9 и 3,3) (Табела 12), и покрај очекуваните промени во ретенцијата, параметрите за соодветност на систем остануваат во прифатливите граници, а вредностите на RSD се $\leq 2,00\%$, што укажува на стабилни перформанси на системот и при мали отстапувања од работната рН-вредност.

Имајќи ги предвид добиените резултати, може да се заклучи дека аналитичкиот метод е робустен, односно ги задржува перформансите при мали, но намерни варијации на условите.

6.1.3. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод

Сите поединечни вредности за k' се во рамките на критериумот за прифатливост, односно се движат помеѓу 2–10 (Bliesner, 2005), што укажува на соодветна распределба на мелоксикам помеѓу стационарната и мобилната фаза.

Исто така, сите поединечни вредности за A_s се во рамки на критериумот за прифатливост, односно се движат помеѓу 0,8–1,8 (Council of Europe, 2026b), што потврдува дека добиените хроматографски пикови на мелоксикам поседуваат соодветен степен на симетрија.

Понатаму, сите поединечни вредности за N се во рамки на критериумот за прифатливост, односно ≥ 1000 (Bliesner, 2005), што укажува дека употребената колона во HPLC системот ја поседува потребната ефикасност за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање.

Конечно, сите вредности на RSD, пресметани од поединечните вредности за параметрите за соодветност на систем, се во рамки на критериумот за прифатливост, односно $\leq 2,00\%$ (Bliesner, 2005), што укажува на стабилен одговор на системот. Согласно тоа, може да се заклучи дека употребениот HPLC систем е соодветен за изведба на методот за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање.

6.1.4. Проценка на мерната неодреденост

При примена на пристапот одозгора-надолу, содржината на мелоксикам, изразена заедно со проширената мерна неодреденост, изнесува $14,967 \pm 0,336$ mg по дозирана единица, што соодветствува на интервал од 14,631–15,303 mg при ниво на доверба од 95% ($k = 2$). Овој интервал ја одразува вкупната варијабилност на резултатот, утврдена врз основа на експериментално определената прецизност и пристрасност на аналитичкиот метод, и претставува реалистична проценка на очекуваната неодреденост при неговата рутинска примена.

Од друга страна, при примена на пристапот одоздола-нагоре, конечниот резултат за содржината на мелоксикам изнесува $14,967 \pm 0,646$ mg по дозирана единица, што соодветствува на интервал од 14,321–15,613 mg при истото ниво на доверба од 95% ($k = 2$). Поширокиот интервал на проширената неодреденост кај овој пристап е очекуван, бидејќи покрај придонесите од прецизноста и пристрасноста на методот, експлицитно се вклучуваат и квантифицираат поединечните извори на неодреденост поврзани со подготовката на растворите.

И покрај разликите во концептот и во обемот на вклучените извори на неодреденост, примената на двата пристапи покажува дека добиените резултати, заедно со нивните соодветни проширени неодредености, остануваат во рамките на регулаторно дефинираните спецификациски граници од 95,0–

105,0% од декларираната содржина. Дополнително, дури и во гранични (worst-case) сценарија, интервалите на проширената неодреденост добиени во оваа студија, не би ги надминале спецификациските граници, што укажува дека аналитичкиот метод обезбедува научно заснована и сигурна основа за регулаторно прифаќање на резултатите.

6.2. Градиентен метод за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање во присуство на неговите онечистувања

6.2.1. Развој и оптимизација на аналитичкиот метод

Развојот на SIM за определување на содржината на мелоксикам во раствор за инјектирање, во присуство на неговите сродни супстанции, беше спроведен согласно принципите на AQbD, преку интегриран пристап кој комбинира предиктивно хроматографско моделирање и статистички насочено истражување базирано на DoE.

Стратегијата за развој беше насочена кон обезбедување соодветна селективност, односно резолуција, во согласност со целта на аналитичкиот метод. Оттука, изборот и оптимизацијата на хроматографските услови беа водени од пристап ориентиран кон онечистувањата (сродни супстанции и/или деградациски производи), со посебен фокус на раздвојувањето на критичните пикови и обезбедување стабилни перформанси на методот при реални и контролирани варијации на работните параметри.

Во таа насока беше воспоставен работен тек за развој, оптимизација и верификација на методот со комбинирана употреба на софтверите DryLab® и MODDE®. Иако работниот тек, прикажан на Слика 43, ја илустрира концептуалната интеграција на DoE и предиктивното моделирање, во практичната имплементација во ова истражување иницијалната оптимизација беше водена преку DryLab®, со цел предиктивно моделирање и избор, односно финализација на градиентните услови. Потоа, MODDE® беше применет за потврда на робусноста со помош на DoE, како и за дефинирање на MODR.



Слика 43 Интегриран работен тек базиран на AQbD за развој на методи за следење на стабилноста со примена на MODDE® и DryLab®

Figure 43 Integrated AQbD-based workflow for the development of stability-indicating methods using MODDE® and DryLab®

Во рамките на воспоставениот пристап, развојот беше реализиран низ три меѓусебно поврзани фази:

- почетен скрининг на релевантни хроматографски параметри и нивното влијание врз ретенцијата и селективноста;
- дефинирање и оптимизација на градиентниот режим на елуирање преку предиктивно моделирање во DryLab® и *in silico* евалуација на различни сценарија;
- статистичка верификација на робусноста преку DoE во MODDE®, со идентификација на CMPs и дефинирање на MODR.

На овој начин, методот не беше воспоставен само како оптимален сет на услови, туку и како аналитички систем поткрепен со модели и експериментални докази за стабилни перформанси во рамките на дефинирани оперативни опсези.

Почетната фаза на развој на SIM беше насочена кон систематско испитување на клучните хроматографски параметри со најизразено влијание врз ретенцијата, селективноста и резолуцијата помеѓу мелоксикам и неговите сродни супстанции и/или деградациски производи. Во рамките на скринингот беа разгледани рН-вредноста на водената компонента, типот на органската компонента, протокот на мобилната фаза и условите за UV детекција.

Како дел од почетниот скрининг беа испитани две рН-вредности на водената компонента (рН 3 и рН 6), со цел да се процени нивното влијание врз ретенциското однесување и селективноста на анализираните соединенија. Овој избор претставува логично надоврзување на претходно развиениот изократски метод за определување на содржината на мелоксикам, кај кој работната рН-вредност беше поставена во кисел регион (рН 3,5), бидејќи методот беше фокусиран исклучиво на квантификација на API, без определување на сродните супстанции и/или деградациските производи.

При рН 3 беше забележано поповолно хроматографско однесување на мелоксикам, со поизразен и посиметричен пик, што е во согласност со искуството од изократскиот метод и ја потврдува соодветноста на пониските рН-вредности за анализа насочена кон квантификација на API. Меѓутоа, при овие услови беа забележани ограничувања во селективноста и раздвојувањето на одделни онечистувања, што ја намалува применливоста на ваквите услови за развој на SIM.

Наспроти тоа, при рН 6 беше постигната подобрена селективност и појасно раздвојување на онечистувањата, особено кај критичните пикови. Иако во одредени случаи симетријата на пикот на мелоксикам не беше оптимална како кај пониските рН-вредности, изборот на рН 6 се покажа оправдан во контекст на целта на методот за следење на онечистувањата, при што приоритетот беше ставен на сигурна детекција и квантификација на сродните супстанции и/или деградациските производи. Следствено, рН 6 беше избрана како работна рН-вредност за понатамошниот развој и оптимизација на градиентниот метод, со што јасно се нагласува разликата во аналитичката стратегија помеѓу изократскиот и градиентниот метод.

Во рамките на скринингот беа разгледани ацетонитрил и метанол како органски компоненти, како и два протока на мобилната фаза (1,0 mL/min и 1,3 mL/min). При употреба на ацетонитрил беше забележана поизразена јачина на

елуирање и подобра дефинираност на пиковите, со пократки ретенциски времиња и поповолна селективност во споредба со метанолот. Дополнително, ацетонитрилот овозможи попрецизна и пофлексибилна контрола на градиентниот профил, што е особено важно кај SIMs.

Во однос на протокот, зголемувањето на протокот на 1,3 mL/min го скрати времетраењето на анализата, но беше придружено со намалување на хроматографската ефикасност и компромитирана резолуција кај критичните пикови. Поради потребата од рамнотежен однос помеѓу времето на анализа и квалитетот на раздвојувањето, проток од 1,0 mL/min беше избран како работен проток за понатамошниот развој на методот.

Со цел да се обезбеди соодветна чувствителност и селективност при детекцијата, во текот на развојот беа анализирани UV спектрите на мелоксикам и на разгледуваните онечистувања. Резултатите покажаа дека мелоксикам и онечистувањата А, С и D имаат изразена апсорпција при бранова должина од околу 350 nm, додека онечистувањето В покажува максимална апсорпција при пониска бранова должина, односно околу 260 nm.

Врз основа на тоа, беше применета двојна детекција, при што мелоксикам и онечистувањата А, С и D се следат на 350 nm, а онечистувањето В на 260 nm. Овој пристап овозможува оптимална детекција на сите соединенија во рамките на истиот метод и дополнително ја зајакнува способноста на методот за следење на сродните супстанции и/или деградациските производи.

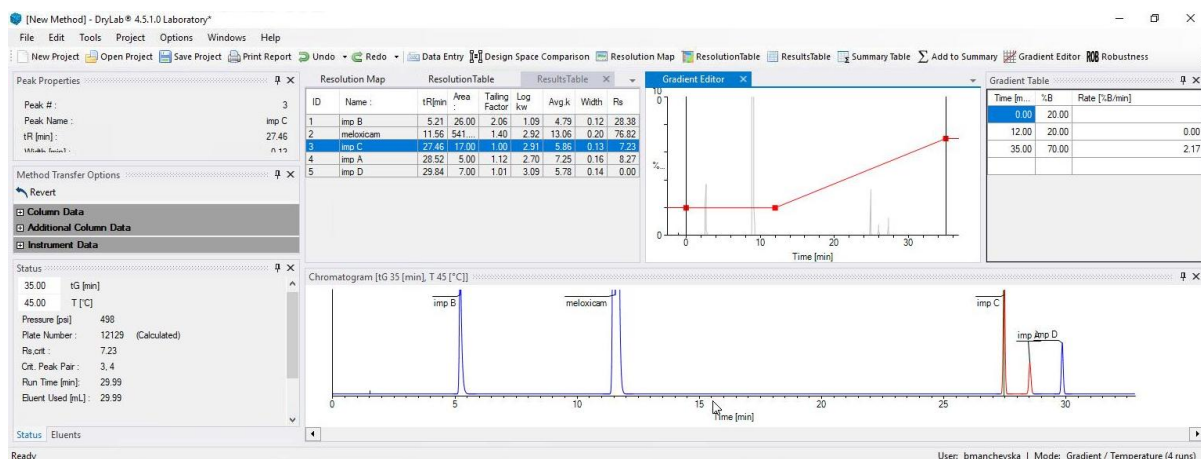
По дефинирањето на основните хроматографски услови, следната фаза беше насочена кон рационално воспоставување и оптимизација на градиентниот режим на елуирање. Поради комплексноста на системот и потребата од сигурно раздвојување на мелоксикам од неговите сродни супстанции и/или деградациски производи, беше применет предиктивен пристап со употреба на DryLab®.

За воспоставување на предиктивен модел на ретенцијата, DryLab® беше калибриран врз основа на експериментално добиени хроматограми под избраните работни услови. Како влезни податоци беа искористени хроматограми од:

- стандардот за соодветност на систем според ВР;
- поединечните стандардни раствори на онечистувањата А, В, С и D;
- стандарден раствор на мелоксикам;
- примероци од растворот за инјектирање.

Овој избор ги опфати сите релевантни соединенија и нивното ретенциско однесување, без потреба од обемен експериментален сет.

Врз основа на внесените податоци, DryLab® генерираше модели на ретенциското однесување на мелоксикам и на испитуваните онечистувања, овозможувајќи *in silico* евалуација на различни варијанти на градиентниот профил. Моделот на раздвојување е прикажан на Слика 44.



Слика 44 *In silico* модел на раздвојување и оптимизација на градиентниот профил во DryLab®

Figure 44 *In silico* separation and gradient profile optimization in DryLab®

Споредбата помеѓу предвидените и експериментално добиените ретенциски времиња е прикажана во Табела 44.

Табела 44 Споредба на предвидени и експериментално добиени ретенциски времиња за мелоксикам и соодветните онечистувања

Table 44 Comparison of predicted and experimentally obtained retention times for Meloxicam and the corresponding impurities

Соединение	R_t ; експериментално (минути)	R_t ; DryLab® (минути)	ΔR_t (минути)
Мелоксикам	7,459	11,560	+4,101
Онечистување А	27,540	28,520	+0,980
Онечистување В	4,563	5,210	+0,647
Онечистување С	26,862	27,460	+0,598
Онечистување D	29,325	29,840	+0,515

Иако DryLab[®] покажа одлична согласност помеѓу предвидените и експериментално измерените ретенциски времиња за онечистувањата (со најмало отстапување кај онечистувањата D и C, и прифатливо отстапување кај онечистување A), кај мелоксикам беше забележано поголемо отстапување во апсолутното ретенциско време. Сепак, ова отстапување не се смета за критично во контекст на целта на методот, бидејќи клучниот критериум е обезбедување сигурна селективност и раздвојување помеѓу мелоксикам и сродните супстанции и/или деградациски производи.

Во сите разгледувани сценарија, DryLab[®] коректно го предвиде редоследот на елуирање и ја потврди можноста за јасно раздвојување на пиковите, што беше потврдено и експериментално преку репрезентативните хроматограми. Оттука, и покрај пониската точност во апсолутната предикција на ретенциското време за API, предиктивниот модел останува корисна и валидна алатка за рационална оптимизација на градиентот и за обезбедување робусна селективност во рамките на пристапот базиран на AQbD.

Врз основа на предикциите направени од DryLab[®] и експерименталната верификација на ретенциското однесување, беше дефиниран конечен градиентен профил кој обезбедува соодветно раздвојување на сите релевантни аналити во прифатливо времетраење на анализата. Конечниот градиентен режим вклучува почетен изократски сегмент, линеарен градиент за раздвојување на анализите со различна поларност и фаза на рееквилибрација, со што се овозможува стабилна и репродуктивна примена на методот.

Примената на DryLab[®] овозможи рационална и насочена оптимизација, при што конечниот градиентен профил беше дефиниран врз основа на предиктивно моделирање со експериментална потврда.

6.2.2. Валидација на аналитичкиот метод

За да се демонстрира селективноста кај HPLC метод за определување на онечистувања, потребно е експериментално да се потврди дека секое онечистување може јасно да се детектира и квантифицира во присуство на API и матриксот, без коелуирање и без преклопување на пиковите. Ова најчесто се докажува преку репрезентативни хроматограми со јасно означени компоненти, при што се потврдува отсуството на интерференции од растворувачот и плацебо растворот, како и отсуството на интерференции меѓу API и поединечните онечистувања (Bliesner, 2005; ICH Q2(R2), 2023).

Во конкретниот случај, селективноста беше оценета преку споредба на хроматограмите добиени од растворувачот (Слики 14 и 15), плацебо растворот (Слики 16 и 17), стандардниот раствор на мелоксикам (Слики 18 и 19), како и поединечните стандардни раствори на онечистувањата А (Слики 20 и 21), В (Слики 22 и 23), С (Слики 24 и 25) и D (Слики 26 и 27). Притоа, се следеше присуството на потенцијални интерферирачки пикови на ретенциските времиња карактеристични за секоја компонента, како и можни интерференции од растворувачот и плацебо растворот.

Како што е прикажано во Табела 18, пиковите на мелоксикам и онечистувањата А, В, С и D се јавуваат на различни ретенциски времиња при детекција на 260 nm и 350 nm, што укажува на соодветна селективност и отсуство на ризик од коелуирање или преклопување. Дополнително, во хроматограмите од растворувачот и плацебо растворот не беа детектирани пикови на ретенциски времиња соодветни за мелоксикам и за испитуваните онечистувања, што потврдува отсуство на интерференции од матриксот.

Понатаму, селективноста се потврдува и преку хроматограмите добиени од мешаниот стандарден раствор (Слики 28 и 29), каде што се забележува јасно раздвојување на сите компоненти. Врз основа на наведеното, може да се заклучи дека методот овозможува јасно и недвосмислено мерење на сигналите за мелоксикам и неговите онечистувања во матриксот на примерокот, без интерференции од растворувачот, ексципиенсите и останатите присутни компоненти.

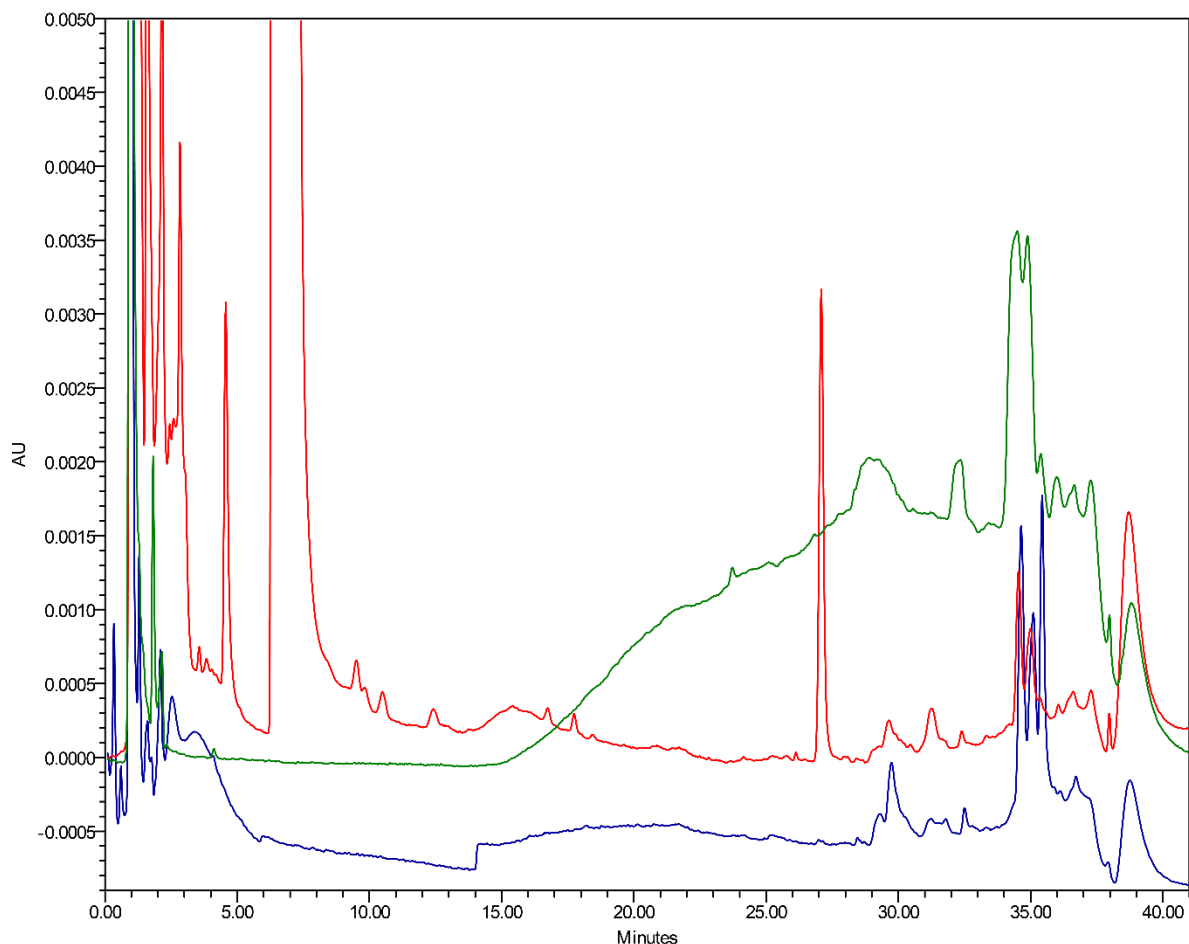
Во однос на студиите на форсирана деградација, за сите изведени услови беа добиени нивоа на деградација во рамките на општоприфатениот опсег (5–20%), при што промените беа следени на 260 nm и 350 nm.

Киселата хидролиза резултираше со намалување на содржината на мелоксикам за 6,05% на 260 nm и за 5,30% на 350 nm. Слично, базната хидролиза доведе до умерена деградација (5,04% на 260 nm и 5,60% на 350 nm), при што беа воочени релативно мали промени во профилот на деградациските производи, што укажува на добра стабилност на мелоксикам во базна средина. Најизразени промени се забележаа при оксидативната деградација, што укажува на висока чувствителност на мелоксикам кон оксидација. Во овие услови, содржината на мелоксикам се намали за 13,22% на 260 nm, односно за 15,48% на 350 nm. Термалниот стрес предизвика умерен пад на содржината на

мелоксикам (5,14% на 260 nm и 6,13% на 350 nm), што сугерира дека мелоксикам е постабилен на покачена температура во споредба со оксидативните услови.

Во сите случаи, намалувањето на содржината на мелоксикам беше придружено со појава и/или зголемување на содржината на деградациските производи, што ја потврдува очекуваната корелација помеѓу распаѓањето на API и формирањето на деградациски производи. За да се оцени успешноста на применетиот пристап, за секоја студија на форсирана деградација беше применет концептот на баланс на маса. Добиените резултати за баланс на маса се движееа блиску до 100% во сите услови: при кисела хидролиза 101,53% (260 nm) и 100,23% (350 nm), при базна хидролиза 98,09% (260 nm) и 98,89% (350 nm), при оксидативна деградација 101,77% (260 nm) и 98,55% (350 nm) и при термална деградација 99,83% (260 nm) и 100,50% (350 nm). Врз основа на добиените вредности за балансот на маса, може да се заклучи дека главните деградациски производи се соодветно детектирани и квантифицирани при воспоставените услови на хроматографскиот метод.

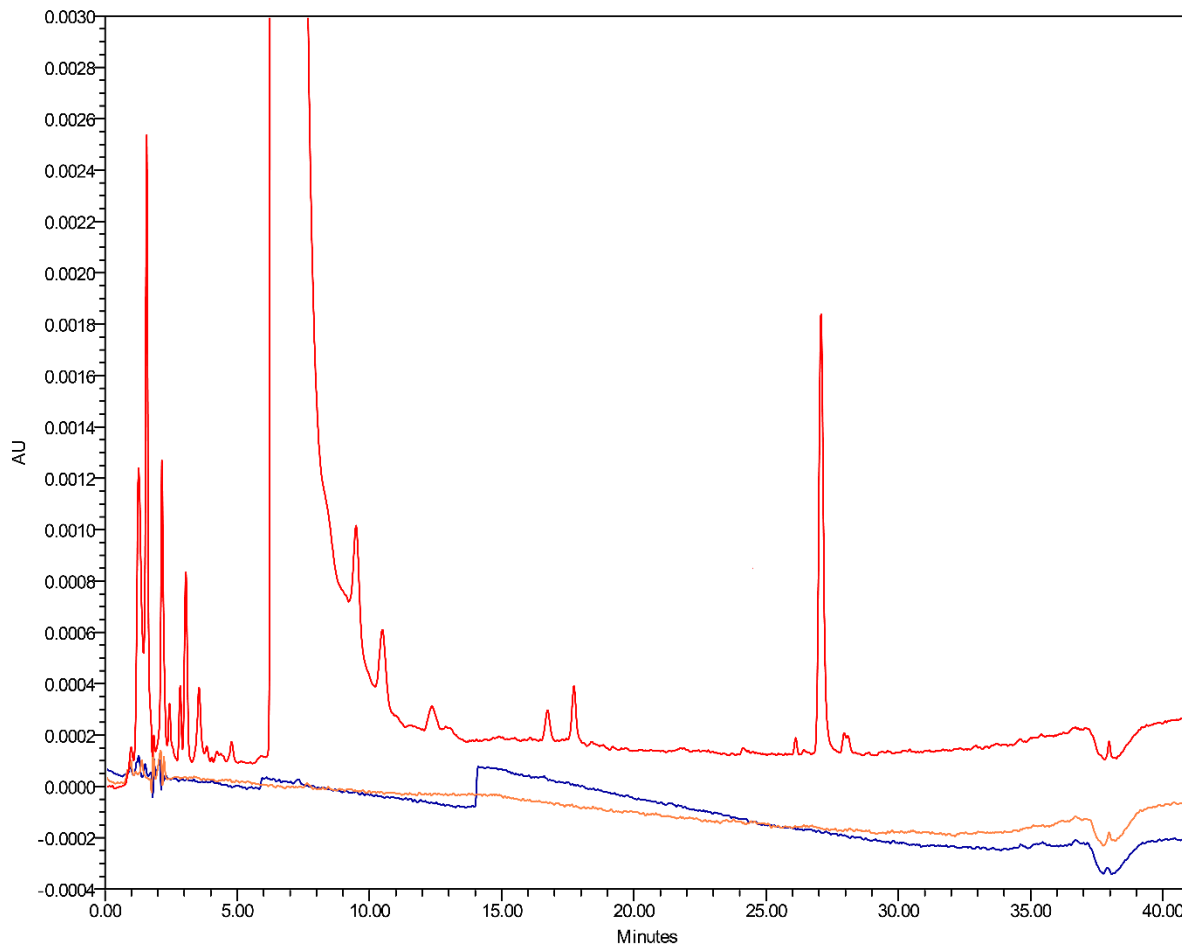
При изведба на кисела хидролиза, на 260 nm се забележува појава на онечистување А (3,21%), изразено зголемување на содржината на онечистување В од 0,15% на 3,05%, како и пораст на вкупната содржина на неспецифицирани деградациски производи од 0,63% на 2,10%.



Слика 45 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по кисела хидролиза (260 nm)

Figure 45 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after acidic hydrolysis (260 nm)

На 350 nm повторно доминира онечистување А (4,45%), додека онечистување В не се детектира, што е очекувано со оглед на тоа дека ова соединение нема значајна апсорпција на бранова должина од 350 nm.

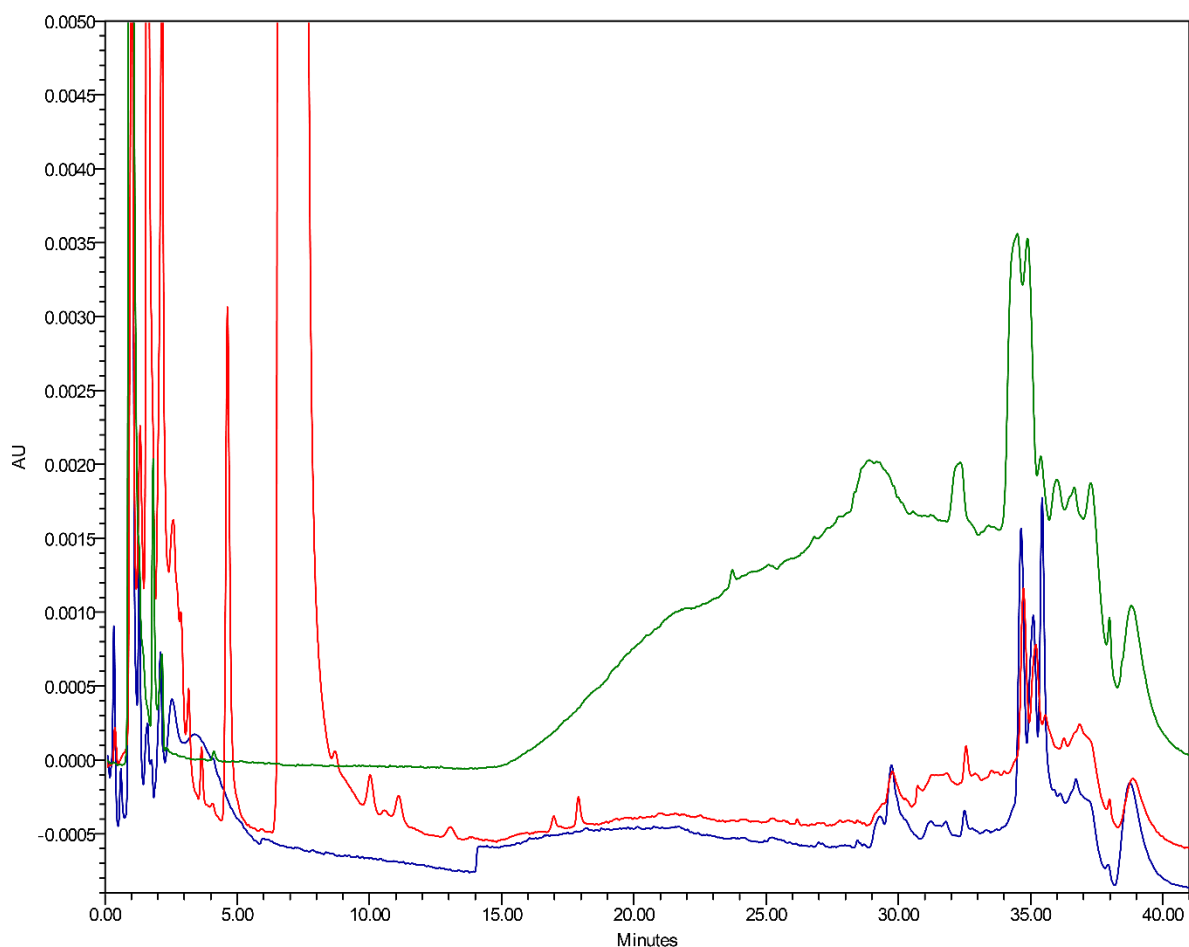


Слика 46 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по кисела хидролиза (350 nm)

Figure 46 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after acidic hydrolysis (350 nm)

Врз основа на преглед на литературните податоци, утврдено е дека при кисела хидролиза на мелоксикам, настанува раскинување на амидната врска, при што како деградациски производ се добива онечистување В (Starek & Krzek, 2012). Дополнително, во кисела средина може да се формираат и производи што го задржуваат бензотиазинскиот прстен на мелоксикам, но се модифицирани во карбоксаמידниот дел од молекулата. Такво соединение е онечистување А, кај кое на оваа позиција е присутна естерска, наместо амидна група.

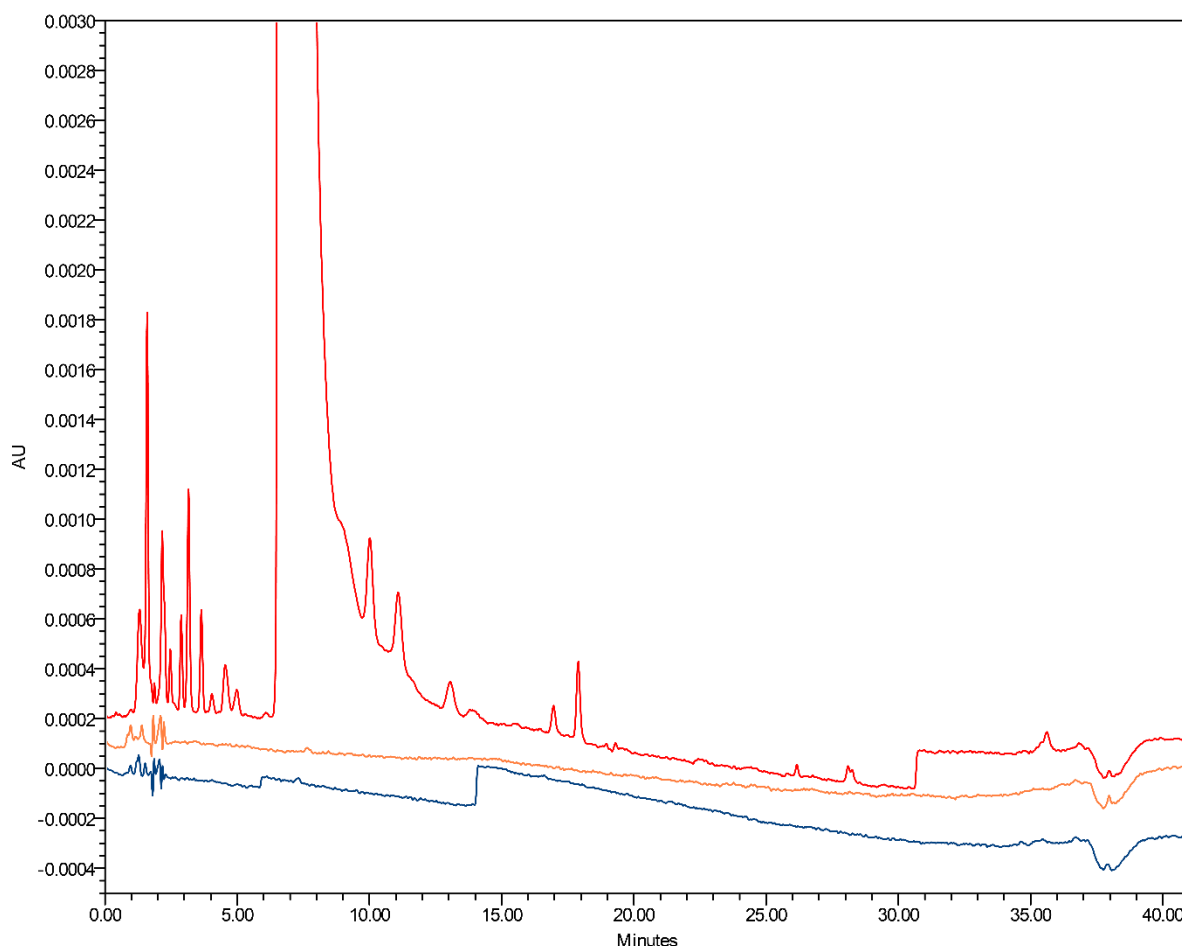
Кога станува збор за базната хидролиза, на 260 nm се забележува промена во содржината на онечистување В. Имено, ова онечистување е присутно уште пред деградацијата (0,15%), а по базната хидролиза, неговата содржина се зголемува на 0,97%. Иако се регистрира пораст, апсолутната промена останува релативно мала, така што содржината на онечистување В и по деградацијата е под 1%. Истовремено, на оваа бранова должина се забележува пораст на неспецифицираните деградациски производи, што се одразува како зголемување на вкупната содржина на онечистувања.



Слика 47 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по базна хидролиза (260 nm)

Figure 47 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after alkaline hydrolysis (260 nm)

На бранова должина од 350 nm, каде онечистување В не се детектира, промените вклучуваат умерено намалување на содржината на мелоксикам и соодветен пораст на вкупната содржина на онечистувања, како резултат на формирање на неспецифицирани деградациски производи.

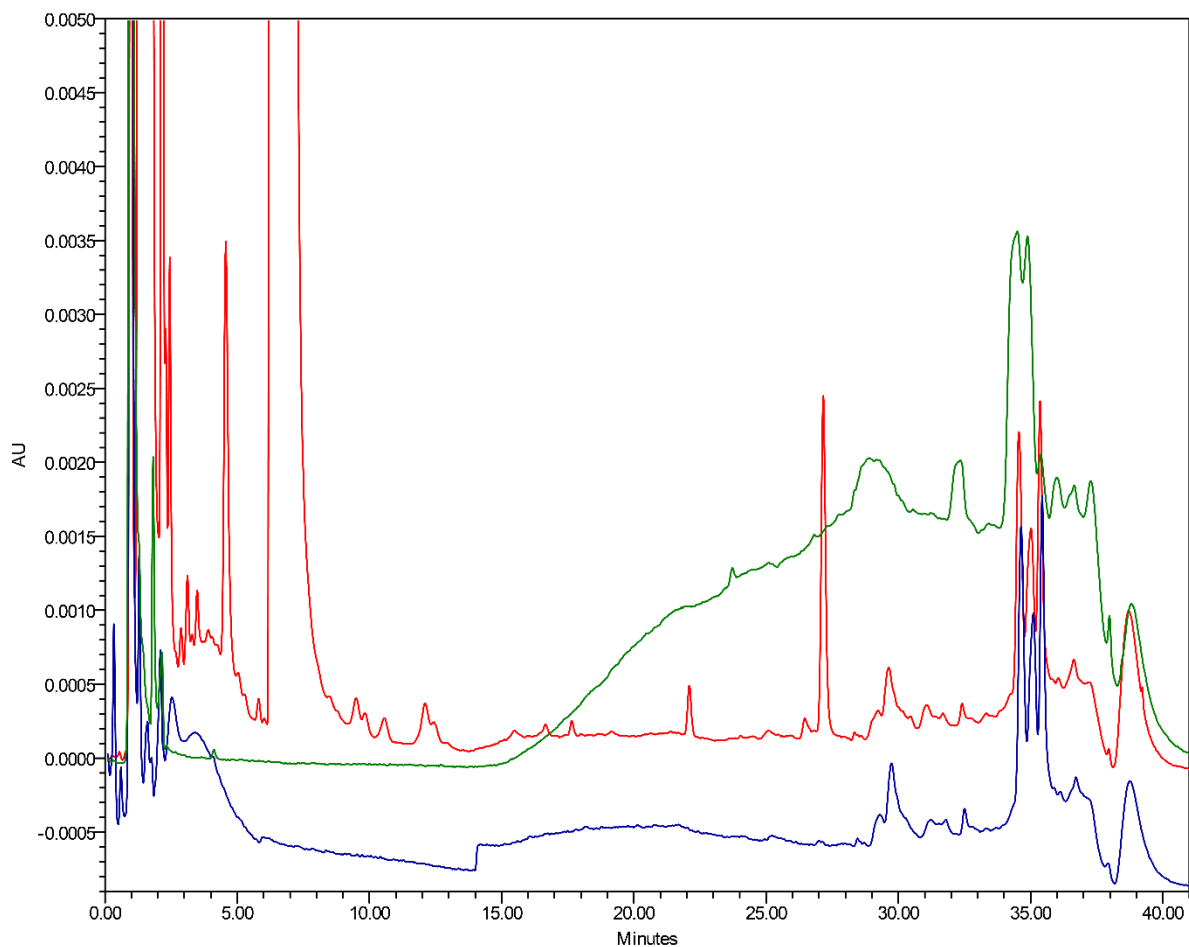


Слика 48 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по базна хидролиза (350 nm)

Figure 48 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after alkaline hydrolysis (350 nm)

Добиените резултати од базната хидролиза се во согласност со податоци од литературата, според кои мелоксикам покажува добра стабилност во базна средина (дури и при поагресивни услови, како третман под рефлукс), за разлика од киселата средина во која деградацијата и формирањето на деградациски производи се поизразени (Suntornsuk et al., 2005; Bandarkar & Vavia, 2009).

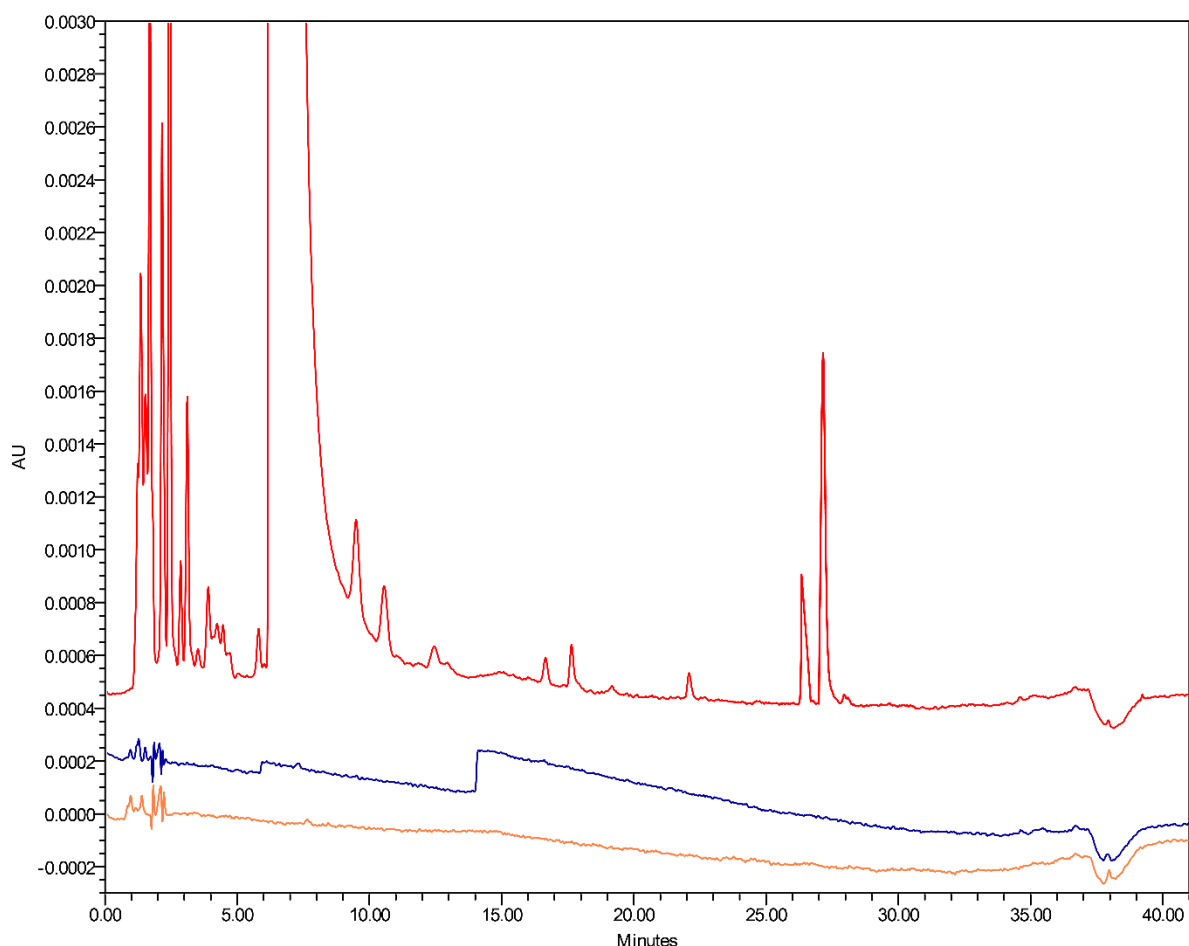
При оксидативна деградација, на 260 nm се забележува зголемена комплексност на профилот на деградациски производи. Најизразена промена се воочува кај онечистување В, чија содржина се зголемува од 0,15% на 6,16%. Паралелно, се бележи појава и на другите онечистувања: А (4,57%), С (0,52%) и Д (0,94%). Освен специфицираните, пораст бележат и неспецифицираните деградациски производи, и тоа од 0,63% на 3,58%.



Слика 49 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по оксидативна деградација (260 nm)

Figure 49 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after oxidative degradation (260 nm)

На 350 nm доминира појавата на онечистување А (10,22%) и онечистување С (3,15%), придружена со умерен пораст на неспецифицираните деградациски производи од 0,54% на 1,19%. Онечистување В не се детектира на оваа бранова должина, што е очекувано, имајќи предвид дека не покажува значајна апсорпција на 350 nm.

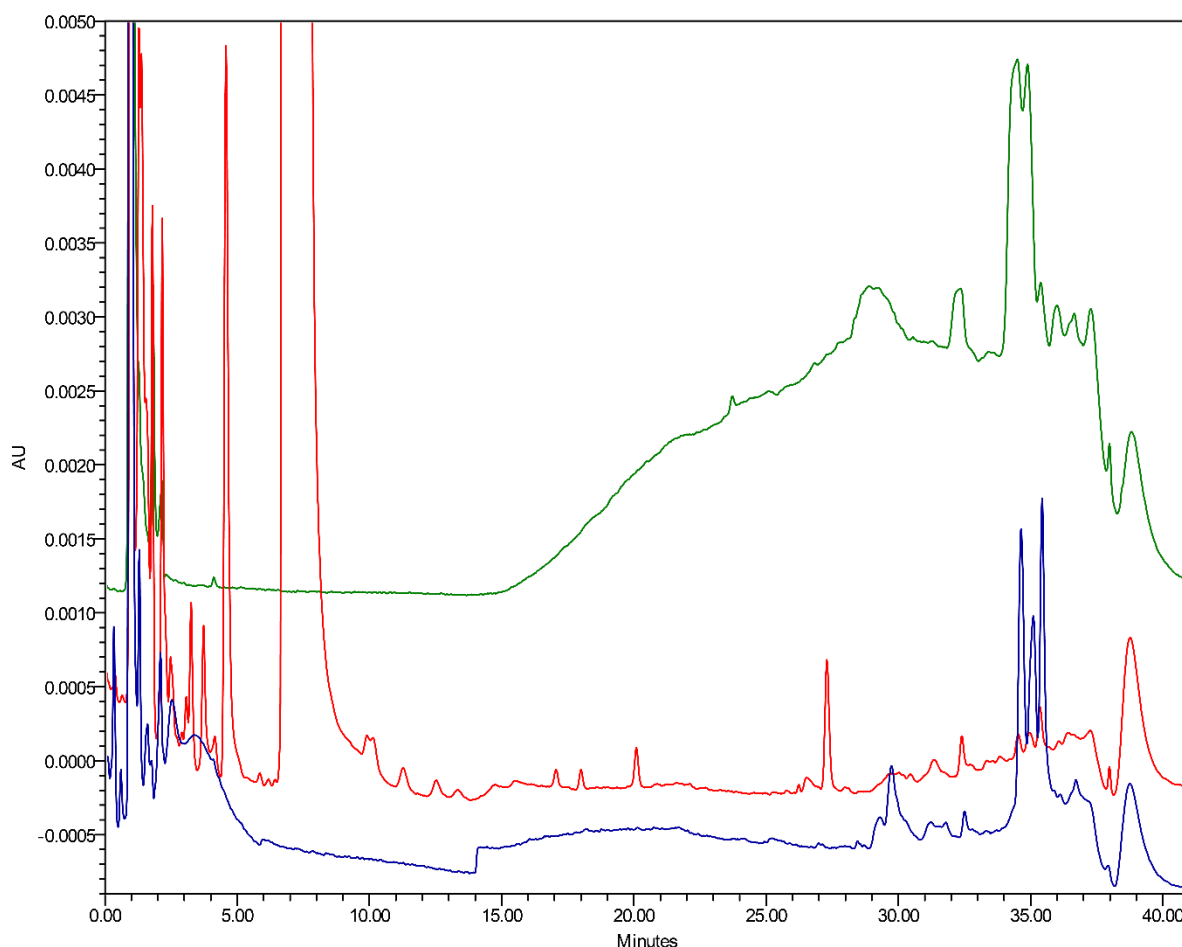


Слика 50 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по оксидативна деградација (350 nm)

Figure 50 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after oxidative degradation (350 nm)

Според литературните податоци, механизмот на оксидативните деградациски патишта на мелоксикам се поврзува со додавање синглет кислород ($^1\text{O}_2$) на енолниот дел од молекулата и формирање на пероксидни интермедиери. Поради овој механизам, при оксидативна деградација главно се формираат повеќе деградациски производи (Modhave et al., 2011).

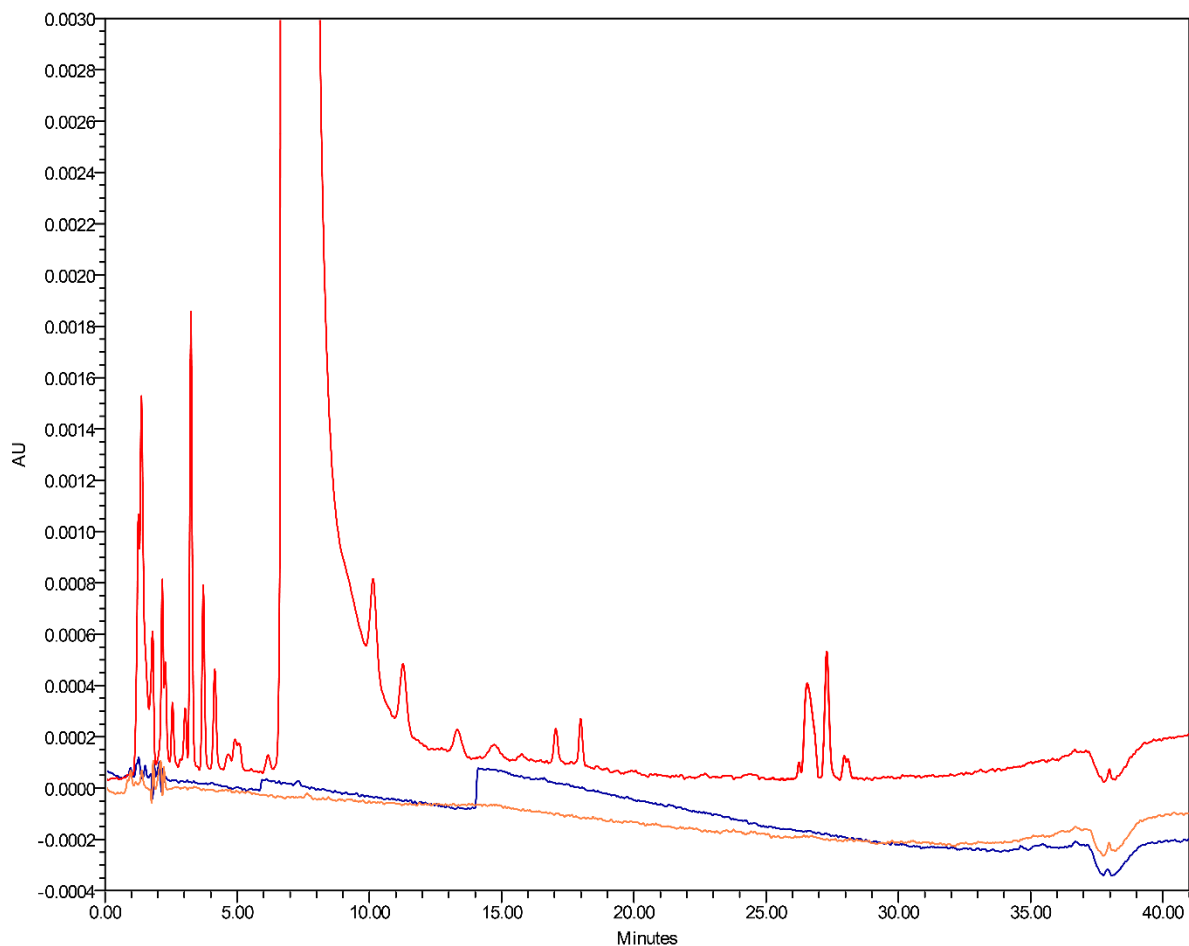
При термална деградација, на 260 nm најизразена промена се забележува кај онечистување В, чија содржина се зголемува од 0,15% на 4,12%. Паралелно, се квантифицира и онечистување А (1,01%), додека вкупната содржина на неспецифицирани деградациски производи практично останува непроменета. Оттука, при термална деградација главно се фаворизира формирањето на онечистување В, без значајно зголемување на содржината на другите деградациски производи на оваа бранова должина.



Слика 51 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по термална деградација (260 nm)

Figure 51 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after thermal degradation (260 nm)

На 350 nm, термалната деградација е проследена со појава на онечистување А (2,11%) и онечистување С (1,82%), како и пораст на вкупната содржина на неспецифицирани деградациски производи од 0,54% на 3,24%. Како и претходно, онечистување В не се детектира на оваа бранова должина.



Слика 52 Преклопени хроматограми од **растворувач**, **плацебо раствор** и **примерок за анализа** по термална деградација (350 nm)

Figure 52 Overlay chromatograms of the **solvent**, **placebo solution**, and **sample solution** after thermal degradation (350 nm)

Добивањето на специфицираните деградациски производи на соодветните бранови должини по термална деградација на мелоксикам е во согласност со литературните податоци, имајќи предвид дека во протоколот е применета температура од 80 °C, а при температури до 70 °C мелоксикам формира ограничен број деградациски производи и во релативно ниски количества (Jiménez et al., 2018).

Линеарноста кај методи за определување на онечистувања се смета за прифатлива доколку вредноста на r е поголема или еднаква на 0,99 ($\geq 0,99$) (Kazusaki et al., 2012).

Опсегот кај ваков тип методи треба да ги опфати концентрациите од прагот на пријавување за релевантните онечистувања, кој се дефинира во зависност од MDD, до 120% од работната концентрација за испитување на линеарноста (ICH Q3B(R2), 2006; Kazusaki et al., 2012; ICH Q2(R2), 2023). Како што може да се забележи од Табела 21, со цел да се обезбеди повисока чувствителност и поголема релевантност на податоците, овој регулаторно дефиниран опсег беше дополнително проширен кон пониско ниво, односно до 0,05%, што соодветствува на 0,001 mg/mL во однос на концентрацијата на примерокот за анализа, односно 25% во однос на работната концентрација за испитување на линеарноста.

LOD и LOQ се определуваат врз основа на односот S/N, при што S/N \approx 3:1 се смета за прифатлив за проценка на LOD, додека за LOQ односот S/N треба да биде еднаков или поголем од 10:1 ($\geq 10:1$) (Bliesner, 2005; ICH Q2(R2), 2023).

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 22, за мелоксикам беше добиена следнава равенка на регресиона права:

$$y = 6009757,3657x - 228,4818$$

каде што x ја карактеризира концентрацијата на мелоксикам, а y ја карактеризира AUC ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$).

Вредноста на R^2 изнесува 0,9999, а пресметаната вредност на r е 0,99995, што е во согласност со критериумот за прифатливост. Ова потврдува постоење на линеарна зависност помеѓу концентрацијата на мелоксикам и аналитичкиот одговор во испитуваниот опсег, при што линеарноста останува задоволителна и на ниво од 25% од работната концентрација.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 23, LOD за мелоксикам изнесува 0,0002 mg/mL, со оглед дека односот S/N при оваа концентрација е приближно 3:1, додека LOQ изнесува 0,00072 mg/mL, бидејќи односот S/N при оваа концентрација е околу 10:1.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 24, за онечистување А беше добиена следнава равенка на регресиона права:

$$y = 5018609,1854x - 304,0832$$

каде што x ја карактеризира концентрацијата на онечистување А, а y ја карактеризира AUC (с).

Вредноста на R^2 изнесува 1,0000, при што и пресметаната вредност на r е 1,0000, што е во согласност со критериумот за прифатливост. Ова потврдува постоење на линеарна зависност помеѓу концентрацијата на онечистување А и аналитичкиот одговор во испитуваниот опсег, при што линеарноста останува задоволителна и на ниво од 25% од работната концентрација.

Врз основа на добиените податоци прикажани во Табела 25, LOD за онечистување А изнесува 0,00032 mg/mL, со оглед дека односот S/N при оваа концентрација е приближно 3:1, додека LOQ изнесува 0,0010 mg/mL, бидејќи односот S/N при оваа концентрација е околу 10:1.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 26, за онечистување В беше добиена следнава равенка на регресиона права:

$$y = 29616754,7660x - 1290,1941$$

каде што x ја карактеризира концентрацијата на онечистување В, а y ја карактеризира AUC ($\mu V \cdot s$).

Вредноста на R^2 изнесува 1,0000, при што и пресметаната вредност на r е 1,0000, што е во согласност со критериумот за прифатливост. Ова потврдува постоење на линеарна зависност помеѓу концентрацијата на онечистување В и аналитичкиот одговор во испитуваниот опсег, при што линеарноста останува задоволителна и на ниво од 25% од работната концентрација.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 27, LOD на онечистување В изнесува 0,00008 mg/mL, со оглед дека односот S/N при оваа концентрација е приближно 3:1, додека LOQ изнесува 0,00028 mg/mL, бидејќи односот S/N при оваа концентрација е околу 10:1.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 28, за онечистување С беше добиена следнава равенка на регресиона права:

$$y = 14235745,2340x - 1047,8059$$

каде што x ја карактеризира концентрацијата на онечистување С, а y ја карактеризира AUC ($\mu V \cdot s$).

Вредноста на R^2 изнесува 0,9999, а пресметаната вредност на r е 0,99995, што е во согласност со критериумот за прифатливост. Ова потврдува постоење на линеарна зависност помеѓу концентрацијата на онечистување С и

аналитичкиот одговор во испитуваниот опсег, при што линеарноста останува задоволителна и на ниво од 25% од работната концентрација.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 29, LOD за онечистување С изнесува 0,00004 mg/mL, со оглед дека односот S/N при оваа концентрација е приближно 3:1, додека LOQ изнесува 0,0002 mg/mL, бидејќи односот S/N при оваа концентрација е околу 10:1.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 30, за онечистување D беше добиена следнава равенка на регресиона права:

$$y = 1643834,4887x - 99,3501$$

каде што x ја карактеризира концентрацијата на онечистување D, а y ја карактеризира AUC ($\mu V \cdot s$).

Вредноста на R^2 изнесува 0,9998, а пресметаната вредност на r е 0,9999, што е во согласност со критериумот за прифатливост. Ова потврдува постоење на линеарна зависност помеѓу концентрацијата на онечистување D и аналитичкиот одговор во испитуваниот опсег, при што линеарноста останува задоволителна и на ниво од 25% од работната концентрација.

Врз основа на обработените податоци прикажани во Табела 31, LOD за онечистување D изнесува 0,0008 mg/mL, со оглед дека односот при оваа концентрација е приближно 3:1, додека LOQ изнесува 0,002 mg/mL, бидејќи односот S/N при оваа концентрација е околу 10:1.

Критериумите за прифатливост што се применуваат за оценување на точноста и прецизноста кај методите за определување на онечистувања најчесто се дефинираат во интерни стандардни оперативни постапки (Standard Operating Procedures, SOPs) и протоколи за валидација, наместо да бидат универзално пропишани со единствен регулаторен документ, бидејќи прифатливите граници зависат од нивото на онечистувањата, работниот опсег и ефектите од матриксот.

Во конкретниот случај, точноста се оценува преку аналитичкиот принос, при што се применуваат следниве критериуми за прифатливост:

- поединечните вредности на аналитичкиот принос на секое од четирите концентрациски нивоа треба да се движат во интервал од 90,00–110,00%;
- вредностите на RSD за аналитичките приноси на секое од испитуваните концентрациски нивоа не треба да бидат поголеми од 10,00% ($\leq 10,00\%$).

Како што е прикажано во Табелите 32, 33, 34 и 35, поединечните вредности на аналитичките приноси на сите концентрациски нивоа се во рамките на критериумот за прифатливост. Дополнително, вредностите на RSD за аналитичките приноси на секое од четирите нивоа се под 10,00%. Овие резултати потврдуваат дека методот обезбедува точна квантификација на онечистувањата во раствор за инјектирање, со стабилни резултати во испитуваниот опсег.

Повторливоста се смета за прифатлива доколку вредноста на RSD за AUC од шесте последователни инјектирања на стандардниот раствор не е поголема од 5,00% ($\leq 5,00\%$). Како што е прикажано во Табела 36, при оценувањето на повторливоста, вредностите на RSD за AUC добиени од секое поединечно онечистување се во рамки на критериумот за прифатливост, што укажува дека методот е прецизен при работа под исти услови, за краток временски период, на ист стандарден раствор.

При оценување на интермедиерната прецизност беа воспоставени три критериуми за прифатливост:

- вредностите на RSD за резултатите добиени во една независна серија, односно од еден аналитичар, не треба да бидат поголеми од 5,00% ($\leq 5,00\%$);
- вредностите на комбинираната RSD за резултатите добиени од двете независни серии, односно од двата аналитичари, не треба да бидат поголеми од 10,00% ($\leq 10,00\%$);
- односот на варијансите пресметан со F-тест за секое поединечно онечистување треба да биде помал од критичната вредност при избраното ниво на значајност ($\alpha = 0,05$) (Miller & Miller, 2010; Marson et al., 2020).

Како што е прикажано во Табелите 37 и 38, вредностите на RSD за резултатите добиени од секој аналитичар поединечно се $\leq 5,00\%$ за сите онечистувања, со што е исполнет првиот критериум за прифатливост. Дополнително, вредностите за комбинираната RSD за сите онечистувања се $\leq 10,00\%$, што значи дека и вториот критериум за прифатливост е исполнет.

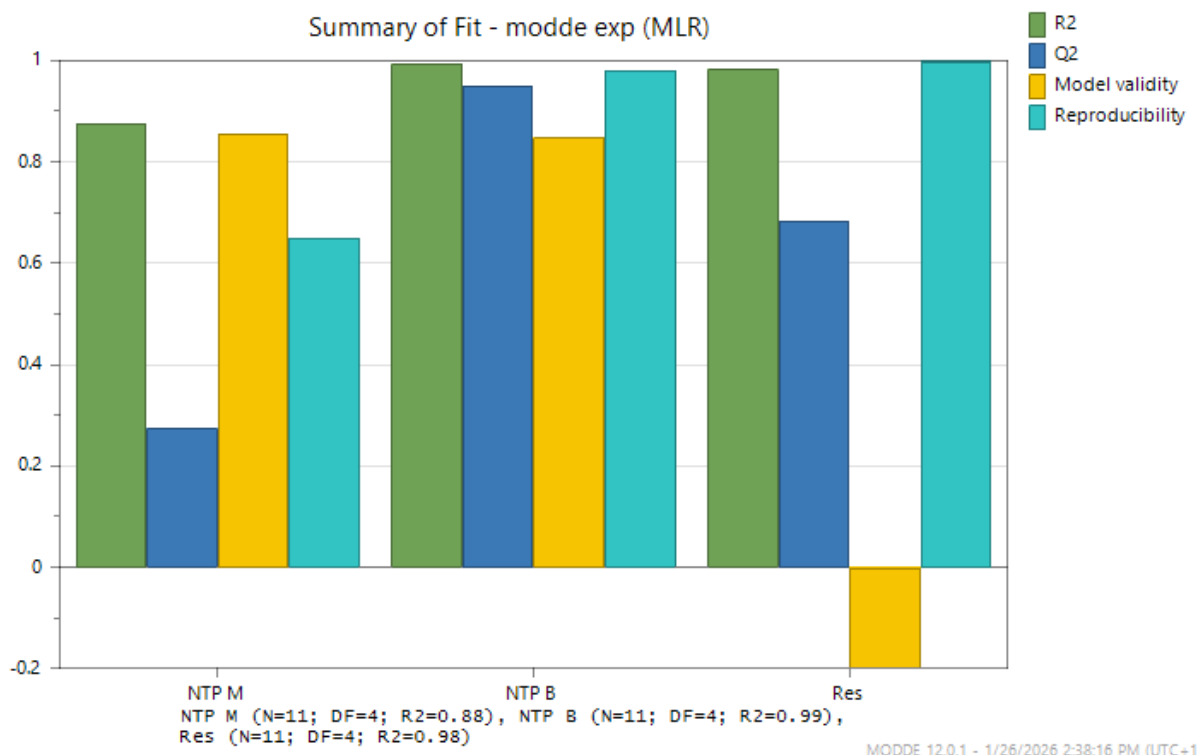
Бидејќи секој аналитичар изведе по шест анализи ($N = 6$), вредноста на степените на слобода за секоја серија изнесува $df_1 = df_2 = 5$, а критичната F-вредност при еднострано тестирање и $\alpha = 0,05$ изнесува 5,05. Пресметаните F-

вредности изнесуваат 1,00 за онечистување А, 1,50 за онечистување В, 1,57 за онечистување С и 1,14 за онечистување D. Со оглед дека сите пресметани F-вредности се помали од критичната F-вредност, може да се заклучи дека не постои статистички значајна разлика помеѓу варијансите на резултатите добиени од двата аналитичари.

Имајќи предвид дека сите критериуми за прифатливост се задоволени, може да се заклучи дека методот е прецизен при работа во еден ден, во иста лабораторија, од страна на два аналитичари.

Важно е да се нагласи дека критериумите за прифатливост се дефинирани во согласност со ИСН Q14, кој нагласува дека критериумите за точност и прецизност треба да бидат научно оправдани и поставени според целта на методот и работниот опсег, со цел да се обезбеди дека методот е соодветен за предвидената употреба и обезбедува сигурни резултати при рутинска примена.

Статистичката евалуација на воспоставените модели за проценка на робусноста на аналитичкиот метод се прикажани на Слика 53, при што за секој аналитички одговор се прикажани четири параметри: R^2 , Q^2 , валидност на моделот и репродуктивност. Овие параметри овозможуваат сеопфатна проценка на согласноста на моделот со експерименталните податоци, неговата предиктивна моќ и практичната применливост на воспоставените статистички модели.



Слика 53 Summary of Fit – параметри за квалитет на моделите базирани на DoE (R², Q², валидност на моделот и репродуктивност)

Figure 53 Summary of Fit – quality parameters of the DoE-based models (R², Q², model validity, and reproducibility)

Параметарот R² претставува мерка за согласноста на моделот со експерименталните податоци, односно покажува колкав дел од вкупната варијација на аналитичкиот одговор е објаснет со моделот. Кога R² > 0,8, може да се заклучи дека моделот соодветно ги опишува експерименталните податоци и обезбедува добра согласност со експериментално утврдената варијација. Во конкретниот случај, за сите разгледувани CQAs се добиени вредности за R² повисоки од 0,8, што укажува дека моделите добро ја опишуваат зависноста помеѓу CPPs и CQAs во рамките на испитуваниот простор на дизајн.

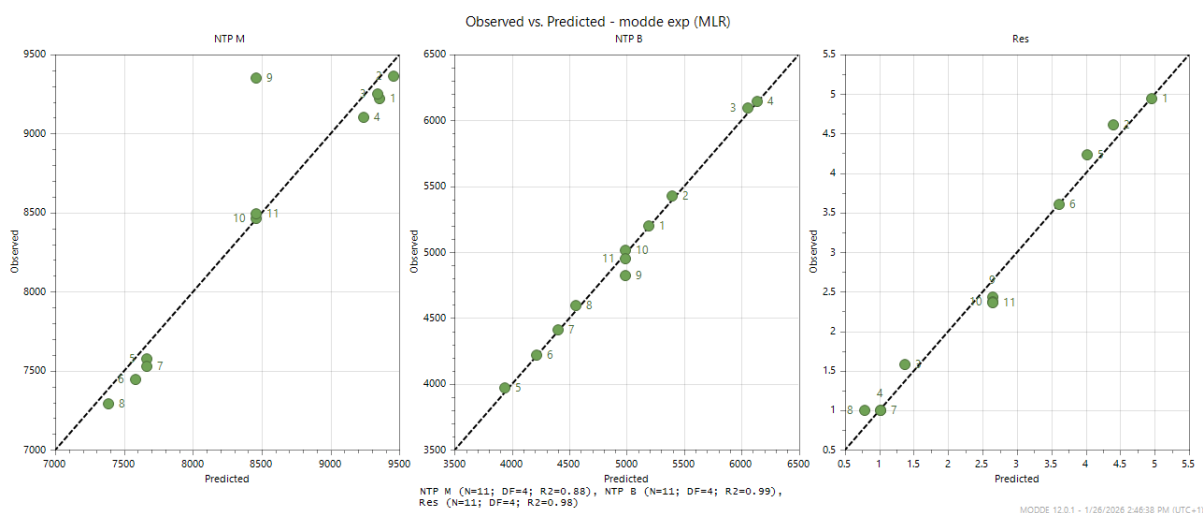
Параметарот Q² претставува мерка за предиктивната моќ на моделот, добиена преку вкрстена валидација, и укажува колку добро моделот може да предвиди нови, независни податоци. За корисен и стабилен модел, вообичаено се очекува Q² > 0,5. Во овој случај, моделот за N_b покажува висока вредност за Q², што укажува на одлична предиктивна способност. Кај моделот за R_s, Q² има пониска, но сè уште прифатлива вредност, што укажува на добра предиктивност

во рамките на испитуваниот простор на дизајн. Кај моделот за M_m , вредноста на Q^2 е пониска, што укажува на ограничена предиктивна моќ. Сепак, ова се смета за прифатливо, бидејќи M_m не претставува примарен CQA, туку секундарен показател за ефикасноста на системот.

Репродуктивноста ја претставува варијацијата на аналитичкиот одговор под исти експериментални услови во однос на вкупната варијација на одговорот. Притоа, варијацијата што се добива при повторување на мерењата под исти услови се дефинира како чиста грешка, односно експериментална грешка која потекнува од случајни флукуации на системот и постапката. Високата вредност на репродуктивност укажува на стабилен систем и мала експериментална грешка. Во конкретниот случај, за сите одговори е добиена висока репродуктивност, што укажува дека варијацијата на резултатите главно произлегува од контролираното влијание на испитуваните фактори, а не од случајни експериментални флукуации.

Параметарот валидност на моделот претставува мерка за присуство или отсуство на недоволна соодветност на моделот (lack-of-fit), односно ја споредува грешката на моделот со експерименталната грешка. Кога вредноста за овој параметар е поголема од 0,25, може да се заклучи дека не постои значајна недоволна соодветност на моделот, односно дека грешката на моделот е приближно во опсегот на експерименталната грешка. Во конкретниот случај, кај моделот за R_s е забележана ниска, односно негативна вредност за валидноста, што укажува на статистички детектирана недоволна соодветност на моделот. Ваквиот резултат може да произлегува од високата чувствителност на R_s на мали варијации на хроматографските услови, како и од многу мала чиста грешка, добиена поради добра усогласеност на резултатите од централните точки. Во такви околности, бидејќи експерименталната грешка е минимална, статистичката проверка на недоволната соодветност на моделот станува построга, па и релативно мали системски отстапувања на моделот можат да резултираат со ниска, односно негативна вредност за валидноста на моделот. Според тоа, и покрај ниската валидност, моделот може да биде практично корисен за процена на робусноста, особено доколку покажува висока репродуктивност и стабилни трендови во рамките на дефинираниот простор на дизајн.

На Слика 54 е прикажан дијаграм кој ја покажува зависноста помеѓу експериментално измерените и со моделот предвидените вредности за разгледуваните аналитички одговори (N_M , N_B , R_S). Дијаграмот претставува важен визуелен показател за квалитетот на статистичкиот модел, при што линијата 1:1 означува идеално совпаѓање помеѓу предвидените и измерените вредности. Колку точките се поблиску до оваа линија, толку е подобра согласноста помеѓу моделот и експерименталните податоци. Обратно, поголемото расфрлање околу линијата укажува на послаба способност на моделот да ги репродуцира измерените вредности. Појавата на точки што се значително оддалечени од линијата 1:1 може да укажува на потенцијални атипични вредности (outliers) или на недоволна соодветност на моделот.



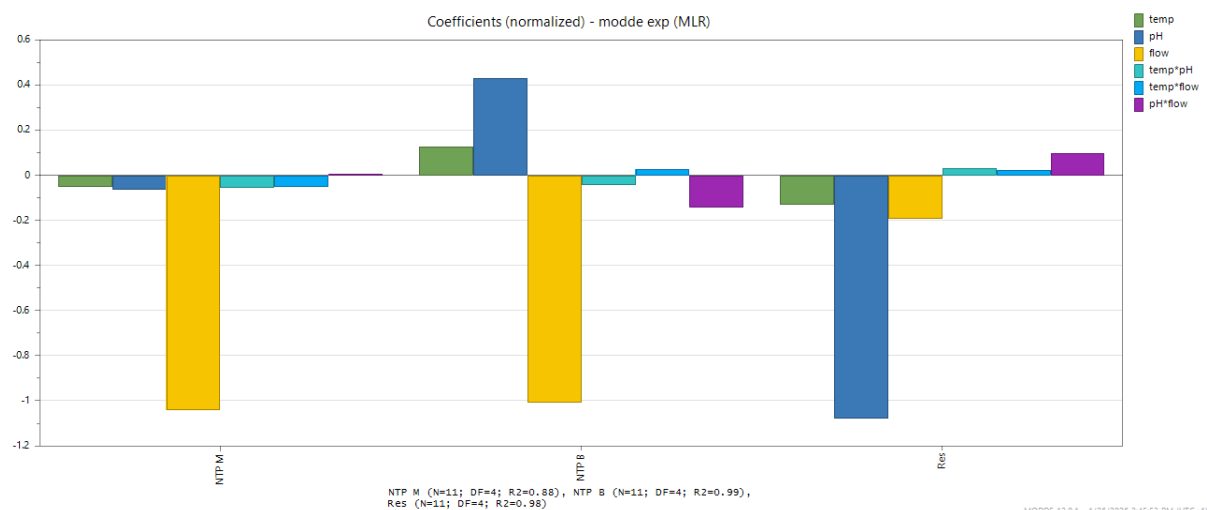
Слика 54 Споредба помеѓу експериментално измерените и со моделот предвидените вредности за анализираните аналитички одговори
Figure 54 Observed versus predicted values for the investigated analytical responses

Од прикажаните резултати може да се забележи дека кај моделот за N_B постои многу добра согласност помеѓу измерените и предвидените вредности, при што најголемиот дел од точките се распоредени вдолж линијата 1:1. Ова укажува дека моделот со висока точност ги опишува експерименталните податоци за овој аналитички одговор, што е во согласност со високите вредности за R^2 и Q^2 , добиени при статистичката евалуација.

Кај моделот за M_m , точките генерално ја следат линијата 1:1, но се забележува умерено поголемо расфрлање во споредба со моделот за M_b . Ова укажува дека моделот обезбедува добра согласност со експерименталните податоци, иако поседува помала предиктивна точност, што е во согласност со пониската вредност за Q^2 добиена за овој одговор.

Кај моделот за R_s , распределбата на точките околу линијата 1:1 укажува на прифатлива согласност помеѓу предвидените и измерените вредности, без појава на изразени атипични вредности. Иако за овој модел е забележана пониска валидност при статистичката евалуација, дијаграмот прикажан на Слика 54 покажува дека моделот адекватно ги репродуцира експерименталните податоци во рамките на испитуваниот простор на дизајн и дека може да се користи за практична проценка на трендовите и робусноста на методот.

На Слика 55 е прикажан дијаграм на нормализирани регресиски коефициенти за сите разгледувани аналитички одговори. Дијаграмот ги вклучува главните ефекти на CPPs (температура на колоната, рН-вредност на пуферот и проток на мобилната фаза), како и нивните меѓусебни интеракции (температура–рН; температура–проток; рН–проток).



Слика 55 Дијаграм на нормализирани коефициенти што го прикажува влијанието на испитуваните фактори и нивните интеракции врз анализираните одговори

Figure 55 Normalized coefficient plot showing the effects of the investigated factors and their interactions on the studied responses

Со цел да се овозможи директна споредба на влијанието на поединечните фактори врз различните аналитички одговори, кои имаат различни опсези и/или единици, коефициентите се нормализирани, односно изразени во однос на SD на соодветниот одговор. На овој начин се овозможува проценка на насоката на ефектот (позитивен или негативен) и релативната големина на ефектот на секој фактор врз анализираните CQAs.

Врз основа на прикажаните резултати може да се забележи дека протокот на мобилната фаза претставува највлијателен CPP за сите разгледувани одговори, што се потврдува преку најголемите апсолутни вредности на нормализираните коефициенти. Кај моделите за M_m и M_b , протокот има негативно насочен ефект, што укажува дека неговото зголемување во испитуваниот опсег резултира со намалување на бројот на теоретски подови. Овој ефект е очекуван, бидејќи повисокиот проток го намалува времето на задржување на аналитите во колоната и, следствено, ја ограничува нивната интеракција со стационарната фаза.

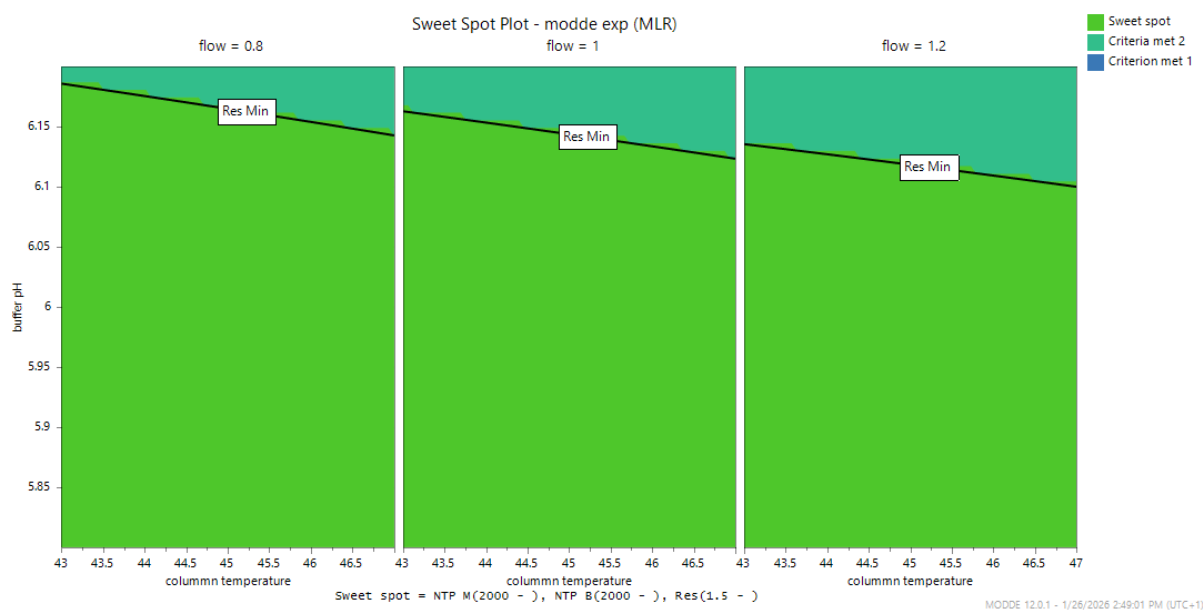
Кај моделот за R_s , најзначајно влијание има рН-вредноста на пуферот, при што негативно насочениот ефект укажува дека со зголемување на рН-вредноста во рамките на испитуваниот простор на дизајн, се намалува R_s помеѓу пиковите на онечистување С и онечистување А. Ваквиот тренд може да се поврзе со промените во јонизациското однесување на овие соединенија при различни рН-вредности, што влијае врз нивната релативна ретенција и селективноста на методот, а со тоа и врз постигнатата резолуција.

Влијанието на температурата на колоната врз анализираните одговори е умерено и помалку изразено во споредба со протокот на мобилната фаза и рН-вредноста на пуферот, што укажува дека во испитуваниот опсег температурата има секундарно, но предвидливо влијание врз хроматографската ефикасност и резолуцијата.

Во сите случаи, ефектите од интеракциите помеѓу CPPs се претставени со значително помали коефициенти во споредба со главните ефекти, што укажува дека нивното влијание врз анализираните CQAs е ограничено, односно дека доминантниот придонес потекнува од индивидуалните CPPs.

На Слика 56 е прикажан дијаграмот на оптимална област (Sweet Spot Plot), добиен врз основа на моделите базирани на DoE и дефинираните критериуми за прифатливост на анализираните CQAs. Дијаграмот го прикажува комбинираното

влијание на температурата на колоната и рН-вредноста на пуферот при три фиксни вредности на протокот на мобилната фаза (0,8; 1,0 и 1,2 mL/min). Зелената област го претставува регионот во кој истовремено се исполнети сите воспоставени критериуми за прифатливост, додека границите помеѓу регионите се дефинирани врз основа на најкритичниот аналитички одговор.



Слика 56 Дијаграм на оптимална област за дефинирање на робустен простор на дизајн врз основа на критериумите за број на теоретски подови и резолуција

Figure 56 Sweet spot plot for defining a robust design space based on number of theoretical plates and resolution criteria

Во конкретниот случај, оптималната област е дефинирана врз основа на воспоставените критериуми за прифатливост за бројот на теоретски подови за мелоксикам и онечистување В, како и за минималната прифатлива резолуција помеѓу пиковите на онечистување С и онечистување А. Од дијаграмот може да се заклучи дека резолуцијата претставува најкритичниот атрибут при дефинирање на просторот на дизајн, што е означено со линијата „Res Min“.

Резултатите покажуваат дека широк регион од испитуваниот простор на дизајн ги исполнува сите критериуми за прифатливост, при што оптималната област е присутна кај сите три анализирани вредности на протокот. Ова укажува дека аналитичкиот метод покажува висок степен на робусност, односно дека мали

варијации на температурата на колоната, рН-вредноста на пуферот и протокот на мобилната фаза не доведуваат до нарушување на анализираните CQAs.

Дополнително, положбата и континуитетот на оптималната област укажуваат дека работните услови на методот се сместени во централниот дел од дефинираниот простор на дизајн, што овозможува сигурна и репродуктивна примена на методот во рутински анализи. Отсуството на нагли прекини или тесни гранични области дополнително ја потврдува стабилноста на методот во рамките на дефинираниот опсег на параметри.

6.2.3. Определување на соодветност на систем за изведба на аналитичкиот метод

Како што е прикажано во Табела 40, вредностите на RSD за R_t на мелоксикам и сите онечистувања се ниски (0,03–0,16%), што укажува на стабилна ретенција и добра повторливост на ретенциските времиња при шест последователни инјектирања.

Понатаму, како што е прикажано во Табела 41, поединечните вредности за A_s се во прифатливи граници и покажуваат добар степен на симетрија на пиковите на сите компоненти. Дополнително, вредностите на RSD за овој параметар се ниски (0,00–1,11%), што потврдува стабилност на обликот на пиковите при повторени инјектирања.

Како што е прикажано во Табела 42, вредностите за N се високи за сите соединенија, а вредностите на RSD се ниски (0,44–1,59%), што укажува на соодветна ефикасност на колоната и репродуктивни хроматографски услови во текот на анализата.

Конечно, како што е прикажано во Табела 43, R_s помеѓу онечистувањата С и А е значително над минималната прифатлива вредност (1,5), при што добиените вредности се околу 3,13–3,17, со ниска варијабилност (RSD = 0,43%). Ова потврдува сигурно и репродуктивно раздвојување на критичниот пар пикови.

Врз основа на добиените резултати може да се заклучи дека употребениот HPLC систем е соодветен за изведба на аналитичкиот метод за определување на онечистувањата во раствор за инјектирање.

7. ЗАКЛУЧОК

Во овој докторски труд е воспоставен интегриран аналитички пристап базиран на принципите на AqBd, при што комбинираната примена на софтверските алатки DryLab® и MODDE® овозможи систематски, научно основан и рационализиран развој на HPLC методи за определување на содржината и следење на стабилноста на мелоксикам во раствор за инјектирање. Применетиот пристап овозможи истовремено разгледување на интеракциите помеѓу CPPs и нивното влијание врз дефинираните CQAs, како и воспоставување на стабилна и експериментално потврдена MODR, што претставува суштинска предност во однос на традиционалните OFAT методологии.

Посебен методолошки придонес претставува интеграцијата на проценката на мерната неодреденост како составен дел од аналитичката стратегија. Со примена на пристапите одозгора-надолу и одоздола-нагоре, мерната неодреденост е квантитативно проценета и интегрирана во конечниот аналитички резултат, при што класичните валидациски параметри се дополнети со реална проценка на доверливоста на добиените податоци. На овој начин, аналитичкиот резултат не се третира како апсолутна вредност, туку како интервал со дефинирано ниво на доверба, што овозможува пообјективно донесување одлуки при оценка на усогласеноста со спецификациите и е во согласност со современите регулаторни очекувања.

Практичната вредност на развиениот пристап не се ограничува исклучиво на анализата на мелоксикам во форма на раствор за инјектирање. Напротив, воспоставената методолошка рамка, која ги интегрира AqBd принципите, софтверски потпомогнатата оптимизација и квантитативната проценка на мерната неодреденост, претставува добра основа за развој и адаптација на аналитички методи применливи во контролата на квалитет на различни фармацевтски дозирани форми што содржат мелоксикам. На тој начин, трудот обезбедува платформа за проширување на аналитичките стратегии и кон други формулации, со задржување на научната и регулаторната конзистентност.

Воспоставената аналитичка рамка, истовремено, создава цврста основа на понатамошна дигитализација на аналитичкиот развој преку интеграција на напредни алатки базирани на вештачка интелигенција (Artificial Intelligence, AI) и машинско учење (Machine Learning, ML). Со оглед на тоа што применетиот AqBd пристап веќе се темели на мултиваријантни модели, DoE и предиктивно

моделирање, воведувањето на AI и/или ML претставува логично продолжување на концептот, насочено кон унапредување на предикцијата на ретенција, селективност и резолуција, особено во услови на сложени и нелинеарни интеракции помеѓу хроматографските параметри.

Дополнително, интеграцијата на AI и ML со концептот на мерна неодреденост овозможува премин од статичка кон динамичка проценка на аналитичката сигурност, при што мерната неодреденост може континуирано да се ажурира врз основа на податоци од рутинската примена и долгорочниот мониторинг на перформансите на методот. Ваквиот пристап придонесува кон проактивно управување со аналитичкиот ризик во текот на животниот циклус на методот и воспоставува напредна, одржлива и регулаторно усогласена рамка за идниот развој на аналитичките методи во фармацевтската индустрија.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Agrawal, R., & Kotadiya, R. (2024). AQbD-guided stability indicating HPLC method for azelnidipine and chlorthalidone fixed-dose combination tablet: a green approach. *Journal of Taibah University for Science*, 18(1), 2415156. doi:10.1080/16583655.2024.2415156.
2. Ahmad, I. A., Makey, D. M., Wang, H., Shchurik, V., Singh, A. N., Stoll, D. R., . . . Regalado, E. L. (2021). In Silico Multifactorial Modeling for Streamlined Development and Optimization of Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 93(33), 11532–11539. doi:10.1021/acs.analchem.1c01970.
3. Alsante, K. M., Huynh-Ba, K., Baertschi, S. W., Reed, R. A., Landis, M. S., Kleinman, M. H., . . . Joshi, B. K. (2013). Recent Trends in Product Development and Regulatory Issues on Impurities in Active Pharmaceutical Ingredient (API) and Drug Products. Part 1: Predicting Degradation Related Impurities and Impurity Considerations for Pharmaceutical Dosage Forms. *AAPS PharmSciTech*, 15(1), 198–212. doi:10.1208/s12249-013-0047-x.
4. Alves, E., Gurupadayya, B. M., & Prabhakaran, P. (2025). Artificial Intelligence in HPLC Method Development: A Critical Review of Technological Integration, Limitations, and Future Directions. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–43. doi:10.1080/10408347.2025.2575352.
5. Ameen, S. A., & Pappula, N. (2023). Analytical QbD Approach to Redefine the Quality of Pharmaceuticals: A Review. *Journal of Pharmaceutical Research*, 22(4), 178–185. doi:10.18579/jopcr/v22.4.81.
6. Azcarate, S. M., Pinto, L., & Goicoechea, H. C. (2020). Applications of mixture of experiments for response surface methodology implementation in analytical methods development. *Journal of Chemometrics*, 34(12), e3246. doi:10.1002/cem.3246.
7. Baertschi, S. W., Pack, B. W., Hyzer, C. S., & Nussbaum, M. A. (2013). Assessing mass balance in pharmaceutical drug products: New insights into an old topic. *Trends in Analytical chemistry*, 49, 126–136. doi:10.1016/j.trac.2013.06.006.
8. Bairagi, A., Kothrukar, R., Chikhale, H., Kosanam, S., & Borse, L. (2024). AQbD-novel strategy for analytical methods. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 138. doi:10.1186/s43094-024-00706-1.

9. Bajaj, S., Singla, D., & Sakhuja, N. (2021). Stability Testing of Pharmaceutical Products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(3), 129–138. doi:10.7324/JAPS.2012.2322.
10. Bandarkar, F. S., & Vavia, P. R. (2009). A Stability Indicating HPLC Method for the Determination of Meloxicam in Bulk and Commercial Formulations. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(3), 257–264. doi:10.4314/tjpr.v8i3.44543.
11. Banerjee, R., Chakraborty, H., & Sarkur, M. (2003). Photophysical studies of oxicam group of NSAIDs: piroxicam, meloxicam and tenoxicam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(6), 1213–1222. doi:10.1016/S1386-1425(02)00300-1.
12. Bhavyasri, K., Vishnumurthy, K. M., Rambabu, D., & Sumakanth, M. (2019). ICH guidelines – “Q” series (quality guidelines) - A review. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 6(3), 89–106. doi:10.30574/gscbps.2019.6.3.0034.
13. BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, and OIML. (2008). *Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement*. Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 100:2008. doi:10.59161/JCGM100-2008E.
14. Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., & Agrawal, Y. K. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), 159–165. doi:10.1016/j.jpha.2013.09.003.
15. Bliesner, D. M. (2005). *Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0470042206.
16. Brezovska, M., Jampilek, J., & Opatrilova, R. (2013). A Review of HPLC Methods Used for Determining the Presence of Meloxicam. *Current Pharmaceutical Analysis*, 9(1), 69–76. doi:10.2174/157341213804806179.
17. Brune, K., & Patrignani, P. (2015). New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pain Research*, 20(8), 105–118. doi:10.2147/JPR.S75160.
18. Carstensen, J., & Rhodes, C. (Ур.). (2000). *Drug Stability: Principles and Practices*. Boca Raton: CRC Press. doi:10.1201/9780367801298.

19. Chauhan, A., Mittu, B., & Chauhan, P. (2015). Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 6(1), 1000233. doi:10.4172/2155-9872.1000233.
20. Colloud, S., Metcalfe, T., Askin, S., Belachew, S., Ammann, J., Bos, E., . . . Cerreta, F. (2023). Evolving regulatory perspectives on digital health technologies for medicinal product development. *npj Digital Medicine*, 6, 56. doi:10.1038/s41746-023-00790-2.
21. Council of Europe. (2026). *European Pharmacopoeia: General Chapter 2.2.46 "Chromatographic separation techniques", Issue 12.1*. Strasbourg: Council of Europe.
22. Council of Europe. (2026). *European Pharmacopoeia: Meloxicam (Monograph 2373), Issue 12.1*. Strasbourg: Council of Europe.
23. Cox, M., & O'Hagan, A. (2022). Meaningful expression of uncertainty in measurement. *Accreditation and Quality Assurance*, 27, 19–37. doi:10.1007/s00769-021-01485-5.
24. Cysewski, P. (2018). Intermolecular interaction as a direct measure of water solubility advantage of meloxicam cocrystalized with carboxylic acids. *Journal of Molecular Modeling*, 24(5), 112. doi:10.1007/s00894-018-3649-0.
25. Dar, A. A., Yadav, P., Aswani, N., & Wangmo, T. A. (2024). Optimizing processes and products: The role of DOE. *Insight - Statistics*, 7(1), 644. doi:10.18282/i-s644.
26. Davies, N. M., & Skjodt, N. M. (1999). Clinical pharmacokinetics of meloxicam. A cyclo-oxygenase-2 preferential nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(2), 115–126. doi:10.2165/00003088-199936020-00003.
27. Deidda, R., Orlandini, S., Hubert, P., & Hubert, C. (2018). Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 161, 110–121. doi:10.1016/j.jpba.2018.07.050.
28. Dewi, M. K., Pratama, R., Arifka, M., & Chaerunisaa, A. Y. (2022). Quality by Design: Approach to Analytical Method Validation. *Sciences of Pharmacy*, 1(1), 27–33. doi:10.58920/sciphar01010033.
29. do Rosario, P. P., & Mendes, A. (2025). *Metrology and Measurement Uncertainty: Concepts and Applications*. Cham: Springer. doi:10.1007/978-3-031-82303-9

30. Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471973106.
31. Dsouza, S. J., Sandeep, D., Charyulu, R. N., Gowrav, M., & Pradeep, H. (2024). Impurities in Drug Substance-An Overview of ICH Q3A, Q3C and M7 Guidelines. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 14(2), 299–305. doi:10.5530/ijpi.14.2.37.
32. Dufrenoy, P., Ghinet, A., Hechelski, M., Daïch, A., & Waterlot, C. (2019). An innovative and efficient method to synthesize meloxicam in onestep procedure with respect to the green chemistry. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16, 501–509. doi:10.1007/s13738-018-1525-6.
33. Dutta, R. K. (2024). Navigating Measurements, Errors, and Uncertainties: Fundamental Principles for Scientific and Engineering Applications. *Journal of Nanotechnology Research*, 6(3), 35–39. doi:10.26502/jnr.2688-85210044.
34. Dwivedi, S., Chawla, R. K., & Ambekar, N. (2025). Analytical Method Development for related substances (Organic impurities) in Pharmaceuticals: A Comprehensive review of Methodologies and Regulatory Compliance. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, 30(4), 304. doi:10.37521/ejpps30407.
35. El-Awady, S. M. (2023). Overview of Failure Mode and Effects Analysis (FMEA): A Patient Safety Tool. *Global Journal on Quality and Safety in Healthcare*, 6(1), 24–26. doi:10.36401/JQSH-23-X2.
36. Ellwanger, J. B., Wingert, N. R., Volpato, N. M., Garcia, C. V., Schapoval, E. S., & Steppe, M. (2020). Analytical Quality by Design Approach for a Stability-Indicating Method to Determine Apixaban and Its Related Impurities. *Chromatographia*, 83, 65–75. doi:10.1007/s10337-019-03815-9.
37. Epshtein, N. A. (2020). System Suitability Requirements for Liquid Chromatography Methods: Controlled Parameters and their Recommended Values (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54, 518–525. doi:10.1007/s11094-020-02231-w.
38. Epshtein, N. A., Sevastianova, V. L., & Koroleva, A. I. (2018). INVESTIGATION OF ROBUSTNESS AT VALIDATION OF HPLC AND UPLC METHODS: A MODERN APPROACH INCLUDING RISK ANALYSIS. *Drug Development & Registration*, 1(22), 96–109.

39. Ermer, J., & Nethercote, P. (Ур.). (2025). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Weinheim: Wiley-VCH GmbH. doi:10.1002/9783527831708.
40. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2020). *Evaluation of measurement uncertainty – Annex 1: Bottom-up approach – Annex 1.1: estimation of measurement uncertainty of concentration of solutions prepared in laboratory PA/PH/OMCL (18) 146 R1 CORR*. Преземено од Council of Europe – EDQM: <https://www.edqm.eu/en/quality-management-qm-documents>
41. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2020). *Evaluation of measurement uncertainty – Annex 1: Bottom-up approach – Annex 1.3: estimation of measurement uncertainty for assay using HPLC method PA/PH/OMCL (18) 148 R2 CORR*. Преземено од Council of Europe – EDQM: <https://www.edqm.eu/en/quality-management-qm-documents>
42. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2020). *Evaluation of measurement uncertainty – Annex 2: Top-down approach – Annex 2.1: use of data from validation studies PA/PH/OMCL (18) 149 R1*. Преземено од Council of Europe – EDQM: <https://www.edqm.eu/en/quality-management-qm-documents>
43. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2020). *Evaluation of measurement uncertainty (core document) PA/PH/OMCL (18) 145 R1 CORR*. Преземено од Council of Europe – EDQM: <https://www.edqm.eu/en/quality-management-qm-documents>
44. Fan, Z., & Zhang, L. (2015). One- and Two-Stage Arrhenius Models for Pharmaceutical Shelf Life Prediction. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 25(2), 307–316. doi:10.1080/10543406.2014.972743.
45. Feinberg, M., Boulanger, B., Dewe, W., & Huber, P. (2004). New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(3), 502–514. doi:10.1007/s00216-004-2791-y.
46. Fekete, S., & Molnár, I. (Ур.). (2018). *Software-assisted method development in high performance liquid chromatography*. doi:10.1142/q0161.
47. Fleischmann, R., Iqbal, I., & Slobodin, G. (2002). Meloxicam. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 3(10), 1501–1512. doi:10.1517/14656566.3.10.1501.

48. Food and Drug Administration and European Medicines Agency. (2017). *Report from the EMA-FDA QbD pilot program*. London: Food and Drug Administration & European Medicines Agency. Преземено од <https://www.fda.gov/media/104371/download>
49. Fukuda, I. M., Pinto, C. F., Moreira, C. d., Saviano, A. M., & Lourenço, F. R. (2018). Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, e01006. doi:10.1590/s2175-97902018000001006.
50. Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G., Ianelli, E., & Gray, A. (2006). *Quality Assurance in Analytical Chemistry: Applications in Environmental, Food, and Materials Analysis, Biotechnology, and Medical Engineering*. Weinheim: Wiley-VCH. doi:10.1002/9783527609444.
51. Gates, B. J., Nguyen, T., Setter, S. M., & Davies, N. M. (2005). Meloxicam: a reappraisal of pharmacokinetics, efficacy and safety. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6(12), 2117–2140. doi:10.1517/14656566.6.12.2117.
52. Ghlichloo, I., & Gerriets, V. (2025). *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs)*. Treasure Island: StatPearls.
53. González-Martín, R., Gutiérrez-Serpa, A., Pino, V., & Sajid, M. (2023). A tool to assess analytical sample preparation procedures: Sample preparation metric of sustainability. *Journal of Chromatography A*, 1707, 464291. doi:10.1016/j.chroma.2023.464291.
54. Goti, G., Manal, K., Sivaguru, J., & Dell'Amico, L. (2024). The impact of UV light on synthetic photochemistry and photocatalysis. *Nature Chemistry*, 16, 684–692. doi:10.1038/s41557-024-01472-6.
55. Hema, B., Nayak, A., Sangeetha, G., Carlota, R. R., Alwin, M. D., & Das, P. (2024). A new RP-HPLC Method Development, Validation and Stability-Indicating Studies of Epalrestat in Bulk Drug by Analytical Quality by Design Approach. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 17(9), 4437–4442. doi:10.52711/0974-360X.2024.00685.
56. Heyden, Y. V., Jimidar, M., Hund, E., Niemeijer, N., Peeters, R., Smeyers-Verbeke, J., . . . Hoogmartens, J. (1999). Determination of system suitability limits with a robustness test. *Journal of Chromatography A*, 845(1–2), 145–154. doi:10.1016/S0021-9673(99)00328-3.

57. Huang, Y. (2016). A Quality by Design (QbD) Framework for Reversed-Phase Liquid Chromatography Method Development. *International Journal of Analytical Techniques*, 2(1), 1–17. doi:10.15226/2471-3627/2/1/00107.
58. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2003). *Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
59. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2006). *Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
60. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2006). *Q3B(R2): Impurities in New Drug Products*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
61. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2008). *Q10: Pharmaceutical Quality System*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
62. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2009). *Q8(R2): Pharmaceutical Development*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
63. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2012). *Q11: Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities)*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
64. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2023). *Q14: Analytical Procedure Development*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
65. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2023). *Q2(R2): Validation of Analytical*

- Procedures*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
66. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2023). *Q9(R1): Quality Risk Management*. Geneva: ICH. Преземено од <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
67. International Organization for Standardization (ISO). (2017). *ISO/IEC 17025:2017 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva: ISO.
68. International Union of Pure and Applied Chemistry. (н.д.). *Atomic weights and isotopic compositions (Version 3.0)*. Преземено од <https://iupac.qmul.ac.uk/AtWt/>
69. Jagan, B. G., Murthy, P. N., Mahapatra, A. K., & Patra, R. K. (2021). Quality by Design (QbD): Principles, underlying concepts, and regulatory prospects. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1), 54–69. doi:10.56808/3027-7922.2473.
70. Jameel, F., Hershenson, S., Khan, M. A., & Martin-Moe, S. (Ур.). (2015). *Quality by Design for Biopharmaceutical Drug Product Development*. New York: Springer. doi:10.1007/978-1-4939-2316-8.
71. Jayaraman, K., Alexander, A. J., Hu, Y., & Tomasella, F. P. (2011). A stepwise strategy employing automated screening and DryLab modeling for the development of robust methods for challenging high performance liquid chromatography separations: A case study. *Analytica Chimica Acta*, 696(1-2), 116–124. doi:10.1016/j.aca.2011.04.010.
72. Jayaraman, K., Rajendran, A. K., Kumar, G. S., & Bhutani, H. (2021). A methodology employing retention modeling for achieving control space in liquid chromatography method development using quality by design approach. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461658. doi:10.1016/j.chroma.2020.461658.
73. Jiménez, J. J., Muñoz, B. E., Sánchez, M. I., & Pardo, R. (2018). Forced and long-term degradation assays of tenoxicam, piroxicam and meloxicam in river water. Degradation products and adsorption to sediment. *Chemosphere*, 191, 903–910. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.056.

74. Kadis, R. (2002). Analytical procedure in terms of measurement (quality) assurance. *Accreditation and Quality Assurance*, 7, 294–298. doi:10.1007/s00769-002-0484-9.
75. Kanthiah, S., Ruby, J. J., Hiriyanna, S. G., & Kannappan, V. (2025). Navigating the AQbD Landscape: Enhancing Quality Management in Liquid Chromatography Method Development. *Biomedical Chromatography*, 39(4), e70031. doi:10.1002/bmc.70031.
76. Kasemiire, A., Avohou, H. T., Bleye, C. D., Sacre, P.-Y., Dumont, E., Hubert, P., & Ziemons, E. (2021). Design of experiments and design space approaches in the pharmaceutical bioprocess optimization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 166, 144–154. doi:10.1016/j.ejpb.2021.06.004.
77. Katekar, V., Sangule, D., Bhurbhure, O., Ingle, P., Dhage, S., & Jadhav, K. (2022). A Review on Quality by Design Approach in Analytical Methods. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 12(3-S), 255–261. doi:10.22270/jddt.v12i3-S.5386.
78. Kazusaki, M., Ueda, S., Takeuchi, N., & Ohgami, Y. (2012). Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *CHROMATOGRAPHY*, 33(2), 65–73. doi:10.15583/JPCHROM.2012.005.
79. Khaire, R. D., & Pawar, P. Y. (2022). A Review on Development of Stability Indicating Analytical Methods for drugs in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(4), 261–263. doi:10.52711/2231-5675.2022.00043.
80. Khalil, N. Y., & Aldosari, K. F. (2020). Meloxicam. In *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology* (Том 45, стр. 159–197). Amsterdam: Academic Press. doi:10.1016/bs.podrm.2019.10.006.
81. Khan, H. (2017). Analytical Method Development in Pharmaceutical Research: Steps involved in HPLC Method Development. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 203-207. doi:10.5958/2231-5691.2017.00031.4.
82. Kleinman, M. H., Elder, D., Teasdale, A., Mowery, M. D., McKeown, A. P., & Baertschi, S. W. (2015). Strategies To Address Mutagenic Impurities Derived from Degradation in Drug Substances and Drug Products. *Organic Process Research & Development*, 19(11), 1447–1457. doi:10.1021/acs.oprd.5b00091.

83. Krull, I. S., & Swartz, M. (1999). Analytical Method Development and Validation for the Academic Researcher. *Analytical Letters*, 32(6), 1067–1080. doi:10.1080/00032719908542878.
84. Latrous, L. (2022). Optimization and Validation in Liquid Chromatography Using Design of Experiments. *Chemistry Africa*, 5, 437–458. doi:10.1007/s42250-022-00344-1.
85. Lebrun, P., Boulanger, B., Debrus, B., Lamber, P., & Hubert, P. (2013). A Bayesian Design Space for Analytical Methods Based on Multivariate Models and Predictions. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 23(6), 1330–1351. doi:10.1080/10543406.2013.834922.
86. Lee, J. H., Choi, J.-H., Youn, J. S., Cha, Y. J., Song, W., & Park, A. J. (2015). Comparison between bottom-up and top-down approaches in the estimation of measurement uncertainty. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53(7), 1025–1032. doi:10.1515/cclm-2014-0801.
87. Lee, S.-H., J.-K., K., Jee, J.-P., Jang, D.-J., Park, Y.-J., & Kim, J.-E. (2022). Quality by Design (QbD) application for the pharmaceutical development process. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 52, 649–682. doi:10.1007/s40005-022-00575-x.
88. Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., & Zito, S. W. (Ур.). (2013). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry (7th ed.)*. Philadelphia.
89. Liana, A., Hałuszczuk, A., Gawor, A., & Bulska, E. (2024). Identification and Structural Characterization of Degradation Products of Linagliptin by Mass Spectrometry Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2591. doi:10.3390/ijms25052591.
90. Liu, C. L., Liu, M. C., & Zhu, P. L. (2002). Determination of gastrodin, p-hydroxybenzyl alcohol, vanillyl alcohol, p-hydroxybenzaldehyde and vanillin in tall gastrodia tuber by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 55, 317–320. doi:10.1007/BF02491665.
91. Losacco, G. L., Wang, H., Ahmad, I. A., DaSilva, J., Makarov, A. A., Mangion, I., . . . Regalado, E. L. (2021). Enantioselective UHPLC Screening Combined with In Silico Modeling for Streamlined Development of Ultrafast Enantiopurity Assays. *Analytical Chemistry*, 94(3), 1804–1812. doi:10.1021/acs.analchem.1c04585.

92. Mahapatra, A., & Meyyanathan, S. N. (2022). Approach of analytical quality by design and regulatory need. *International Journal of Health Sciences*, 6(S5), 2572–2592. doi:10.53730/ijhs.v6nS5.9208.
93. Makey, D. M., Shchurik, V., Wang, H., Lhotka, H. R., Stoll, D. R., Vazhentsev, A., . . . Ahmad, I. A. (2020). Mapping the Separation Landscape in Two-Dimensional Liquid Chromatography: Blueprints for Efficient Analysis and Purification of Pharmaceuticals Enabled by Computer-Assisted Modeling. *Analytical Chemistry*, 93(2), 964–972. doi:10.1021/acs.analchem.0c03680.
94. Mannocho-Russo, H., Bueno, P. C., Bauermeister, A., de Almeida, R. F., Dorrestein, P. C., Cavalheiro, A. J., & Bolzani, V. S. (2020). Can Statistical Evaluation Tools for Chromatographic Method Development Assist in the Natural Products Workflow? A Case Study on Selected Species of the Plant Family Malpighiaceae. *Journal of Natural Products*, 83(11), 3239–3249. doi:10.1021/acs.jnatprod.0c00495.
95. Marden, S., Campbell, J. M., Adams, N., Coelho, R., Foti, C., Franca, J. R., . . . Baertschi, S. W. (2024). Mass Balance in Pharmaceutical Stress Testing: A Review of Principles and Practical Applications. *The AAPS Journal*, 26, 96. doi:10.1208/s12248-024-00961-3.
96. Marson, B. M., Concentino, V., Junkert, A. M., Fachi, M. M., Vilhena, R. O., & Pontarolo, R. (2020). VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED ON HPLC METHODS. *Química Nova*, 43(8), 1190-1203. doi:10.21577/0100-4042.20170589.
97. Martinello, F., Snoj, N., Skitek, M., & Jerin, A. (2020). The top-down approach to measurement uncertainty: which formula should we use in laboratory medicine? *Biochemia Medica*, 30(2), 020101. doi:10.11613/BM.2020.020101
98. Meyer, V. R. (2007). Measurement uncertainty. *Journal of Chromatography A*, 1158(1–2), 15–24. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.082.
99. Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (6th ed.)*. Harlow: Pearson Education Limited.
100. Mishra, V., Thakur, S., Patil, A., & Shukla, A. (2018). Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 15(8), 737–758. doi:10.1080/17425247.2018.1504768.

101. Mitrevska, I., Angelovska, D., & Paneva, O. (2025). Thermal-Cycling Stability of Cefixime Granules for Oral Suspension: Experimental Evaluation and FMEA-Based Risk Analysis for Pharmaceutical Distribution. *Chemical & Pharmaceutical Research*, 7(3), 1–9. doi:10.33425/2689-1050.1076.
102. Modhave, D. T., Handa, T., Shah, R. P., & Singh, S. (2011). Successful Characterization of Degradation Products of Drugs Using LC-MS Tools: Application to Piroxicam and Meloxicam. *Analytical Methods*, 3(12), 2864–2872. doi:10.1039/C1AY05493G.
103. Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., & Watts, J. (Ур.). (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons (4th ed.)*. London: Pharmaceutical Press.
104. MOLNÁR-INSTITUTE for Applied Chromatography. (n.d.). *DryLab®—Software for Analytical Design Space Modeling*. Преземено October 31, 2025 од MOLNÁR-INSTITUTE for Applied Chromatography: <https://molnar-institute.com/drylab/>
105. Oliveira, É. F., Azevedo, R. C., Bonfilio, R., Oliveira, D. B., Ribeiro, G. P., & Araújo, M. B. (2009). Dissolution test optimization for meloxicam in the tablet pharmaceutical form. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1), 67–73. doi:10.1590/S1984-82502009000100008.
106. Orlandini, S., Pasquini, B., Gotti, R., Giuffrida, A., Paternostro, F., & Furlanetto, S. (2014). Analytical quality by design in the development of a cyclodextrin-modified capillary electrophoresis method for the assay of metformin and its related substances. *Electrophoresis*, 35(17), 2538–2545. doi:10.1002/elps.201400173.
107. Panchal, K., Katke, S., Dash, S. K., Gaur, A., Shinde, A., Saha, N., . . . Chaurasiya, A. (2022). An expanding horizon of complex injectable products: development and regulatory considerations. *Drug Delivery and Translational Research*, 13(2), 433–472. doi:10.1007/s13346-022-01223-5.
108. Panda, A., Raikwar, A., & Panda, S. (2025). A holistic perspective on analytical method validation under International Council for Harmonisation Q2(R1). *American Journal of Biopharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 1. doi:10.25259/AJBPS_6_2025.
109. Passerine, B. F., & Breitkreitz, M. C. (2024). Important Aspects of the Design of Experiments and Data Treatment in the Analytical Quality by Design

- Framework for Chromatographic Method Development. *Molecules*, 29(24), 6057. doi:10.3390/molecules29246057 .
110. Patel, P., Solanki, S., & Vihol, B. (2024). An Industry Perspective: How To Develop Analytical Method For Related Substances Of Drug Product By Applying A QbD. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 360–379. doi:10.5281/zenodo.10673264.
111. Patil, S. T., Ahirrao, R. A., & Pawar, S. P. (2017). A short review on method validation. *Journal of Pharmaceutical and BioSciences*, 5(4), 30–37. doi:10.31555/jpbs/2017/5/4/30-37.
112. Peng, L., Gao, X., Wang, L., Zhu, A., Cai, X., Li, P., & Li, W. (2022). Design of experiment techniques for the optimization of chromatographic analysis conditions: A review. *ELECTROPHORESIS*, 43(18–19), 1882–1898. doi:10.1002/elps.202200072.
113. Peraman, R., Bhadraya, K., & Reddy, Y. P. (2015). Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015(1). doi:10.1155/2015/868727.
114. Popovska Jakimovska, V., Atanasova, A., Gogu, F., Stevanoska, M., Arsovska Popovska, E., Antovska, P., & Trajkovic Jolevska, S. T. (2023). Analytical Quality by Design approach in development and optimization of HPLC method for assay of angiotensin – converting enzyme inhibitor in tablets. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 69(1), 25–41. doi:10.33320/maced.pharm.bull.2023.69.01.003.
115. Prajapati, P. B., Bagul, N., & Kalyankar, G. (2021). Implementation of DoE and Risk-Based Enhanced Analytical Quality by Design Approach to Stability-Indicating RP-HPLC Method for Stability Study of Bosutinib. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 104(6), 1742–1753. doi:10.1093/jaoacint/qsab078.
116. Pramod, K., Tahir, M. A., Charoo, N. A., Ansari, S. H., & Ali, J. (2016). Pharmaceutical product development: A quality by design approach. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 6(3), 129–138. doi:10.4103/2230-973x.187350.
117. Rácz, N., & Kormány, R. (2018). Retention Modeling in an Extended Knowledge Space. *Chromatographia*, 81, 585–594. doi:10.1007/s10337-017-3466-0.

118. Randive, K. H., Maste, M. M., & Kempwade, A. A. (2024). Exploring Analytical Quality by Design (AQbD) Enabled. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 58(2), 651–660. doi:10.5530/ijper.58.2.73.
119. Rostron, P. D., Fearn, T., & Ramsey, M. H. (2020). Confidence intervals for robust estimates of measurement uncertainty. *Accreditation and Quality Assurance*, 25, 107–119. doi:10.1007/s00769-019-01417-4.
120. Sarhan, A. A., & Haririan, I. (2025). Impact of seasonal climate variations on pharmaceutical stability in different geographic warehouses: A longitudinal time series statistical analysis. *Applied Chemical Engineering*, 8(3), 5730. doi:10.59429/ace.v8i3.5730.
121. Sartorius. (n.d.). *MODDE® - Explore. Improve. Advance!* Преземено October 31, 2025 од Sartorius: <https://www.sartorius.com/en/products/process-analytical-technology/data-analytics-software/doe-software/modde>
122. Savitha, S., & Devi, K. (2022). Quality By Design: A Review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 12(2–S), 234–239. doi:10.22270/jddt.v12i2-S.5451.
123. Separovic, L., Simabukuro, R. S., Couto, A. R., Bertanha, M. L., Dias, F. R., Sano, A. Y., . . . Lourenço, F. R. (2023). Measurement Uncertainty and Conformity Assessment Applied to Drug and Medicine Analyses – A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 53(1), 123–138. doi:10.1080/10408347.2021.1940086.
124. Sha'at, M., Spac, A. F., Stoleriu, I., Bujor, A., Cretan, M. S., Hartan, M., & Ochiuz, L. (2022). Implementation of QbD Approach to the Analytical Method Development and Validation for the Estimation of Metformin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms by HPLC. *Pharmaceutics*, 14(6). doi:10.3390/pharmaceutics14061187.
125. Shabir, G. A., Lough, W. J., Arain, S. A., & Bradshaw, T. K. (2007). Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(3), 311–333. doi:10.1080/10826070601084753.
126. Sharma, M. K., & Murugesan, M. (2017). Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. *Journal of*

- Chromatography & Separation Techniques*, 8(1), 1–3. doi:10.4172/2157-7064.1000349.
127. Sharma, S., Devgun, M., Narang, R., Lal, S., & Rana, A. C. (2022). Thiazoles: A Retrospective Study on Synthesis, Structure-activity Relationship and Therapeutic Significance. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 56(3), 646–666. doi:10.5530/ijper.56.3.113.
128. Sheskey, P. J., Cook, W. G., & Cable, C. G. (Ур.). (2017). *Handbook of Pharmaceutical Excipients (8th ed.)*. London: Pharmaceutical Press.
129. Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., & Rahman, N. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), S1409–S1421. doi:10.1016/j.arabjc.2013.04.016.
130. Simmons, D. L., Botting, R. M., & Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 387–437. doi:10.1124/pr.56.3.3.
131. Simões, A., Veiga, F., & Vitorino, C. (2024). Question-based review for pharmaceutical development: An enhanced quality approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 195, 114174. doi:10.1016/j.ejpb.2023.114174.
132. Singh, A. K., Vashitha, Y., Jain, A., Gupta, G. D., & Verma, S. K. (2025). A Review on Advancement in Analytical Quality by Design (AQbD). *Current Analytical Chemistry*, 21(8), 901–922. doi:10.2174/0115734110321580240924073705.
133. Sinha, P. K., Jeswani, R. M., Topagi, K. S., & Damle, M. C. (2009). A validated RP-HPLC method for determination of Meloxicam in the Presence of its Impurities. *International Journal of PharmTech Research*, 1(4), 1051–1060.
134. Sonawane, J. K., Chavan, S. M., Narkar, I. P., Jale, S. C., Tendulkar, N. V., Jadhav, V., & Jain, A. (2023). A Review of Stability Indicating Methods and Forced Degradation Studies. *International Journal of Research Publication and Reviews*, 4(5), 4703–4715. doi:10.55248/gengpi.4.523.42372.
135. Sonawane, S., Jadhav, S., Rahade, P., Chhajed, S., & Kshirsagar, S. (2016). Development and Validation of Stability-Indicating Method for Estimation of Chlorthalidone in Bulk and Tablets with the Use of Experimental Design in Forced Degradation Experiments. *Scientifica*, 4286482. doi:10.1155/2016/4286482.

136. Starek, M., & Krzek, J. (2012). TLC DETERMINATION OF MELOXICAM IN TABLETS AND AFTER ACIDIC AND ALKALINE HYDROLYSIS. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 69(2), 225–235.
137. Sule, S., Ambadekar, S., Nikam, D., Sule, A., & Bhure, S. (2014). A PRACTICAL APPROACH TO RP HPLC ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT. *World Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 3(9), 258–279.
138. Suntornsuk, L., Bunavitayakij, P., & Pitayastienanan, P. (2005). Spectrophotometric method for the simultaneous determination of piroxicam and 2-aminopyridine. *Indian Journal of Chemistry - Section A*, 44(4), 737–740.
139. Taylor, C. J., Pomberger, A., Felton, K. C., Grainger, R., Barecka, M., Chamberlain, T. W., . . . Lapkin, A. A. (2023). A Brief Introduction to Chemical Reaction Optimization. *Chemical Reviews*, 123(6), 3089–3126. doi:10.1021/acs.chemrev.2c00798.
140. Tendulkar, N., & Asif, M. (2025). Analytical Strategies for Stability-Indicating Method Development: Challenges and Advances in Fixed-Dose Combination Formulations. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 15(2), 875–883. doi:10.25258/ijddt.15.2.64.
141. ter Horst, J. P., Turimella, S. L., Metsers, F., & Zwieters, A. (2021). Implementation of Quality by Design (QbD) Principles in Regulatory Dossiers of Medicinal Products in the European Union (EU) Between 2014 and 2019. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 55, 583–590. doi:10.1007/s43441-020-00254-9.
142. Terzić, J., Popović, I., & Jančić-Stojanović, B. (2014). Aspects of DryLab® software application in chromatography methods optimization and robustness testing. *Arhiv za farmaciju*, 64(3), 205–219. doi:10.5937/arhfarm1403205t.
143. The Engineering ToolBox. (2009). *Cubical expansion coefficients of liquids*. Преземено од https://www.engineeringtoolbox.com/cubical-expansion-coefficients-d_1262.html
144. Tome, T., Žigart, N., Časar, Z., & Obreza, A. (2019). Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. *Organic Process Research & Development*, 23(9), 1784–1802. doi:10.1021/acs.oprd.9b00238.

145. Uddin, S., Mamun, A. A., Rashid, M., & Asaduzzaman, M. (2016). In-Process and Finished Products Quality Control Tests for Pharmaceutical Capsules According to Pharmacopoeias. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 9(2), 1-9. doi:10.9734/BJPR/2016/22044.
146. Velichkovska, M., Balsikevska, E., Petrovska, A., Anevska Stojanovska, N., & Lazova, J. (2022). DryLab® software application for development of HPLC gradient method suitable for determination of three components in drug product. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 68(Suppl 1), 145–146. doi:10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.03.068.
147. Verch, T., Campa, C., Chéry, C. C., Frenkel, R., Graul, T., Jaya, N., . . . Ranheim, T. (2022). Analytical Quality by Design, Life Cycle Management, and Method Control. *The AAPS Journal*, 24, 34. doi:10.1208/s12248-022-00685-2.
148. Viaene, J., & Heyden, Y. V. (2020). Chapter 5 - Experimental design-based optimization strategies for chromatographic and capillary electrophoretic separations. Bo K. Valkó (Ур.), *Handbook of Analytical Separations* (Том 8, стр. 197–275). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-64070-3.00005-9.
149. Volk, B., Dancsó, A., Bakó, T., Peltz, C., & Simig, G. (2011). Structure Assignment of a Pharmacopeial Impurity of Meloxicam. *Organic Process Research & Development*, 15(2), 339–342. doi:10.1021/op100241h.
150. Vyas, A. J., Jadav, C. D., Patel, A. I., Patel, A. B., Shah, S. R., Sheth, D., & Dholakia, S. (2023). Review on Stability Indicating Assay Method or Forced Degradation Study: Strategy and Regulatory Consideration. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(2), 131–139. doi:10.52711/2231-5675.2023.00022.
151. Vyas, A. J., Visana, N. M., Patel, A. I., Patel, N. K., & Shah, S. R. (2021). Analytical Quality by Design in Stress Testing or Stability - Indicating Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 170–178. doi:10.52711/2231-5675.2021.00029.
152. Waterman, K. C., & Adami, R. C. (2005). Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 293(1–2), 101–125. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.12.013.
153. Waterman, K. C., Adami, R. C., Alsante, K. M., Antipas, A. S., Arenson, D. R., Carrier, R., . . . Wang, H. (2002). Hydrolysis in Pharmaceutical

- Formulations. *Pharmaceutical Development and Technology*, 7(2), 113–146. doi:10.1081/PDT-120003494.
154. Watson, D. G. (2016). *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists (4th ed.)*. Amsterdam: Elsevier.
155. Weitzel, M. L. (2012). The estimation and use of measurement uncertainty for a drug substance test procedure validated according to USP <1225>. *Accreditation and Quality Assurance*, 17(2), 139–146. doi:10.1007/s00769-011-0835-5.
156. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. (н.д.). *ATC/DDD Index: M01AC06 – Meloxicam*. Преземено од ATC/DDD Index: https://atcddd.fhi.no/atc_ddd_index/?code=M01AC06
157. Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., Charman, W. N., Pouton, C. W., & Porter, C. J. (2013). Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 315–499. doi:10.1124/pr.112.005660.
158. Xu, S., Hermanson, D. J., Banerjee, S., Ghebreselasie, K., Clayton, G. M., Garavito, R. M., & Marnett, L. J. (2014). Oxicams Bind in a Novel Mode to the Cyclooxygenase Active Site via a Two-water-mediated H-bonding Network. *Journal of Biological Chemistry*, 289(10), 6799–6808. doi:10.1074/jbc.M113.517987.
159. Yeğen, G., Senel, C., Pabuccuoğlu, S. K., & Aksu, B. (2023). APPLICATIONS OF MATHEMATICAL MODELLING IN PHARMACEUTICAL FORMULATION AND PROCESS DEVELOPMENT. *AURUM Journal of Engineering Systems and Architecture*, 7(2), 303–313. doi:10.53600/ajesa.1382037.
160. Zakrajšek, J., Stojčič, V., Bohanec, S., & Urleb, U. (2015). Quality by Design Based Optimization of a High Performance Liquid Chromatography Method for Assay Determination of Low Concentration Preservatives in Complex Nasal Formulations. *Acta Chimica Slovenica*, 62(1), 72–82. doi:https://10.17344/acsi.2014.718.