

# Razvoj metode za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari entakapon kromatografijom superkritičnih fluida (SFC)

---

Omerbašić, Aida

Professional thesis / Završni specijalistički

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:352250>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET**

**Aida Omerbašić**

**RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U DJELATNOJ**  
**FARMACEUTSKOJ TVARI ENTAKAPON KROMATOGRAFIJOM**  
**SUPERKRITIČNIH FLUIDA (SFC)**

**Specijalistički rad**

**Zagreb, 2019.**

**PSS studij:** Razvoj lijekova

**Mentor rada:** Prof.dr.sc. Biljana Nigović

Specijalistički rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Rad ima \_\_ listova.

## **PREDGOVOR**

**Ovo istraživanje je provedeno u okviru Poslijediplomskog specijalističkog studija Razvoj lijekova na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu.**

**Eksperimentalni dio rada proveden je u Pliva Hrvatska d.o.o.**

**Na odabir teme završnog rada najviše je utjecao moj dosadašnji rad u farmaceutskoj industriji, te spoznaja važnosti razvoja preciznih analitičkih metoda za kontrolu kakvoće aktivnih farmaceutskih supstancija.**

**Ovim radom proširila sam svoje znanje na području razvoja i validacija analitičkih metoda korištenjem superkritične fluidne kromatografije.**

**Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na pristupačnosti i stručnim savjetima vezanim uz izradu završnog rada.**

**Zahvaljujem kolegi Mislavu Runji (Pliva, TAPI, Istraživanje i razvoj) na literaturi i podijeljenom znanju potrebnom za eksperimentalni dio ovog rada.**

**Hvala mami, tati i Tariku na bezrezervnoj podršci.**

## **SAŽETAK**

### **CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je razvoj metode za analizu onečišćenja entakapona sintetiziranih Pliva Hrvatska d.o.o upotrebom kromatografije superkritičnih fluida, te usporedba s postojećom internom HPLC metodom s naglaskom na njezine prednosti.

Osim razvoja i validacije SFC metode, onečišćenja entakapona će se karakterizirati tehnikom masene spektrometrije (LC-MS). Obraditi će se i literaturno poznate kromatografske metode razvijene i korištene za analitičko ispitivanje entakapona u farmaceutskim formulacijama.

### **MATERIJAL/METODE**

Istraživanja provedena u okviru ovog specijalističkog rada obuhvaćaju pregled svih dostupnih publikacija koristeći dostupne bibliografske baze podataka i servise (Medline/PubMed, ScienceDirect, EMBASE i drugih), uz primjenu ključnih riječi poput: entacapone, quality control, UHPLC, HPLC, SFC i sl.

Napravljena je detaljna studija razvijene interne UHPLC metode za stabilitetna ispitivanja aktivne farmaceutske supstancije entakapon, te prednosti korištenja iste naspram postojeće HPLC metode također razvijene u odjelu Istraživanja i razvoja TAPI R&D Pliva Hrvatska d.o.o.

Korišten je Waters UPC<sup>2</sup> sistem s PDA detektorom i gradijentnom pumpom. Optimalna kromatografska kolona je Waters UPC<sup>2</sup>BEH C18, dimenzija 100 mm x 3.0 mm i promjera čestica 1,7 µm. Za evaluaciju podataka korišteno je Waters Empower 2 CDS upravljačko sučelje. Detekcija onečišćenja je izvršena tehnikom masene spektroskopije, uz korištenje Agilent 6490 LC-MS/MS sistema spregnutog s Agilent 1290 UHPLC te Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition for Triple Qual B.01.04 (B84) upravljačko sučelje.

## REZULTATI

Gradijentna metoda superkritične fluide kromatografije odjeljuje entakapon i dvanaest njegovih onečišćenja koristeći kromatografsku kolonu Waters Acquity UPC<sup>2</sup> BEH. Valna duljina detekcije je 210 nm, protok pokretne faze je 3.0 mL/min. Razlučivanje između pikova entakapona i onečišćenja je veće od 1.5. Metoda je dokazano selektivna, linearna, precizna, točna, robusna, a određene su granice detekcije i kvantifikacije. Granica detekcije je potvrđena za sve komponente i iznosi 0.01%, relativno u odnosu na koncentraciju ispitivane otopine uzorka entakapona od 1.0 mg/mL.

## ZAKLJUČAK

Ukazana je prednost razvoja metode za tekućinsku kromatografiju ultra visoke učinkovitosti nad metodama za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti na primjeru entakapona. Razvijena SFC metoda ima prednost nad svim literaturno poznatim zbog separacije svih sastavnica u prihvatljivom vremenu trajanja analize od 18 minuta.

## **SUMMARY**

## **OBJECTIVES**

Aim of this study is development of method for determination of impurities in entacapone using supercritical fluid chromatography and comparison with existing In house HPLC method to show benefits of using SFC. All synthesized impurities will be characterized with LC-MS/MS technique

## **MATERIAL AND METHODS**

The research conducted in this specialist thesis includes the overview of relevant publications available through public bibliographic databases and services (Medline/PubMed, ScienceDirect, EMBASE .) obtained by searching the following keywords: entacapone, quality control, UHPLC, HPLC, SFC etc.

In this study was used Waters UPC<sup>2</sup> system with PDA detector and gradient pump. Optimal chromatography column is Waters UPC<sup>2</sup>BEH C18, 100 mm x 3.0 mm, 1.7  $\mu$ m. For data processing is used Waters Empower 2 CDS. Detection of impurities was done using mass spectrometry by using Agilent 6490 LC-MS/MS system coupled with Agilent 1290 UHPLC and for data processing Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition for Triple Quad B.01.04 (B84)

## **RESULTS**

Gradient supercritical fluid chromatography method separates entacapone and twelve impurities using Waters Acquity UPC<sup>2</sup> BEH column. Detection wavelength is 210 nm, flow of mobile phase is 3.0 mL/min. Resolution between entacapone and impurities is not less than 1.5. Method is validated in all parameters (selectivity, linearity, accuracy, precision, robustness). Detection limit is determined at 0.01% of nominal concentration of sample (1.0 mg/ml)

## **CONCLUSION**

An advantage of supercritical fluid chromatography has been pointed out from high performance liquid chromatography on example of Entakapone. Developed SFC method has advantage over all literary known methods since it separates largest number of impurities in only 18 minutes.

## SADRŽAJ

|                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| PREDGOVOR .....                                                                                                                                                      | III |
| SAŽETAK .....                                                                                                                                                        | IV  |
| SUMMARY .....                                                                                                                                                        | VI  |
| 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....                                                                                                                         | 1   |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....                                                                                                                                           | 2   |
| 3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI .....                                                                                                      | 3   |
| 3.1. ENTAKAPON .....                                                                                                                                                 | 3   |
| 3.2. PARKINSONOVA BOLEST.....                                                                                                                                        | 4   |
| 3.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI .....                                                                                                           | 5   |
| 3.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE<br>UČINKOVITOSTI SUSPREGNUTA S MASENIM DETEKTOROM (LC-<br>MS).....                                                       | 7   |
| 3.5. TANDEMSKA SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS).....                                                                                                                   | 8   |
| 3.6. SUPERKRITIČNA FLUIDNA KROMATOGRAFIJA .....                                                                                                                      | 9   |
| 3.6.1. Superkrični fludi .....                                                                                                                                       | 11  |
| 3.6.2. Primjena SFC u farmaceutskoj industriji .....                                                                                                                 | 14  |
| 3.7. VALIDACIJA METODE.....                                                                                                                                          | 18  |
| 3.8. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....                                                                                                                          | 21  |
| 3.9. EKSPERIMENTALNI PODACI .....                                                                                                                                    | 22  |
| 3.9.1. Kemikalije .....                                                                                                                                              | 22  |
| 3.9.2. Standardi.....                                                                                                                                                | 22  |
| 3.9.3. Nepokretne faze korištene u razvoju metode fluidne kromatografije pri<br>superkričnim uvjetima.....                                                           | 25  |
| 3.9.4. Instrumenti.....                                                                                                                                              | 26  |
| 3.9.5. Metode rada .....                                                                                                                                             | 28  |
| 3.9.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrijom<br>masa .....                                                                     | 28  |
| 3.9.5.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornost vezana s trostrukim<br>kvadripolom.....                                                                 | 29  |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....                                                                                                                                         | 30  |
| 4.1. Razvoj metode fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima (UPC <sup>2</sup> -<br>PDA) za kvantitativno određivanje entakapona i njegovih onečišćenja ..... | 30  |
| 4.1.1. Izbor nepokretne faze .....                                                                                                                                   | 31  |

|        |                                 |    |
|--------|---------------------------------|----|
| 4.1.2. | Utjecaj modifikatora .....      | 32 |
| 4.1.3. | Utjecaj temperature kolone..... | 32 |
| 4.1.4. | Utjecaj protoka.....            | 33 |
| 4.1.5. | Utjecaj tlaka na detektoru..... | 33 |
| 4.2.   | VALIDACIJA METODE.....          | 35 |
| 4.2.1. | Selektivnost .....              | 35 |
| 4.2.2. | Limit detekcije (DL) .....      | 38 |
| 4.2.3. | Limit kvantifikacije (QL) ..... | 39 |
| 4.2.4. | Linearnost metode.....          | 40 |
| 4.2.5. | Robusnost metode.....           | 41 |
| 4.2.6. | Preciznost .....                | 42 |
| 4.2.7. | Točnost.....                    | 43 |
| 4.2.8. | Stabilnost .....                | 44 |
| 5.     | ZAKLJUČAK.....                  | 46 |
| 6.     | PRILOZI.....                    | 47 |
| 7.     | LITERATURA .....                | 52 |
| 8.     | ŽIVOTOPIS.....                  | 55 |

## **1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA**

Lijek osim djelatne tvari može sadržavat i različita onečišćenja nastala tijekom proizvodnje ili razgradnjom njegove djelatne tvari. Ona mogu utjecati na njegovu učinkovitost, ali i sigurnu primjenu. Onečišćenja su neželjene komponente koje mogu biti potencijalno genotoksične, mutagene ili kancerogene. Radi toga je izuzetno važno identificirati prisutnost onečišćenja, kvantificirati ih te odrediti im kemijsku strukturu. Razvojem moderne analitičke instrumentacije razvile su se selektivne i osjetljive metode koje specifično odgovaraju na zahtjeve farmaceutске regulative<sup>1</sup>.

Entakapon je organska molekula koja inhibira enzim katehol-O-metiltransferazu i na taj način pojačava učinke levodope. Koristi se za liječenje Parkinsonove bolesti u kombinaciji s karbidopom i levodopom. Za kvantitativno određivanje entakapona koriste se metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti<sup>2,3</sup>.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

U ovom radu razvijena je i validirana metoda za analizu dvanaest poznatih onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari entakapon koristeći kromatografiju superkritičnih fluida (SFC) te je uspoređena s postojećom UHPLC metodom također razvijenom u odjelu Istraživanja i razvoja TAPI R&D Pliva Hrvatska d.o.o. Struktura razgradnih produkata određena je tehnikom tekućinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS).

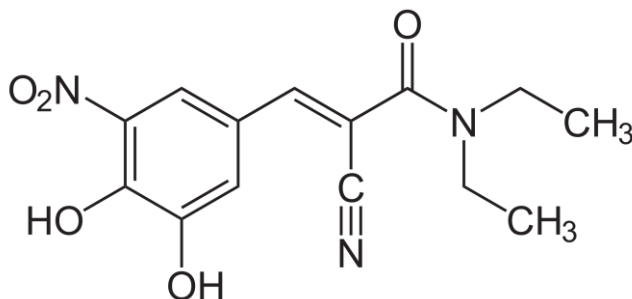
Istaknuta je prednost korištenja SFC nad UHPLC metodom u vidu trajanja analize i potrošnje otapala te ekološkog aspekta.

### 3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

#### 3.1. ENTAKAPON

Entakapon (Slika 1.) je aktivna farmaceutska tvar koja se koristi u kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje Parkinsonove bolesti. U svojoj strukturi sadrži 14 atoma ugljika, a molekulska masa mu je 305,29 Da.

Organska je molekula koja posjeduje inhibitorsko djelovanje na enzim katehol-O-metiltransferazu (COMT), a klasificiran je kao selektivan i reverzibilan inhibitor. Navedeni enzim se nalazi u metaboličkom putu druge aktivne farmaceutske tvari levodope (LD). Inhibirajući ovaj enzim, entakapon pojačava učinke levodope. Entakapon se koristi samo u kombinaciji s LD-om, blokira njenu razgradnju prije ulaska u mozak i na taj način produžava njezino djelovanje<sup>2,3</sup>. To dovodi do povećanja bioraspoloživosti i koncentracije LD koja dostiže u mozak. Entakapon inhibira enzim COMT pretežno u perifernim tkivima, a njegova aktivnost je dokazana u kliničkim studijama. Na temelju tih istraživanja dopuštena je njegova upotreba u liječenju Parkinsonove bolesti. Entakapon reducira mogućnost razvoja motoričkih komplikacija. Ipak, ima ograničenu upotrebu zbog utjecaja na jetru. Entakapon se veže na proteine plazme, uglavnom na albumin te se brzo metabolizira<sup>4</sup>.

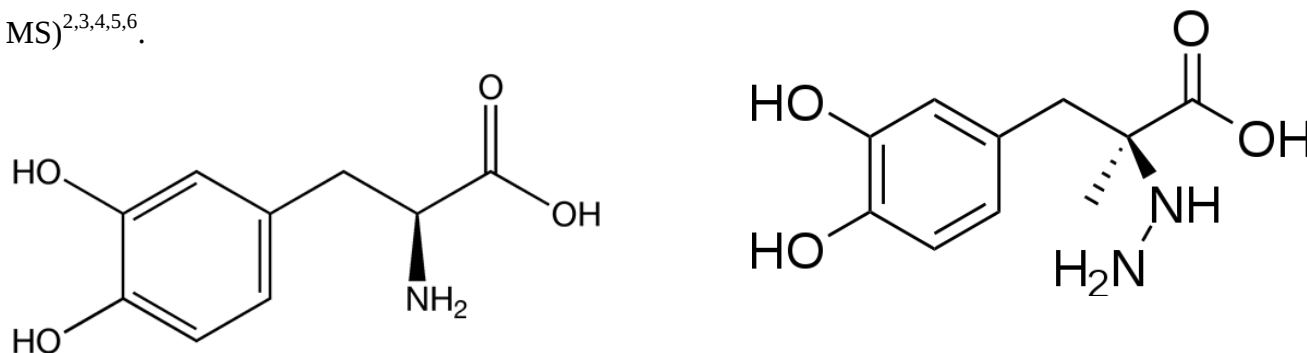


**Slika 1.** Struktura Entakapona

### 3.2. PARKINSONOVA BOLEST

Parkinsonova bolest je progresivno degenerativno stanje, općenito okarakterizirano drhtanjem (tremorom), usporenošću pokreta (bradikinezijom), ukočenošću te abnormalnostima držanja tijela. U svojem najozbiljnijem obliku, povezana je s dubokim fizičkim i mentalnim poremećajem. Drugi je najčešći progresivni poremećaj koji pogađa približno 1-2 % populacije u dobi iznad 50 godina. Uzrok ove bolesti je degeneracija dopaminskih neurona, što uzrokuje smanjenje razine dopamina u središnjem živčanom sustavu, a to dovodi do neravnoteže u motoričkom sustavu. Liječenje Parkinsonove bolesti počinje terapijom lijekovima, uz kirurške zahvate i fizičko liječenje<sup>2,3</sup>. Terapija lijekovima za cilj ima povrat razine dopamina u mozak. Na taj način se poboljšava motorička kontrola te smanjuju simptomi bolesti. Kao zamjena za dopamin, njegov prekursor levendopa je najučinkovitiji lijek za liječenje ove bolesti. Istraživanja su pokazala smanjenje simptoma u prvi pet do deset godina nakon početka terapije levendopom.

Kako bi se poboljšala učinkovitost ovog lijeka, potrebni su inhibitori koji bi sprječavali metaboličku razgradnju levendope. Tako je za dopa dekarboksilazu (DDC) najčešći inhibitor karbidopa (CD), a za COMT entakopon. Kako bi se dobila dobra i učinkovita terapijska doza bilo je potrebno naći odgovarajuće kvalifikacijske omjere ova tri lijeka zajedno. Levendopa se može odrediti sama ili zajedno s kardiopom metodama elektrokemije, kapilarne elektroforeze ili tekućinske kromatografije visoke djelotvornost uz detekciju masnom spektrometrijom (UHPLC-MS)<sup>2,3,4,5,6</sup>.



**Slika 2.** Struktura levodope i kardiope

Koktel lijekova korišten za liječenje Parkinsonove bolesti sastavljen je od levodope, kardiope (Slika 2.), entakapona i moguće još nekih drugih aktivnih farmaceutskih tvari (API-a) zahtjevan je za analizu budući da svaka od ovih komponente nosi i određena onečišćenja.

### **3.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI**

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja sastojaka ispitivanog uzorka na temelju njihovih različitih putovanja kroz kromatografsku kolonu. Sustav u kojem se sastojci odjeljuju sastoji se od pokretne i nepokretne faze. Za odjeljivanje potrebno je da molekule imaju različit afinitet prema nepokretnoj fazi. Tako će se molekule koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi čvršće vezati na nju i eluirati sporije s kromatografske kolone od molekula s manjim afinitetom prema nepokretnoj fazi.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je najčešće korištena tehnologija za analizu lijekova u zadnjih 30 godina<sup>9,10</sup>. HPLC ima niz prednosti među kojima se ističe brzina, visoka moć razlučivanja, osjetljivost, ponovljivost, točnost i automatiziranost, zbog čega je postala nezaobilaznom tehnikom kako u farmaceutskoj industriji, tako i u analitici općenito<sup>11,12</sup>. Koristi se za određivanje sadržaja aktivne djelatne tvari, razgradnih produkata, onečišćenja i intermedijera, kao i praćenja reakcije prilikom sinteze aktivne djelatne tvari<sup>13</sup>.

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) je vrsta kolonske tekućinske kromatografije pri kojoj je ona odvija pri visokom tlaku instrumentaciji i koristi nepokretnu fazu s česticama promjera manjeg od 2  $\mu\text{m}$  s ciljem ostvarivanja boljeg razlučivanja i osjetljivosti te veće brzine analize u odnosu na klasične HPLC metode<sup>8</sup>. Faktor koji utječe na poboljšanje separacije je vrsta nepokretne faze.

Time se omogućava bolje razlučivanje između razdvojenih pikova supstancije u kraćem vremenu. U terminima efikasnosti, točnosti i produktivnosti, razvoj UHPLC tehnike donosi brojne prednosti nad HPLC tehnikom upravo i zbog smanjene potrošnje utrošenih reagensa i kraćeg vremena same analize<sup>8</sup>.

Tekućinski kromatograf sastoji se od <sup>14, 15</sup>:

- *spremnika pokretne faze i sustav za obradu otapala* – sastoji se od jednog ili više spremnika u kojima se nalazi otapalo. U sklopu sustava nalazi se oprema za uklanjanje plinova i čvrstih čestica iz tekućina.
- *crpke* – omogućuju konstanto unošenje pokretne faze u kolonu, zahtjevi za crpke su sljedeći: tlakovi do 40 milijuna Pa, izlaz bez pulsiranja tlaka, brzine protoka od 0,1 mL min<sup>-1</sup> do 10 mL min<sup>-1</sup>, reproducibilnost protoka, otpornost na koroziju izazvanu uporabom različitih otapala. Za primjenu u tekućinskoj kromatografiji pogodne su dvije vrste mehaničkih crpki: crpka s vijčanim pogonom i recipročna crpka. Uređaji na kojima su provedena ispitivanja koristili su recipročne crpke. Recipročna crpka sastoji se od male komore u obliku cilindra koja se puni i prazni micanjem klipa naprijed-natrag. Micanje klipa stvara pulsirajući protok koji treba prigušiti. Prednosti recipročnih pumpi su mali unutarnji volumen, visoki vanjski tlak, mogućnost primjene gradijentnog eluiranja, stalni protoci koji ne ovise o povratnom tlaku u koloni ni viskoznosti otapala.
- *sustava za unošenje uzorka* – služi za automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu. Uzorak se najčešće unosi putem plinskog ventila, uz njega se nalazi više izmjenjivih petlji preko kojih se na kolonu mogu nanositi različiti volumeni uzorka.
- *kolone* – najčešće je čelična cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza. Dimenzije kolone, duljina i unutarnji promjeri mogu biti različiti. Duljina kolone može biti od 50 mm do 250 mm, a promjer kolone od 2 mm do 4,6 mm. U koloni se nalaze materijali koji se sastoje od sitnih čestica, čime se povećava površina nepokretne faze.
- *detektora* – ne postoji univerzalni detektor, odabir detektora ovisi o prirodi uzorka. Detektori koji se u tekućinskoj kromatografiji najčešće primjenjuju temelje se na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja. Najčešći detektori su spektrofotometri, detektori s nizom fotoosjetljivih dioda (engl. *dioda array detector*, DAD), fluorescencijski detektori (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektori (engl. *electrochemical detector*, ED), detektori indeksa loma (engl. *refractive indeks detector*, RID) ili detektori raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *evaporative light-scattering detector*, ELSD). Detektor je spojen na računalni sustav za obradu podataka koji pomoću električnog signala generira grafički zapis na ekranu, kromatogram. Dobar

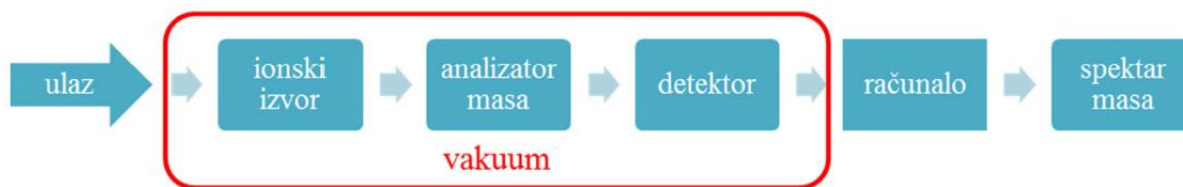
detektor osjetljiv je na niske koncentracije analita, nije osjetljiv na promjene temperature i sastav pokretne faze te osigurava linearan odgovor u širokom koncentracijskom području.

Metoda odabira prilikom analize stabilitetno-indikativnih parametara je obrnuto fazna tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (RP-HPLC), prvenstveno zbog visokog stupnja preciznosti, osjetljivosti i mogućnosti detekcije komponenata različite polarnosti. Separacija pikova se postiže odabirom optimalnog tipa kolone, temperature kolone i pH mobilne faze. Isto se dodatno potencira mijenjanjem sastava mobilne faze prilikom razvoja gradijentnih metoda, pri čemu dolazi do ranog eluiranja visoko polarnih komponenti. Pokretna faza i otapalo trebaju biti kompatibilni sa supstancijom, razgradnim produktima i potencijalnim onečišćenjima.

### **3.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE UČINKOVITOSTI SUSPREGNUTA S MASENIM DETEKTOROM (LC-MS)**

Tekućinska kromatografija (LC) i spektrometrija masa (MS) do prije dvadesetak godina bile su dvije potpuno odvojene tehnike, uglavnom zbog nepostojanja odgovarajućeg sučelja putem kojeg bi se povezale ove dvije tehnike. Međutim, sedamdesetih i osamdesetih godina došlo je do povezivanja LC i MS na područjima mehanizama desorpcije, otparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi, ionizacije pri atmosferskom tlaku i povezivanja ionizatora i analizatora, što je predstavljalo ogroman iskorak k rutinskoj upotrebi tzv. vezanog sustava LC-MS<sup>16</sup>.

Spektrometrija masa je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase, točnije ionizirane molekule se razdvajaju na osnovi razlike u omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Instrument se sastoji od 3 dijela: ionizator, analizator masa i detektor (Slika 3.).

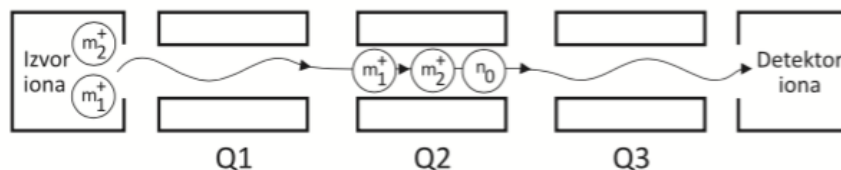


**Slika 3.** Shematski prikaz spektrometra masa

U ionskom izvoru dolazi do ionizacije molekula. Ovisno o količini energije koja se primjenjuje u procesu ionizacije i o svojstvima analita, molekule se mogu različito ionizirati <sup>16</sup>. Za ionizaciju molekula u plinovitom stanju koristi se ionizacija elektronima, kemijska ionizaciju i ionizacija u polju. Pri ionizaciji elektronima dolazi do sudara između molekula uzorka i elektrona pri čemu nastaje veliki broj fragmenata pa u spektru masa signal molekulskog iona može izostati. Za razliku od ionizacije elektronima, kemijska ionizacija koristi plin reagens za ionizaciju molekula uzorka. Prvo se ionizira plin reagens ionizacijom elektronima, koji zatim ionizira uzorak reakcijama kojim mogu nastati pozitivno i negativno nabijeni ioni. Pri kemijskoj ionizaciji u spektru masa jasno se vidi signal molekulskog iona.

### 3.5. TANDEMSKA SPEKTROMETRIJA MASA (LC-MS/MS)

LC-MS/MS predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu ili prostoru, s ciljem da se unaprijedi separacija ili izazove dodatna fragmentacija, pomoću koje možemo kvalitetnije odrediti strukturu analiziranog iona. Spektrometre masa s analizatorom MS/MS možemo podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom, spektrometri masa s više analizatora (trostruki kvadrupol, skraćenica QQQ, engl. *triple quadrupol*) (Slika 4.), te spektrometri masa s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija.



**Slika 4.** Shematski prikaz trostrukog kvadrupola

Kvadrupol se sastoji od 4 metalne, valjkaste i paralelne elektrode od kojih dvije imaju negativni, a dvije pozitivni naboj, te funkcionira kao filter masa. Jedan par elektroda je spojen na određeni konstantni napon i promjenjivu radiofrekvenciju, a drugi ima napon i radiofrekvenciju suprotne polarnosti. Ioni prolaze kroz središte kvadrupola i pri danim uvjetima napona i frekvencije samo ioni određenog omjera  $m/z$  imaju stabilnu putanju i prolaze do detektora. Variranjem frekvencije ioni različitih  $m/z$  se dovode u fokus detektora. Skenirati se mogu sve mase ili samo jedna određena masa <sup>17</sup>.

Korištenje LC-MS/MS tehnike ima prednost nad LC-MS tehnikom upravo zbog povećane osjetljivosti (u QQQ zbog smanjenog šuma detektora) i povećane specifičnosti detekcije. Ova detekcija i separacija se odvija u sekundama, tako da do detekcije određenih fragmenata dolazi dok se još odvija separacija na samoj koloni UHPLC instrumenta. Primjer prednosti korištenja LC-MS/MS tehnike nad LC-MS tehnikom su strukturalni izomeri sličnog kemijskog ponašanja na koloni koji jednostrukim ioniziranjem (LC-MS) daju iste ione u masenom spektru, a dodatnom fragmentacijom (LC-MS/MS) daju različite ionske fragmente.

### 3.6. SUPERKRITIČNA FLUIDNA KROMATOGRAFIJA

Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (SFC) je kromatografska tehnika koja se temelji na svojstvima tekućinske i plinske kromatografije, pri uvjetima temperature i tlaka pri kojima se pokretna faza ponaša kao superkritični fluid<sup>18</sup>. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima počiva na principima kromatografije normalnih faza, zbog niske viskoznosti fluida u superkritičnom stanju, kolona ima visoku efikasnost <sup>19</sup>.

Prva upotreba fluida u superkritičnom stanju dokumentirana je još davne 1962.<sup>20</sup>. Uočeno je da se neki fluidi prilikom tlačenja i grijanja iznad njihove kritične točke, ponašaju kao eluensi u kromatografiji. Viskoznost i difuzivnost takvog fluida je vrlo blizu karakteristika plinova što rezultira porastom efikasnosti separacije pri visokoj brzini pokretne faze, ali se i dalje zadržava vrlo nizak tlak. Nadalje, njihova gustoća i moć otapanja, koji su vrlo slični karakteristikama tekućina, rezultiraju dobrom topljivosti i brzim prijenosom analita. Unatoč tim zanimljivim karakteristikama, farmaceutska industrija nije pokazala zanimanje za SFC u to vrijeme, nego nastavlja s korištenjem klasičnih i razvijenih tekućih i plinskih kromatografskih tehnika.

Daljnji razvoj SFC tehnika odvijao se u ranim 1980-tim kada je predstavljen koncept kapilarne SFC (cSFC). cSFC se temelji na korištenju kapilara ili otvorenih tubularnih kolona s pokretnom fazom koja je bila u potpunosti superkritični fluid ili eventualno superkritični fluid s dodatkom vrlo malo modifikatora. Ovakva tehnika svoju inicijalnu primjenu našla je u plinskoj kromatografiji. Nekoliko fluida može se koristiti za SFC budući da imaju kritični tlak ( $p_k$ ) i kritičnu temperaturu ( $T_k$ ) koji se mogu jednostavno postići. Unatoč tome, ugljični dioksid ( $\text{CO}_2$ ) nametnuo se kao preferirani superkritični fluid u odnosu na ostale poput primjerice ugljikovodika,  $\text{N}_2\text{O}$  ili amonijaka koji su imali nekoliko nedostataka vezanih uz sigurnost, koroziju, neprikladnosti za termički nestabilne spojeve i utjecaj na okoliš<sup>21</sup>.

U nekoliko zadnjih godina, SFC se naglo razvila, a najviše je tomu doprinijela nova generacija instrumenata i kolona. Razvojem naprednih instrumenta najveći napredak ostvaren je u rješavanju poznatih nedostataka SFC kao što su slaba UV osjetljivost, ograničena pouzdanost i slabe mogućnosti kvantifikacije.

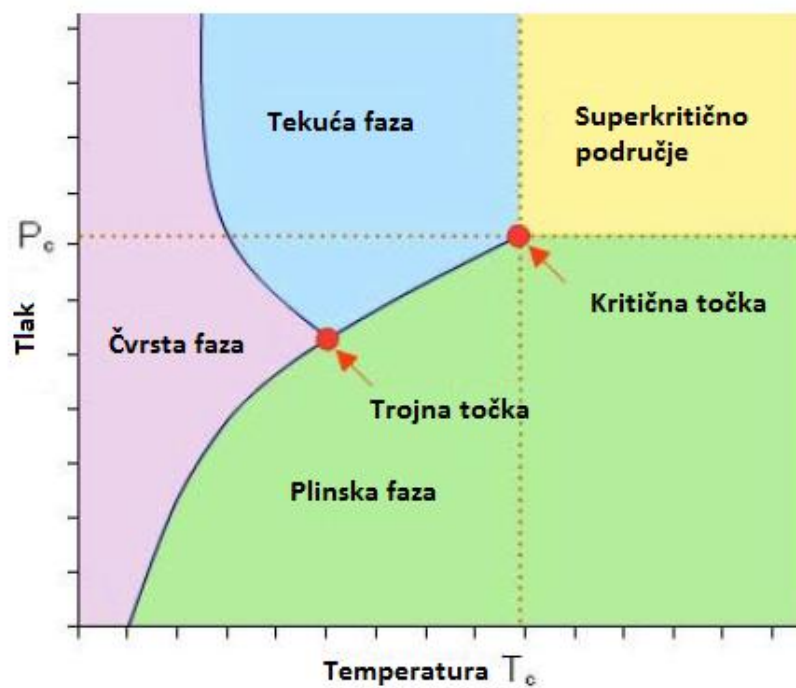
Nepokretne faze koje se koriste u SFC jednake su nepokretnim fazama koje se trenutno koriste u kromatografiji normalnih faza. Za separaciju se koriste različite pokretne faze, iako se one koje se temelje na ugljikovom dioksidu najčešće koriste. Pri odabiru pokretne faze za SFC sustave važno je imati na umu da ugljikov dioksid najčešće zahtjeva dodatak organskih modifikatora (kao što su alkoholi) za eluiranje polarnih analita<sup>22,23</sup>

Nedostaci SFC su uglavnom vezani uz pokretnu fazu ili opremu, a uključuju<sup>24,25</sup>

- ograničen odabir pokretne faze,
- ograničenu topljivost analita u pokretnoj fazi,
- neželjene reakcije s pokretnom fazom (na primjer, pri superkričnim uvjetima CO<sub>2</sub> stvara karbamične kiseline s primarnim ili sekundarnim aminima) te
- ponavljanje i konsantno formiranje gradijenta koji uključuje i superkrični CO<sub>2</sub> i polarni organski modifikator.

### 3.6.1. Superkrični fluidi

Za svaku tvar koja ostaje stabilna iznad svojih kritičnih uvjeta (grijana iznad njene kritične temperature i tlačena iznad njenog kritičnog tlaka) kaže se da je u superkričnom stanju, a tvari pri takvim uvjetima nazivamo superkrični fluidi<sup>26</sup> (Slika 5.). Pri tome, kritični tlak ( $p_k$ ) podrazumijeva najviši tlak pri kojem se, povećanjem temperature, tekućina može pretvoriti u plin, a kritična temperatura ( $T_k$ ) je najveća temperatura pri kojoj se tekućina može povećanjem tlaka pretvoriti u plin.



**Slika 5.** Fazni dijagram

Kritična točka definira uvjete (temperatura, tlak i ponekad sastav) pri kojima fluid ulazi u superkritično područje te ima nisku viskoznost. Trojna točka čiste tvari određena je temperaturom i tlakom pri kojima koegzistiraju tri faze te tvari (plinovita, tekuća i kruta) u termodinamičkoj ravnoteži. Za čisti ugljikov dioksid kritična točka nalazi se pri  $T_k=31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $p_k=73,8\text{ bara}$ , dok je trojna točka pri  $T_{tr}=-56,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $p_{tr}=5,17\text{ bara}$ .

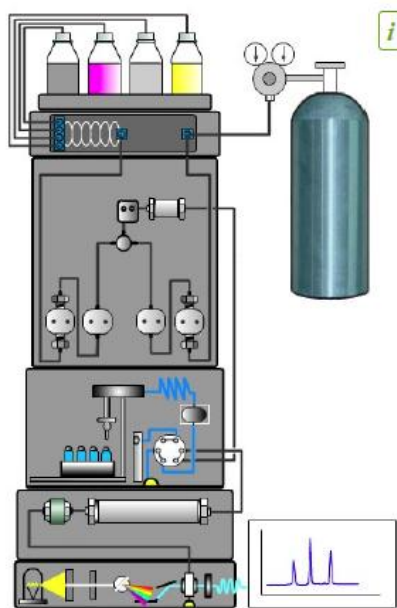
Plin neće kondenzirati u tekuće stanje iznad svoje kritične temperature bez obzira kako se tlak podizao. Na isti način, tekućina neće prelaziti u plinovito stanje iznad svojeg kritičnog tlaka bez obzira koliko se temperatura podizala<sup>27</sup>.

Superkrtični fluidi nisu ni tekućine ni plinovi, može se reći da su to fluidi s moći otapanja sličnom tekućinama, ali sa različitim svojstvima nego plinovi. Zbog toga ne možemo definirati superkritične fluide kao tekućine ili plinove, ali upravo zato su zanimljivi kao pokretne faze za kromatografsko razdvajanje.

Korištenje prikladnih uvjeta temperature i tlaka te sastava pokretne faze kritično je u SFC separaciji. Zbog različitih razloga, izvedbe instrumenta i načela rada te utjecaja zbog dodavanja modifikatora, može se reći da korisnici zapravo rade s donekle superkritičnim fluidima. No unatoč tome, bitnija je ponovljivost primjenjenih uvjeta, nego apsolutna potvrda da se radi u superkritičnim uvjetima. Varijacije koje uključuju koncentraciju ili vrstu organskog modifikatora promijeniti će superkritične karakteristike sustava.

Za razliku od plinske kromatografije, pri radu s SFC mogu se koristiti niske temperature. Rad pri nižim temperaturama rezultira sljedećim prednostima:

- smanjenje faktora zadržavanja,
- povećanje potencijala za enantioselektivnost i
- mogućnost analize temperaturno osjetljivih uzoraka.



**Slika 6.** Shema SFC uređaja <sup>28</sup>

Danas se najviše primjenjuje SFC koja koristi HPLC opremu (Slika 6.) za postizanje separacije pri superkritičnim uvjetima. Postoji nekoliko ključnih karakteristika koje razlikuju pakiranu SFC u odnosu na tradicionalnu HPLC izvedbu koje uključuju:

- potreba za spremnikom za CO<sub>2</sub>,
- oprema za regeneraciju CO<sub>2</sub> (npr. uklanjanje ostatka organskog modifikatora prije recirkuliranja ili odlaganja u spremnik) i
- restrikcija tlaka postavljena iza kromatografske kolone.

Separacija pri superkritičnim uvjetima provodi se pri protocima pokretne faze od nekoliko mililitara u minuti i volumenima injektiranja u rasponu od nekoliko do nekoliko stotina mikrolitara što SFC čini prikladnu za rad kao preparativnu kromatografiju.

Miješanje CO<sub>2</sub> pri superkritičnim uvjetima s organskim modifikatorom ostvaruje se na sličan način kao miješanje otapala u HPLC-u.

Važnost SFC je u tome što dopušta razdvajanje i određivanje skupina spojeva koje se uobičajeno ne mogu odrediti niti plinskom niti tekućinskom kromatografijom, za analizu analita niske molekularne težine te toplinski labilnih molekula. Spojevi koji se određuju su ili neisparljivi ili osjetljivi na povišenu temperaturu tako da se ne može upotrijebiti plinska kromatografija ili nemaju funkcionalnih grupa koje je moguće odrediti tekućinskom kromatografijom. SFC se može primijeniti za određivanje različitih materijala uključujući prirodne spojeve, droge, hranu, pesticide, herbicide, goriva i eksplozive.

### **3.6.2. Primjena SFC u farmaceutskoj industriji**

Cilj svake analize u farmaceutskoj industriji je odrediti kvalitetu djelatne farmaceutske tvari ili ljekovitog oblika primjenom različitih analitičkih tehnika. Smatra se da je tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane s različitim detektorima (najčešće DAD ili MS) zlatni standard industrije. Usprkos velikom broju dostupnih nepokretnih faza i velikom broju parametara metode koji se mogu optimizirati pri razvoju metoda, nije moguće uvijek razdvojiti sve komponente prisutne u uzorku, pogotovo ukoliko su različite komponente bazične, kisele ili neutralne prirode. Veliki problem predstavlja i minimalni zahtjev za razlučivanje od 1,5 što može predstavljati potencijalni problem zbog velike koncentracije djelatne tvari u odnosu na

onečišćenja što rezultira širokim pikom glavne komponente. Zbog različite selektivnosti tehnike, kao i značajnog napretka u razvoju analitičke instrumentacije, u novije vrijeme za analize djelatnih tvari i ljekovitih oblika koristit se fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima. Ortogonalna selektivnost metode bitna je zbog onečišćenja koja zbog sličnosti djelatnoj tvari eluiraju zajedno s njom.

Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima pogodna je za analize nepolarnih spojeva poput lipida, vitamina i steroida. Dodatkom polarnih otapala poput metanol, etanola, izopropanola ugljičnom dioksidu pri superkritičnim uvjetima moguće je eluiranje polarnih analita, što omogućuje široki spektar analiza. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima može se koristiti kao kromatografija normalnih ili obrnutih faza ovisno o nepokretnoj fazi. Razvojem novih pokretnih faza, SFC se često koristi i za analizu polarnih spojeva<sup>29-31</sup> što je čest slučaj u analizama farmaceutika i njihovih metabolita<sup>32</sup>. Brojne prednosti koje donosi rad s fluidnom kromatografijom pri superkritičnim uvjetima u odnosu na klasične metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti ipak nisu dovoljne da se počne rutinski koristiti u većem obujmu u laboratorijima kontrole kvalitete. SFC se više koristi u fundamentalnim studijama i za separaciju kiralnih spojeva nego za kvantitativnu analizu. U prošlosti, uporaba SFC bila je ograničena lošijom osjetljivošću i reproducibilnošću u odnosu na HPLC te nije bilo moguće razviti robusnu metodu niti je validirati<sup>33</sup>.

Najveći nedostatak bio je loša osjetljivost UV detekcije u odnosu na LC-UV, zbog velikog šuma bazne linije. Visoki šum bazne linije bio je posljedica fluktuacije tlaka zbog promjene gustoće superkritičnog fluida. Međutim, zadnjih nekoliko godina novim dizajnom regulatora tlaka (engl. *back pressure*) omogućena je bolja kontrola tlaka. Osjetljivost metoda za analize onečišćenja je ključna, obzirom da granica kvantifikacije mora biti od 0,02 % – 0,05 % u odnosu na djelatnu tvar te da omjer šuma i signala mora biti veći od 10. Da bi se to ostvarilo i da bi bilo moguće validirati takve metode, potrebo je imati niski šum bazne linije. Razvojem kolona s dimenzijama čestica manjim od 2 µm potrebno je koristiti brzinu snimanja veću od 10 Hz, a povećanje brzine snimanja rezultira još većim šumom bazne linije. Detektori na SFC instrumentima i dalje imaju veći šum bazne linije u odnosu na HPLC, ali razvojem opreme šum je značajno smanjen. Uporaba visokih tlakova te niskih temperatura kolone rezultira nižim

šumom bazne linije. Razvojem SFC instrumenata, ova tehnika se može koristiti za kvantitativne analize onečišćenja u djelatnim tvarima, s granicama kvantifikacije od 0,05 % – 0,10 %. Prvu validaciju metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra high performance supercritical fluid chromatography*, UHPSFC) i usporedbu s postojećom UHPLC metodom načinili su Dibas i suradnici<sup>36</sup>. Oni su usporedili metode s kvantitativnog aspekta te načinili validaciju s realnim uzorcima. Usporedbu profila onečišćenja SFC i UHPLC metode prvi su načinili Wang i suradnici<sup>33</sup> 2011. godine koji su razvili i parcijalno validirali (podešavanjem koncentracije uzorka) ortogonalnu SFC metodu za analizu mometazon fluorata. Granica kvantifikacije razvijene SFC metode iznosi 0,05 %, a obje metode omogućile su razdvajanje svih onečišćenja. Selektivnost HPLC i SFC metode je bila ortogonalna, onečišćenja koja su eluirala prva HPLC metodom, SFC metodom eluirala su zadnja. Razvojem novije generacije instrumenta prvenstveno UPC<sup>2</sup> Waters instrumenata, pokazale su se dodatne prednosti SFC kao ortogonalne tehnike: jednoličnija raspodjela pikova kroz cijeli kromatogram, manji nagib bazne linije i jednostavniji razvoj metoda u odnosu na UHPLC metode<sup>34</sup>.

Slično kao i kod HPLC, SFC koristi razne metode detekcije, uključujući UV/Vis, masene spektrometrije, FID (za razliku od HPLC) i raspršivanje isparavajuće svjetlosti.

Mobilna faza se sastoji prvenstveno od superkritičnog CO<sub>2</sub>, te kako bi se učinkovito eluirali mnogi analiti, dodaju se suotapala za modificiranje polariteta pokretne faze. To su obično jednostavni alkoholi poput metanola, etanola ili izopropanola. Druga otapala kao acetonitril ili kloroform se mogu koristiti kao modifikatori.

Glavni nedostaci su tehničke prirode radi teškog postizanja i održavanja uvjeta visokog tlaka. Budući da su tekućine gotovo neuništive, pa su njihove gustoće konstantne bez obzira na tlak, superkritične tekućine su vrlo kompresibilne i njihova fizička svojstva se mijenjaju pod tlakom (kao što je pad tlaka preko stupca s punjenjem). Trenutačno, automatizirani regulatori povratnoga tlaka mogu održavati konstantni tlak u koloni, čak i ako brzina protoka varira, čime se ublažava taj problem.

Glavne prednosti:

- visoki koeficijent difuzije povećava kinetičku učinkovitost
- CO<sub>2</sub> je dobiven iz industrijskih postrojenja
- CO<sub>2</sub> je jeftin i lako dostupan
- zamjenjuje mobilne faze koje se koriste u normalo faznoj kromatografiji
- manja potrošnja energije
- nema opasnog otpada
- kratko vrijeme uspostavljanja ravnoteže kolona
- idealna za spojeve koji kasno eluiraju u reverzno faznoj kromatografiji
- idealna za spojeve koji se ne odvajaju u reverzno faznoj kromatografiji

### 3.7. VALIDACIJA METODE

Validacija metode je prosudba i dokaz valjanosti i prikladnosti analitičkog postupka za odgovarajuću namjenu, odnosno jamči postizanje točnih i vjerodostojnih rezultata analize tijekom dugoročnog korištenja metode. Iako se samom validacijom ne mogu predvidjeti svi problem koji se mogu javljati tijekom primjene metode, postupak razvoja i validacije metode najčešće upućuje na one najčešće.

Validacija metoda analize lijekova sastavni je dio dokumentacije za registraciju lijekovitih oblika ili farmakološki aktivnih tvari. Osnovni je element sustava osiguranja kvalitete i nužan preduvjet distribucije i terapijske primjene.

Postupci provođenja validacije analitičkih metoda propisani su ICH smjernicama<sup>35</sup>. Osnovni validacijski parametri koji se provode tijekom validacije analitičke metode su točnost, preciznost, selektivnost, limit detekcije, limit kvantifikacije, linearnost, radno područje i robusnost.

Prije provođenja validacije treba definirati problem i napraviti plan rada, izvršiti mjerenje i obradu podataka te izraditi valjanu dokumentaciju koja će se moći koristiti u kasnijem radu. Za postupak validacije metode je neophodno da je oprema koja se koristi unutar specifikacije, da pravilno radi i da je pravilno kalibrirana. Također je važno da je stručnjak koji provodi validaciju kompetentan za analitičku metodu koja se provodi te da je dovoljno educiran u tom području da može donijeti ispravan zaključak o validaciji metode.

- **Specifičnost**

Specifičnost je sposobnost metode da razlikuje analita od ostalih komponenti uzorka ili matriksa uzorka bez interferencija ostalih komponenti sličnog ponašanja, i indikativno je svojstvo za više supstancija. U slučaju razvijene SFC metode, selektivnost je dokazana detekcijom dvanaest separiranih pikova onečišćenja entakapona sa zadovoljavajućim razlučivanjem koje nije manje od 1.5.

- **Limit detekcije (DL)**

To je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i kvantificirati. Ovaj parametar primjenjuje se samo kod validacija metoda za određivanja onečišćenja bilo kvantitativnom metodom ili limit testom. Limit detekcije najčešće se dokazuje na razini 30% od limita kvantifikacije (QL).

- **Limit kvantifikacije (QL)**

To je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Limit kvantifikacije je parametar koji se određuje kod kvantitativnih analiza kod kojih je nivo koncentracije analita koji se određuje nizak (npr. metode određivanja onečišćenja i/ili razgradnih produkata). Limit kvantifikacije u većini metoda za analizu onečišćenja u djelatnoj tvari iznosi 0.02-0.05% od nominalne koncentracije uzorka. Također iz pravca linearnosti određuje se i točnost (accuracy), te s/n (signal to noise ratio).

- **Linearnost metode**

Linearnost metode je mogućnost metode da unutar danog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Za potvrdu linearnosti metode odabere se najmanje pet različitih koncentracijskih točaka koji se pripremaju iz tri različite otopine. Za svaku točku linearnosti odredi se srednja vrijednost, a iz dobivenih podataka izračuna se jednadžba pravca, koeficijent regresije, nagib i odsječak pravca.

Linearnost se vizualno dokazuje grafičkim prikazom koncentracije prema odazivu detektora, a evaluira se koeficijentom korelacije (za određivanje sadržaja  $R^2 > 0.997$ , onečišćenja  $R^2 > 0.990$ ). Važan parametar za evaluaciju, je postotak odsječka dan relativno prema radnoj koncentraciji koji za analize sadržaja aktivne komponente mora biti ispod 2 % i/ili omjer odziva detektora i koncentracije analita čije slaganje u točki mjerenja na specifikacijskom levelu mora biti unutar 10 % .

- **Radno područje**

Za definiranje radnog područja neke metode koriste se podaci dobiveni kod linearnosti, točnosti i preciznosti metode.

- **Robusnost metode**

Ovaj parametar označava otpornost analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Kod ispitivanja robusnosti mijenjaju se radni parametri unutar realnih granica te se prati kvantitativna promjena rezultata. Ako je utjecaj promjene parametra metode unutar specifikacije metode, kaže se da je parametar u području robusnosti metode. Parametre koji bi mogli utjecati na rezultate metode treba držati pod nadzorom i njih jasno označiti kod opisa metode.

Kod instrumentalnih metoda tipični parametri su variranje sastava mobilne faze (HPLC, SFC) te korištenje različitih kolona, rad kod različitih temperatura i brzine protoka (HPLC, SFC i GC) i sl.

Postupak provođenja validacije analitičke metode, obrada analitičkih rezultata i izrada validacijske dokumentacije zahtijeva značajan angažman analitičara. Međutim, korištenjem validiranih analitičkih metoda smanjuje se mogućnost analitičke pogreške, a dobiveni rezultati mogu se smatrati točnima i pouzdanima.

- **Preciznost**

Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Obično se provodi šest mjerenja Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Može biti iskazana kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (reproducibilnost).

- **Točnost**

Točnost (engl. accuracy) pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. U tu svrhu napravi se analiza uzoraka poznate koncentracije i usporede se izmjerene i stvarne vrijednosti.

Točnost je određena analizom otopina svih onečišćenja i entakapona poznatih koncentracija na tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode. Za svaku koncentraciju izvršena su tri mjerenja. Određen je analitički prinos (engl. *recovery*) kao omjer srednje vrijednosti izmjerene koncentracije i stvarne koncentracije izražen u postotku.

- **Stabilnost**

Stabilnost je prosudba dopuštenog vremena između skupljanja uzorka i analize. Ovaj parametar je izuzetno važan kako bi se osiguralo potrebno vrijeme od pripreme pa sve do injektiranja te način na koji se pripremljeni uzorak može čuvati ( temperatura, boja tikvice I sl.)

### **3.8. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA**

Za određivanje onečišćenja entakapona u Pliva Hrvatska d.o.o. razvijena je metoda korištenjem kromatografije ultravisoke djelotvornosti koja razdvaja deset onečišćenja u trajanju od 38 minuta. Budući da postoje zahtjevi za rutinskom kontrolom i svakodnevnom analizom, potrebno je razviti bržu metodu koja razdvaja entakapon od njegovih dvanaest onečišćenja koji su sintetizirani u Pliva Hrvatska d.o.o.

Prema USP monografiji, za analizu onečišćenja entakapona koristi se izokratna metoda upotrebom kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), a koja razdvaja samo dva specificirana onečišćenja.

Do sada u Plivinom laboratoriju nije razvijana metoda za analizu onečišćenja entakapona upotrebom kromatografije superkritičnih fluida.

### 3.9. EKSPERIMENTALNI PODACI

#### 3.9.1. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada, njihova kemijska čistoća kao i proizvođač prikazani su u Tablici 1.

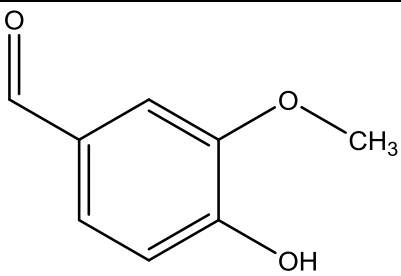
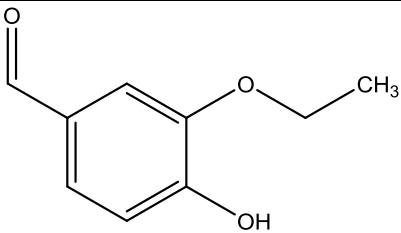
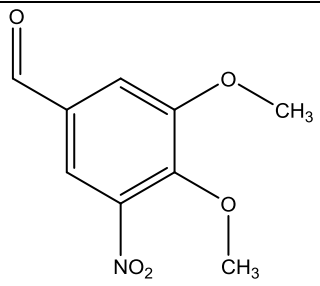
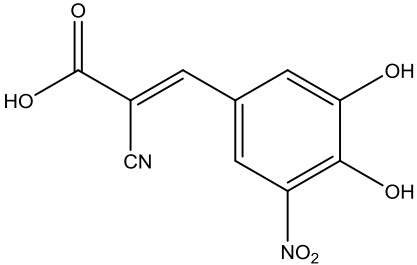
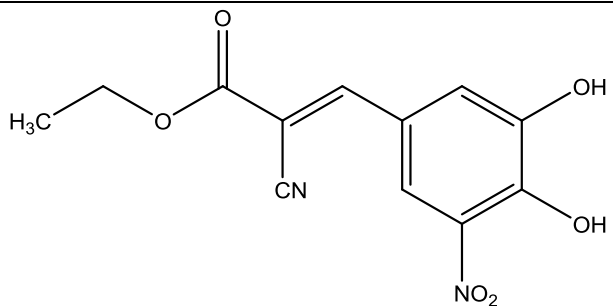
**Tablica 1. Kemikalije**

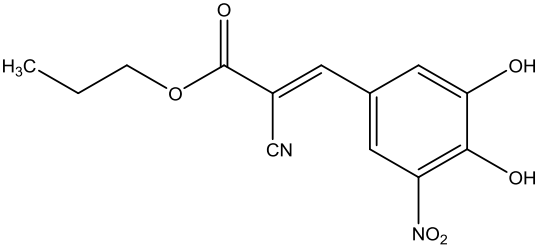
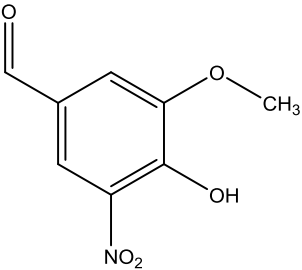
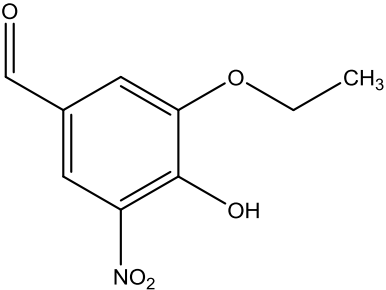
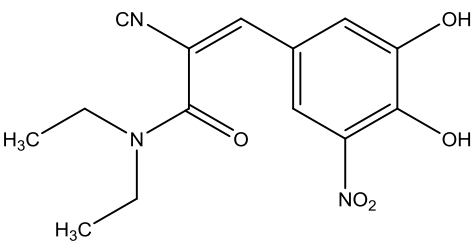
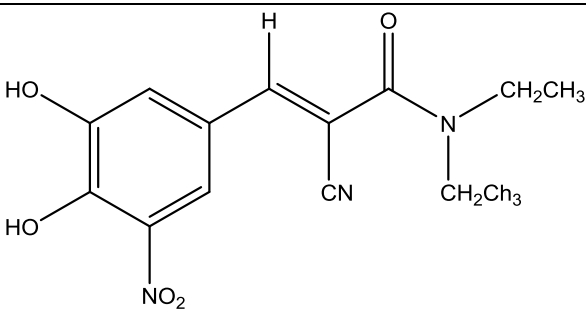
| Naziv              | Molekulska formula                           | Proizvođač                         | Čistoća |
|--------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|---------|
| <b>Etanol</b>      | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$            | J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD | p.a     |
| <b>2-Propanol</b>  | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ | J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD | p.a     |
| <b>Acetonitril</b> | $\text{CH}_3\text{CN}$                       | J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD | p.a     |
| <b>Metanol</b>     | $\text{CH}_3\text{OH}$                       | J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD | p.a     |

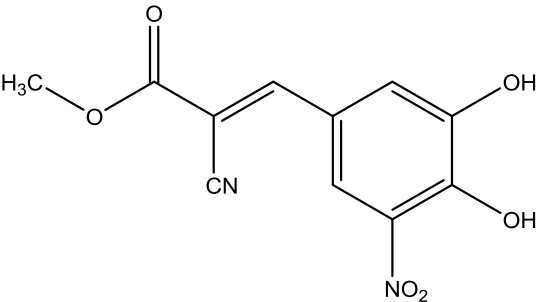
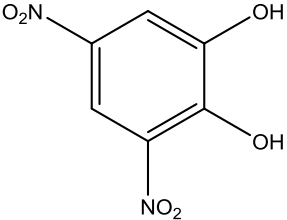
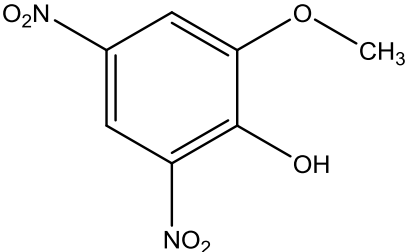
#### 3.9.2. Standardi

Djelatna tvar entakapon i njegova onečišćenja sintetizirani su u Pliva, Zagreb, Hrvatska (Tablica 2.). Svi standardi procesnih onečišćenja i samog entakapona su visoke čistoće (99.0%), a njihove su strukture potvrđene MS, MS/MS i NMR analizom.

**Tablica 2. Entakapon i njegova onečišćenja**

| Br. | Oznaka uzorka | Kratica          | Struktura                                                                            | Egzaktna masa                                    |
|-----|---------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1   | Vanilin       | n/a              |    | 152,04<br>Slika 14.<br>MS/MS-<br>Etilvanilin     |
| 2   | Etilvanilin   | n/a              |    | 166,06<br>Slika 14.<br>MS/MS-<br>Etilvanilin     |
| 3   | VV/D16/18     | IMP 1            |   | 211.02<br>Slika 15.<br>MS/MS-<br>IMP 1           |
| 4   | VV/D16/24     | Ph.Eur.<br>Imp F |  | 250.2<br>Slika 16.<br>MS/MS-<br>Eu.Ph.<br>Imp F  |
| 5   | VV/D16/28     | Ph.Eur.<br>Imp B |  | 278.05<br>Slika 17.<br>MS/MS-<br>Eu.Ph.<br>Imp B |

|    |                       |                  |                                                                                      |                                                   |
|----|-----------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 6  | VV/D16/29             | Ph.Eur.<br>Imp I |    | 292.07<br>Slika 18.<br>MS/MS-<br>Eu.Ph.<br>Imp I  |
| 7  | VV/D16/34             | Ph.Eur.<br>Imp G |    | 197.03<br>Slika 19.<br>MS/MS -<br>Eu.Ph.<br>Imp G |
| 8  | VV/D16/35             | IMP 2            |   | 211.05<br>Slika 20.<br>MS/MS -<br>IMP 2           |
| 9  | Entakapon<br>Z izomer | Ph.Eur.<br>Imp A |  | 305.10<br>Slika 21.<br>MS/MS -<br>Eu.Ph.<br>Imp A |
| 10 | Entakapon             | ENT              |  | 276.6<br>Slika 22.<br>MS/MS -<br>Entakapon        |

|    |           |       |                                                                                     |                                         |
|----|-----------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 11 | VV/D16/35 | IMP 3 |   | 264.4<br>Slika 23.<br>MS/MS -<br>IMP 3  |
| 12 | VV/D16/45 | IMP 4 |   | 200.01<br>Slika 24.<br>MS/MS -<br>IMP 4 |
| 13 | VV/D16/48 | IMP 5 |  | 214.02<br>Slika 25.<br>MS/MS -<br>IMP 5 |

### 3.9.3. Nepokretne faze korištene u razvoju metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima

Za razvoj metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima korištene su tri kromatografske kolone (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD), od toga dvije kolone su istih dimenzija kao i kolone za UHPLC metodu (100 mm x 2,1 mm i promjera čestica punila 1,7 µm) a treća kolona je nešto većeg promjera (3,0 mm). Dimenzije kolona i vrsta punila ispitanih kromatografskih kolona prikazani su u Tablici 3.

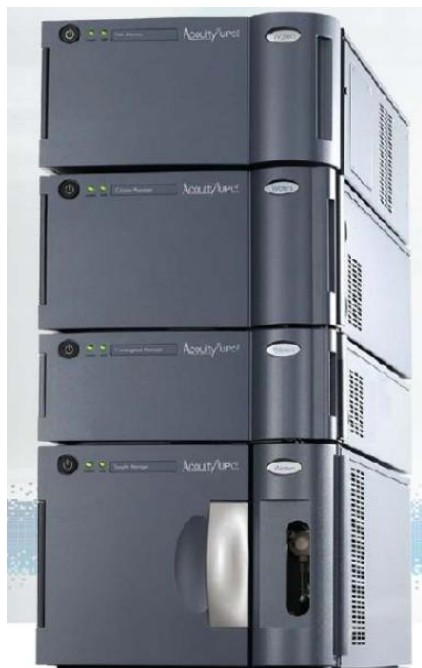
**Tablica 3. Kolone korištene u razvoju metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima**

| Naziv                              | Nepokretna faza     | Dimenzije            |
|------------------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH</b> | C18                 | 100 x 3,0 mm, 1,7 µm |
| <b>Waters Torus 2-PIC</b>          | 2-etilpiridin       | 100 x 2,1 mm, 1,7 µm |
| <b>Waters Torus DIOL</b>           | diol visoke gustoće | 100 x 2,1 mm, 1,7 µm |

#### **3.9.4. Instrumenti**

- **Kromatograf za fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (UPC<sup>2</sup>-PDA)**

Razvoj metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima i određivanje onečišćenja entakapona provedeno je na sustavu fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima poveznim s detektorom s nizom dioda (DAD). Korišten je kromatograf UPC<sup>2</sup> (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD) koji se sastoji od vakuuskog degazera, automatskog uzorkivača, regulatora tlaka, binarne crpke i detektora s nizom dioda (Slika 7.). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je pomoću računalnog programa Waters Empower 2.



**Slika 7. Kromatograf za fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (UPC<sup>2</sup>)  
povezan s detektorom s nizom dioda (PDA)**

- **Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom**

Određivanje strukture razgradnih onečišćenja entakapona provedeno je na sustavu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti koji je vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom. Korišten je UPLC kromatograf Agilent 1290 (Santa Clara, Kalifornija, SAD) koji se sastoji od vakuumskog degazera, automatskog uzorkivača, binarne crpke i spektrometra masa s trostrukim kvadripolom Agilent 6490 (Santa Clara, Kalifornija, SAD) (Slika 8.). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za Triple Quad B.01.04 (B84).



**Slika 8.** Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti (Agilent 1290) vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (Agilent 6490)

### **3.9.5. Metode rada**

#### **3.9.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrijom masa**

Za karakterizacije razgradnih onečišćenja entakapona korišten je tekućinski kromatograf (Agilent UHPLC 1290 Infinity) s binarnom pumpom i C18 kromatografskom kolonom (Waters Acquity BEH C18, 100 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), uz detektor s nizom dioda i spektrometre mase (spektrometar masa s trostrukim kvadripolom i spektrometar masa visoke razlučivosti). Za pokretnu fazu B korišten je acetonitril. Pokretna faza A je lako hlapljivi pufer koji je pogodan za ionizaciju u spektrometru masa, u ovom radu korištena je 0.1% mravlja kiselina.

Ukupno vrijeme analize iznosilo je 9 minuta. Protok je postavljen na 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Analizirane su otopine entakapona i onečišćenja.

### **3.9.5.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornost vezana s trostrukim kvadripolom**

Za karakterizaciju razgradnih onečišćenja entakapona korišten je tekućinski kromatograf (Agilent UHPLC 1290 Infinity) s binarnom pumpom i C18 kromatografskom kolonom (Waters Acquity BEH C18, 100 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m), uz detektor s nizom dioda i spektrometar masa s trostrukim kvadripolom (Agilent Technologies 6590 QQQ- MS). Analize su napravljene uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom modu, a kao plin nosilac korišten je dušik.

Provedene su MS/MS analize entakapona i njegovih onečišćenjima. Mijenjana je energije sudara s ciljem dobivanja što više različitih fragmenta iz čega je bilo moguće zaključiti o strukturi molekule. Ispitivane su sljedeće energije sudara: 0 V, 10 V, 15 V, 20 V, 30 V i 40 V.

Podaci su obrađeni koristeći Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za Triple Quad B.01.04 (B84) upravljačko sučelje.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Razvoj metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima (UPC<sup>2</sup>-PDA) za kvantitativno određivanje entakapona i njegovih onečišćenja

Cilj je bio razviti ortogonalnu metodu za određivanje entakapona i njegovih onečišćenja kao dodatnu kontrolu pri razdvajanju onečišćenja. Razvijena je nova metoda uporabom kromatografije pri superkritičnim uvjetima različita od UHPLC metode. Razvoj metode je uključivao testiranje tri različite nepokretne faze, ispitani su modifikatori pokretnih faza, različiti gradijenti programi, temperatura kolona i tlak na detektoru (engl. *back pressure*). Za razvoj kromatografske metode korištene su standardne otopine entakapona i poznatih onečišćenja, te otopine nakon prisilne razgradnje entakapona. Prilikom razvoja metode postavljeni su sljedeći kriteriji: kromatografsko razlučivanje veće od 1,5, granica kvantifikacije veća od 0,03 % i simetrija kromatografskog pika između 0,8 – 1,2.

- **Priprema otopina**

Temeljna standardna otopina entakapona koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup> pripremljena je vaganjem 25 mg standarda entakapona i otapanjem u 25 mL otapala. Za potpuno otapanje entakapona bilo je potrebno miješati na vorteks miješalici i koristiti ultrazvučnu kupelj.

Temeljne standardne otopine pojedinačnih onečišćenja masene koncentracije 0,01 mg mL<sup>-1</sup> pripremljene su vaganjem po 2 mg svakog od 12 onečišćenja na analitičkoj vagi (UMX2, MettlerToledo) i otapanjem u 10 mL otapala. Ponovno je za otapanje korištena vorteks miješalica i ultrazvučna kupelj.

Otopina smjese entakapona i onečišćenja pripremljena je otapanjem 25 mg entakapona, dodatkom po 1 mL alikvota prethodno pripremljenih temeljenih standardnih otopina onečišćenja te nadopunjavanjem otapalom do oznake. Tako pripremljena otopina sadržavala je 0,8 % svakog onečišćenja u odnosu na entakapone.

#### 4.1.1. Izbor nepokretne faze

Testirano je nekoliko kromatografskih kolona s različitim punjenjem: C-18 (ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH), 2-etilpiridin (Waters Torus 2-PIC) i diol visoke gustoće (Waters Torus DIOL). Kao modifikator u inicijalnom testiranju kolona korišten je metanol s inicijalnim gradijentom (Tablica 4.), temperaturom kolone 40 °C i protokom pokretne faze 2,0 mL min<sup>-1</sup>. Injektirana je otopina entakapona s nacijepljenih 12 poznatih onečišćenja.

**Tablica 4. Inicijalni gradijent za testiranje različitih kolona**

|                  | Vrijeme (min) | % eluens A<br>(CO <sub>2</sub> ) | % eluens B<br>(metanol) |
|------------------|---------------|----------------------------------|-------------------------|
| <b>Gradijent</b> | 0.00          | 90                               | 10                      |
|                  | 18.00         | 60                               | 40                      |
|                  | 18.01         | 90                               | 10                      |

Testiranjem kolone s 2-etilpiridinom kao nepokrentom fazom, uočeno je koeluiranje IMP 2 i IMP 3, kao i neodgovarajuća simetrija glavnog pika (simetrija glavnog pika >2,1).

Kolona s diolom visoke gustoće kao nepokretnom fazom nije pokazivala mogućnost zadržavanja entakapona na koloni što je rezultiralo njegovim eluiranjem u mrtvom volumenu zajedno s onečišćenjima IMP 4 i IMP 5.

Kolona s C18 punjenjem pokazala je kromatografsko razlučivanje >2, kao i simetriju entakapona 0,95.

Usporedba razlučivanja, simetrije pika i vremena zadržavanja testiranih kolona nalazi u Tablici 5.

**Tablica 5. Usporedba nepokretnih faza**

| Nepokretna faza     | Rs    | T     | t <sub>R</sub> (min) |
|---------------------|-------|-------|----------------------|
| 2-etilpiridin       | <0.5  | 2,1   | 2,150                |
| diol visoke gustoće | <0.53 | 0,982 | 0,35                 |
| C18                 | >2    | 0,991 | 1,852                |

Na temelju dobivenih rezultata sva daljnja istraživanja provedena su s C18 kromatografskom kolonom ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH (Waters) dimenzija 100 x 2,1 mm i veličinom zrna punila 1,7 µm.

#### **4.1.2. Utjecaj modifikatora**

Ispitan je utjecaj različitih modifikatora pokretne faze: metanola, etanola, izo-propanola i acetonitrila (nepokretna faza B kod UHPLC metode). Svi ispitani modifikatori pokazali su kromatografsko razlučivanje veće od 2. Međutim, uporaba manje polarnih otapala pokazala je duže zadržavanje onečišćenja na koloni što je rezultiralo vremenima zadržavanja dužim od 30 min, kao i nižim brojem teoretskih tavana, dok je uporabom metanola kao modifikatora postignuto zadovoljavajuće vrijeme zadržavanja.

#### **4.1.3. Utjecaj temperature kolone**

Utjecaj temperature kolone na kromatografsko razlučivanje entakapona i njegovih onečišćenja ispitan je pri temperaturama kolone 20 °C, 37,5 °C i 45 °C. Uočeno je da je pri višoj temperaturi (45 °C) zadržavanje svih komponentni duže. Temperatura kolone od 20 °C, pokazala je najkraće zadržavanje svih komponentni, ali je uočen visoki tlak. Stoga je, kao optimalna temperatura kolone izabrana temperatura od 37,5 °C jer je tlak kolone bio u granicama

preporučenim od strane proizvođača kolona, a kromatografsko razlučivanje i simetrija pika bili su zadovoljavajući.

#### **4.1.4. Utjecaj protoka**

Ispitani su protoci pokretne faze od  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$  i  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ . Pri višim protocima uočena su kraća vremena zadržavanja na koloni kao i poboljšan izgled pika. Optimalan izgled pika i razdvajanje dobiveno je s protocima od  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$  i  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ , ali pri protoku od  $5,0 \text{ mL min}^{-1}$  tlak na koloni bio je iznad dozvoljenih granica propisanih od strane proizvođača kolone te je kao optimalni izabran protok od  $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### **4.1.5. Utjecaj tlaka na detektoru**

Ispitani su tlakovi na detektoru od 1500 psi, 1800 psi i 2000 psi. Uočeno je da povećanjem tlaka na detektoru dolazi do skraćivanja vremena zadržavanja analita na koloni kao i poboljšanja izgleda pikova. Stoga je izabran tlak na detektoru od 2000 psi.

Na temelju dobivenih rezultata, odabrani su eksperimentalni uvjeti za kromatografsko određivanje entakapona i njegovih onečišćenja primjenom metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima.

Konačni optimalni kromatografski uvjeti za kromatografsko određivanje entakapona i njegovih onečišćenja odabrani su ispitivanjem različitih gradijenata mobilnih faza (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje onečišćenja entakapona metodom UPC<sup>2</sup>-PDA

|                              |                                                                          |            |            |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| <b>Kolona i pakiranje</b>    | <b>ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH, C18, 100x 3.0, 1.7 <math>\mu</math>m</b> |            |            |
| <b>Eluens A</b>              | Ukapljeni ugljični dioksid                                               |            |            |
| <b>Eluens B</b>              | Metanol                                                                  |            |            |
| <b>Gradijent</b>             | Vrijeme / min                                                            | % eluens A | % eluens B |
|                              | 0,00                                                                     | 90         | 10         |
|                              | 3.00                                                                     | 90         | 10         |
|                              | 8.00                                                                     | 80         | 20         |
|                              | 10.00                                                                    | 80         | 20         |
|                              | 18.00                                                                    | 60         | 40         |
|                              | 18.01                                                                    | 90         | 10         |
| <b>Vrijeme stabilizacije</b> | 1 min                                                                    |            |            |
| <b>Volumen injektiranja</b>  | 1 $\mu$ L                                                                |            |            |
| <b>Protok</b>                | 3,0 mL min <sup>-1</sup>                                                 |            |            |
| <b>Detektor</b>              | DAD, 210 nm                                                              |            |            |
| <b>Temperatura kolone</b>    | 37,5 °C                                                                  |            |            |
| <b>Tlak na detektoru</b>     | 2000 psi                                                                 |            |            |

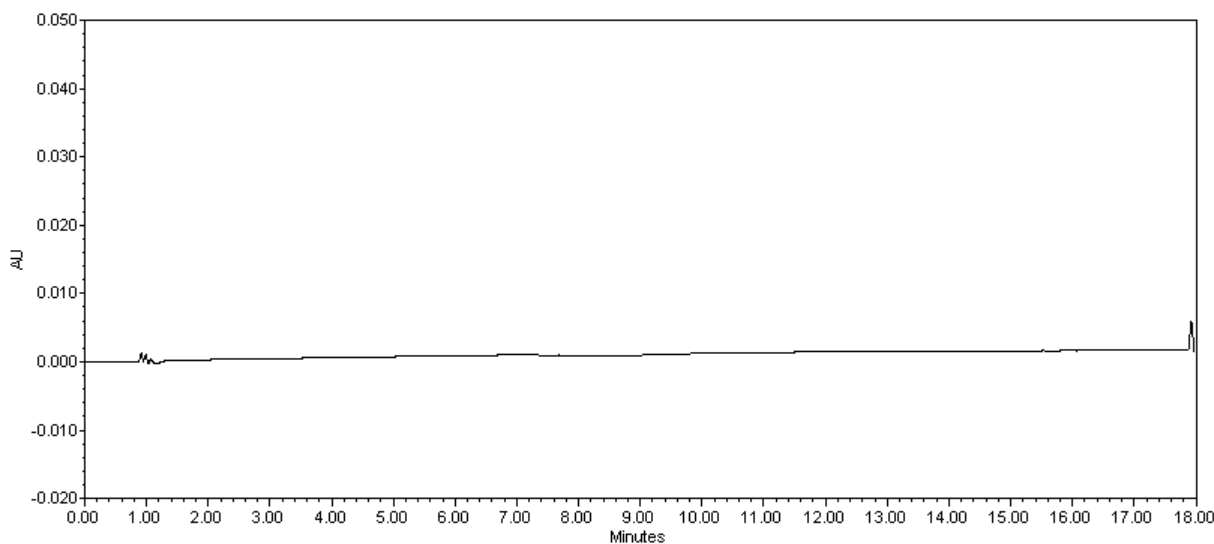
## 4.2. VALIDACIJA METODE

Validacija metode UPC<sup>2</sup>-PDA provedena je ispitivanjem njenih izvedbenih značajki: specifičnosti, linearnosti, granica dokazivanja i kvantifikacije, iskorištenja i preciznosti.

### 4.2.1. Selektivnost

Selektivnost metode ispitana je analizom otopine koja sadrži entakapon ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i sva onečišćenja (koncentracija pojedinog onečišćenja  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,1 % u odnosu na entakapone).

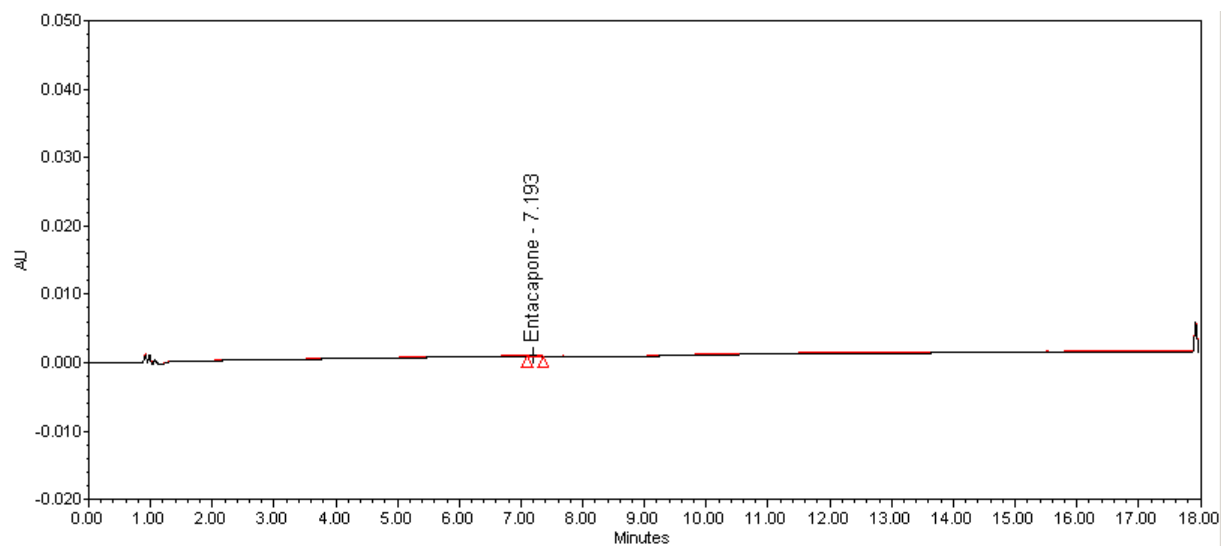
Kromatogram otopine diluenta prikazan je na Slici 9.



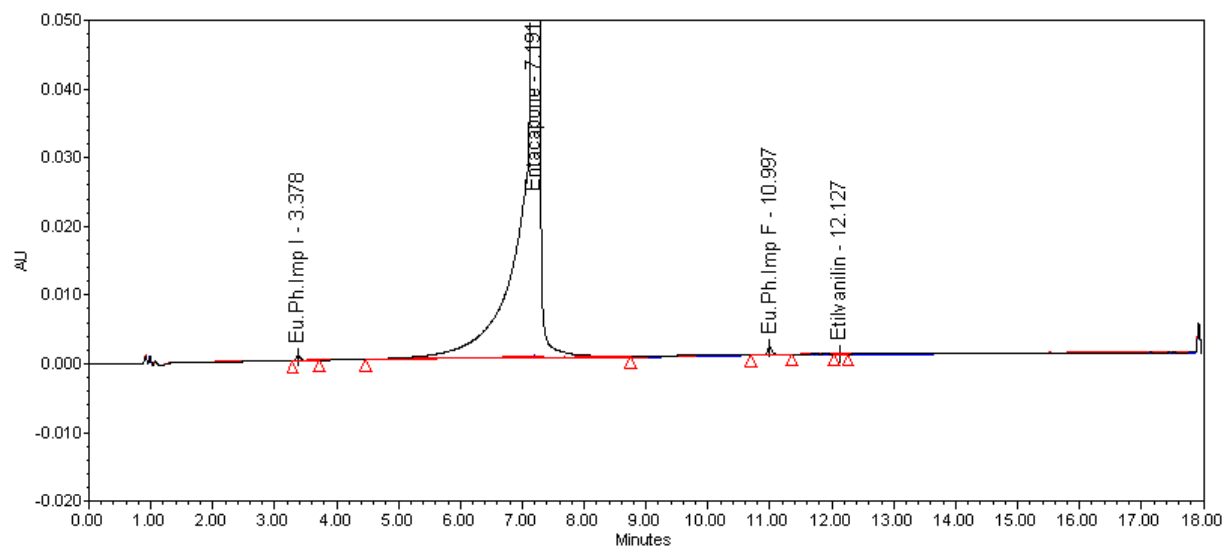
**Slika 9.** Kromatogram diluenta

Na kromatogramu diluenta nema kromatografskih pikova koji mogu interferirati s pikovima onečišćenja entakapona.

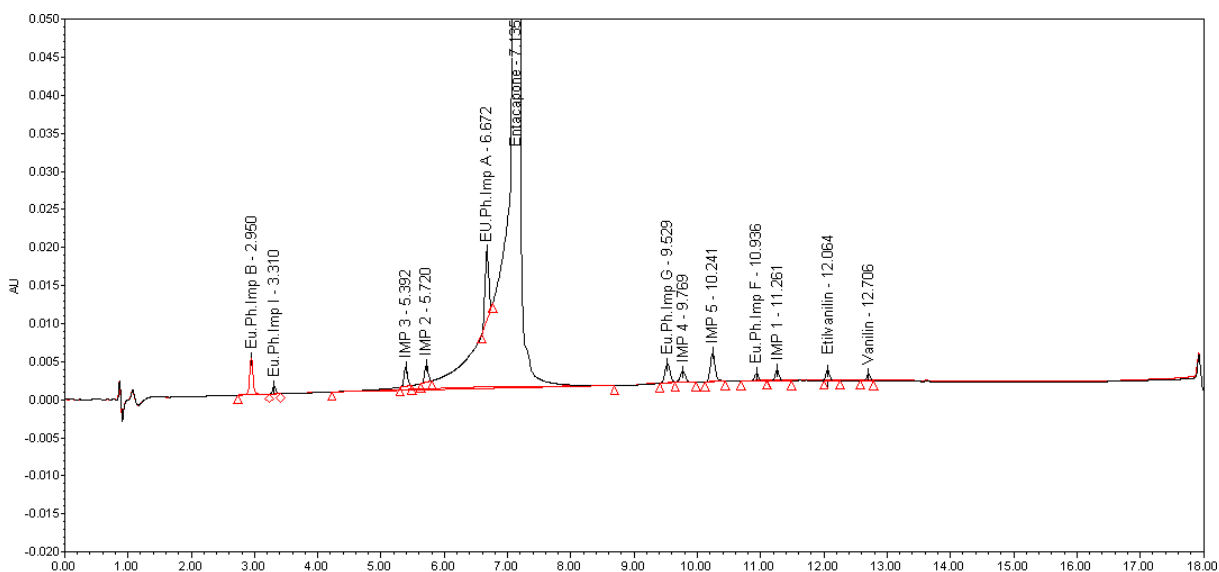
Kromatogram otopine QL (limit kvantifikacije) prikazan je na Slici 10., kromatogram otopine uzorka entakapona prikazan je na Slici 11., a kromatogram otopine entakapona i njegovih onečišćenja za ispitivanje razlučivanja prikazan je na Slici 12.



**Slika 10.** Kromatogram QL otopine



**Slika 11.** Kromatogram uzorka entakapona



**Slika 12.** Kromatogram otopine entakapona i njegovih onečišćenja

Razlučivanja i simetrije kromatografskih pikova entakapona i njegovih onečišćenja u ispitivanju selektivnosti metode i prikladnosti sustava prikazana su u Tablici 7.

**Tablica 7. Ispitivanje selektivnosti metode**

| Supstancija    | Razlučivanje | Simetrija |
|----------------|--------------|-----------|
| Ph. Eur. Imp B | /            | 1.0       |
| Ph. Eur. Imp I | 3.0          | 1.2       |
| IMP 3          | /            | /         |
| IMP 2          | /            | /         |
| Ph. Eur. Imp A | /            | /         |
| Entakapon      | /            | 1.0       |
| Ph. Eur. Imp G | 16.5         | 1.0       |
| IMP 4          | 1.5          | 1.1       |
| IMP 5          | 3.1          | 1.1       |
| Ph. Eur. Imp F | 5.1          | 0.9       |
| IMP 1          | 2.6          | 1.0       |
| Etilvanilin    | 6.9          | 1.1       |
| Vanilin        | 5.6          | 0.9       |

#### 4.2.2. Limit detekcije (DL)

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) je najmanja količina analita koja se može dokazati (ali ne i kvantitativno odrediti) u utvrđenim uvjetima analitičkog postupka. Granica dokazivanja definirana je pri koncentracije 0.01% od nominalne koncentracije uzorka. Otopina je injektirana tri puta.

Odnos visine kromatografskih pikova i šuma bazne linije (engl. *signal to noise*, *s/n*) u otopini za ispitivanje limita detekcije prikazan je u Tablici 8.

**Tablica 8. Ispitivanje limita detekcije (s/n)**

| Supstancija    | Inj. No 1 | Inj. No 2 | Inj. No 3 | Kriterij prihvatljivosti | Zadovoljava/ nezadovoljava |
|----------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|----------------------------|
| Ph. Eur. Imp B | 12        | 13        | 13        | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp I | 5         | 5         | 4         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| IMP 3          | 6         | 7         | 5         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| IMP 2          | 6         | 7         | 4         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp A | 12        | 9         | 10        | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| Entakapon      | 10        | 14        | 11        | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp G | 10        | 8         | 9         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| IMP 4          | 4         | 5         | 4         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| IMP 5          | 12        | 8         | 11        | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp F | 3         | 3         | 3         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| IMP 1          | 5         | 6         | 5         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| Etilvanilin    | 9         | 9         | 5         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |
| Vanilin        | 5         | 4         | 3         | $\geq 3$                 | Zadovoljava                |

#### 4.2.3. Limit kvantifikacije (QL)

Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prihvatljivom točnošću i pouzdanošću. Limit kvantifikacije u metodi za analizu onečišćenja entakapaona je 0.03% od nominalne koncentracije uzorka (1 mg/mL). Uzorak je injektiran 6 puta, a iz pravca linearnosti je izračunana točnost (accuracy), te preciznost između injektiranja.

Odnos visine kromatografskih pikova i šuma bazne linije (engl. *signal to noise*, *s/n*) u otopini za ispitivanje limita kvantifikacije prikazan je u Tablici 9.

**Tablica 9. Ispitivanje limita kvantifikacije (s/n)**

| Supstancija    | Inj. No 1 | Inj. No 2 | Inj. No 3 | Inj. No 4 | Inj. No 5 | Inj. No 6 | Kriterij prihvatljivosti | Zadovoljava/ nezadovoljava |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|----------------------------|
| Ph. Eur. Imp B | 30        | 41        | 25        | 28        | 21        | 44        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp I | 13        | 14        | 15        | 19        | 21        | 12        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| IMP 3          | 12        | 12        | 10        | 16        | 20        | 11        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| IMP 2          | 15        | 20        | 30        | 17        | 15        | 16        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp A | 25        | 26        | 30        | 41        | 19        | 35        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| Entakapon      | 40        | 29        | 31        | 35        | 41        | 26        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp G | 28        | 35        | 19        | 27        | 25        | 30        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| IMP 4          | 11        | 11        | 11        | 19        | 12        | 14        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| IMP 5          | 30        | 45        | 41        | 35        | 17        | 18        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp F | 10        | 10        | 10        | 11        | 13        | 11        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| IMP 1          | 14        | 16        | 14        | 14        | 1         | 18        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| Etilvanilin    | 20        | 21        | 30        | 14        | 23        | 20        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |
| Vanilin        | 10        | 10        | 11        | 11        | 11        | 11        | $\geq 10$                | Zadovoljava                |

Ispitivanje točnosti na kvantifikacijskom limitu prikazano je u Tablici 10.

**Tablica 10. Ispitivanje točnosti na limitu kvantifikacije**

| Supstancija    | Točnost na QL level/ [%] | Kriterij prihvatljivosti | RSD[%] | Kriterij prihvatljivosti | Zadovoljava/ nezadovoljava |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|----------------------------|
| Ph. Eur. Imp B | 73.2                     | 70.0-130.0%              | 0.1    | 15%                      | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp I | 95.1                     |                          | 2.1    |                          | Zadovoljava                |
| IMP 3          | 102.4                    |                          | 10.5   |                          | Zadovoljava                |
| IMP 2          | 110.2                    |                          | 14.8   |                          | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp A | 84.1                     |                          | 2.1    |                          | Zadovoljava                |
| Entakapon      | 95.7                     |                          | 6.1    |                          | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp G | 100.1                    |                          | 0.2    |                          | Zadovoljava                |
| IMP 4          | 105.4                    |                          | 2.9    |                          | Zadovoljava                |
| IMP 5          | 99.7                     |                          | 7.1    |                          | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp F | 112.4                    |                          | 13.0   |                          | Zadovoljava                |
| IMP 1          | 78.1                     |                          | 12.0   |                          | Zadovoljava                |
| Etilvanilin    | 80.0                     |                          | 8.7    |                          | Zadovoljava                |
| Vanilin        | 71.1                     |                          | 6.1    |                          | Zadovoljava                |

#### 4.2.4. Linearnost metode

Linearnost je svojstvo analitičkog postupka kojim se dobivaju rezultati koji su izravno proporcionalni sadržaju (koncentraciji) analita unutar radnog područja. Linearnost odziva instrumenta (površina kromatografskog pika) u ovisnosti o koncentraciji analita ispitana je u koncentracijskom području od 0.03-2.0% od nominalne koncentracije uzorka za entakapona i onečišćenja. Prilikom validacije metode linearnost je ispitana injektiranjem 6 otopina standarda entakapona i njegovih onečišćenja.

Podaci dobiveni u ispitivanju linearnosti entakapona i onečišćenja prikazani su u Tablici 11.

**Tablica 11. Ispitivanje linearnosti**

| Supstancija    | R <sup>2</sup> | Kriterij prihvatljivosti | Odsječak pri 0.15% | Kriterij prihvatljivosti | Zadovoljava/ nezadovoljava |
|----------------|----------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------|
| Ph. Eur. Imp B | 0.999          | R <sup>2</sup> > 0.997   | 2.5                | > 10%                    | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp I | 1.000          |                          | 9.7                |                          | Zadovoljava                |
| IMP 3          | 0.997          |                          | 8.5                |                          | Zadovoljava                |
| IMP 2          | 0.992          |                          | 7.4                |                          | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp A | 0.999          |                          | 0.2                |                          | Zadovoljava                |
| Entakapon      | 0.999          |                          | 5.7                |                          | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp G | 0.999          |                          | 6.9                |                          | Zadovoljava                |
| IMP 4          | 0.996          |                          | 5.0                |                          | Zadovoljava                |
| IMP 5          | 1.000          |                          | 6.7                |                          | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp F | 1.000          |                          | 0.5                |                          | Zadovoljava                |
| IMP 1          | 0.999          |                          | 9.9                |                          | Zadovoljava                |
| Etilvanilin    | 0.995          |                          | 3.1                |                          | Zadovoljava                |
| Vanilin        | 1.000          |                          | 0.6                |                          | Zadovoljava                |

**4.2.5. Robusnost metode**

Robusnost metode je sposobnost metode da ostane prikladna za namijenjenu upotrebu nakon uvođenja sitnih, namjernih varijacija. Eksperimentalni uvjeti metode su promijenjeni, te se provjeravao utjecaj uvedenih varijacija na kromatografsko razlučivanje.

Robusnost metode je dokazana zadovoljavajućim razlučivanjem između kromatografskih pikova pri svim uvjetima, uključujući promjenu kolone, promjenu temperature kolone te promjenu tlaka.

Promjene razlučivanja između kromatografskih pikova onečišćenja pri ispitivanju robusnosti prikazane su u Tablici 12.

**Tablica 12. Utjecaj promijenjenih parametara metode na razlučivanja između onečišćenja u Ispitivanju robusnosti**

|                | Nominalni uvjeti | Temp. kolone 20 °C | Temp. kolone 40 °C | Promjena kolone | Tlak na detektoru 1900 psi | Tlak na detektoru 2100 psi |
|----------------|------------------|--------------------|--------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| Supstancija    | Razlučivanje     |                    |                    |                 |                            |                            |
| Ph. Eur. Imp B | /                | /                  | /                  | /               | /                          | /                          |
| Ph. Eur. Imp I | 3                | 2.8                | 3.5                | 3.1             | 2.9                        | 3.2                        |
| IMP 3          | /                | /                  | /                  | /               | /                          | /                          |
| IMP 2          | /                | /                  | /                  | /               | /                          | /                          |
| Ph. Eur. Imp A | /                | /                  | /                  | /               | /                          | /                          |
| Entakapon      | /                | /                  | /                  | /               | /                          | /                          |
| Ph. Eur. Imp G | 16.5             | 16                 | 16.7               | 16              | 16.0                       | 16.6                       |
| IMP 4          | 1.5              | 1.5                | 1.6                | 1.6             | 1.5                        | 1.6                        |
| IMP 5          | 3.1              | 3                  | 3.5                | 3.2             | 2.8                        | 3                          |
| Ph. Eur. Imp F | 5.1              | 4.9                | 5.4                | 4.8             | 4.8                        | 5.0                        |
| IMP 1          | 2.6              | 2.5                | 2.8                | 2.2             | 2.4                        | 2.5                        |
| Etilvanilin    | 6.9              | 6.9                | 7                  | 6.8             | 6.5                        | 6.8                        |
| Vanilin        | 5.6              | 5.6                | 5.8                | 5.4             | 4.5                        | 5.7                        |

#### 4.2.6. Preciznost

Preciznost je raspršenost pojedinih mjerenja oko srednje vrijednosti dobivenih ponavljanim ispitivanjima. Preciznost se iskazuje kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost određivanja provjerena je injektiranjem 6 nezavisno pripremljenih otopina entakapona proizvedenim komercijalnim postupkom (ENT 1701001) i standarda entakapona (Tablica 13.).

**Tablica 13. Ispitivanje preciznosti**

| Uzorak             | Ph. Eur. Imp I |         | Ph. Eur. Imp F |         | Etilvanilin |         |
|--------------------|----------------|---------|----------------|---------|-------------|---------|
|                    | RRT            | Area[%] | RRT            | Area[%] | RRT         | Area[%] |
| ENT 1701001 1x     | 3.378          | 0.08    | 10.997         | 0.12    | 12.127      | 0.01    |
| ENT 1701001 2x     | 3.376          | 0.08    | 10.997         | 0.12    | 12.121      | 0.01    |
| ENT 1701001 3x     | 3.377          | 0.09    | 10.990         | 0.12    | 12.15       | 0.01    |
| ENT 1701001 4x     | 3.378          | 0.08    | 10.995         | 0.12    | 12.120      | 0.01    |
| ENT 1701001 5x     | 3.370          | 0.08    | 10.990         | 0.12    | 12.127      | 0.01    |
| ENT 1701001 6x     | 3.370          | 0.09    | 10.991         | 0.12    | 12.127      | 0.01    |
| STDEV              | 0.0038         | 0.0052  | 0.0034         | 0.0000  | 0.0109      | 0.0000  |
| Srednja vrijednost | 3.37           | 0.08    | 11.00          | 0.12    | 12.13       | 0.01    |
| RSD[%]             | 0.11           | 6.20    | 0.03           | 0.00    | 0.09        | 0.00    |

**4.2.7. Točnost**

Točnost (engl. *accuracy*) pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. U tu svrhu napravi se analiza uzoraka poznate koncentracije i usporede se izmjerene i stvarne vrijednosti.

Točnost je određena analizom otopina svih onečišćenja i entakapona poznatih koncentracija na tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode. Za svaku koncentraciju izvršena su tri mjerenja. Određen je analitički prinos (engl. *recovery*, R) kao omjer srednje vrijednosti izmjerene koncentracije i stvarne koncentracije izražen u postotku (Tablica 14.).

**Tablica 14. Ispitivanje točnosti**

| Onečišćenje    | Prinos level 0.03% | Kriterij prihvatljivosti | Prinos level 0.15% i 2.0% | Kriterij prihvatljivosti | Zadovoljava/ nezadovoljava |
|----------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Ph.Eur. Imp B  | 80.3%              | 70-130%                  | 95.7-99.4%                | 80-120%                  | Zadovoljava                |
| Ph.Eur. Imp I  | 85.6%              |                          | 90.1-100.4%               |                          | Zadovoljava                |
| IMP 3          | 79.7%              |                          | 93.5-110.5%               |                          | Zadovoljava                |
| IMP 2          | 90.5%              |                          | 100.4-100.8%              |                          | Zadovoljava                |
| Ph.Eur. Imp A  | 100.4%             |                          | 101.9-103.4%              |                          | Zadovoljava                |
| Ph.Eur. Imp G  | 102.7%             |                          | 100.3-105.5%              |                          | Zadovoljava                |
| IMP 4          | 91.6%              |                          | 98.4-105.1%               |                          | Zadovoljava                |
| IMP 5          | 75.4%              |                          | 89.2-95.5%                |                          | Zadovoljava                |
| Ph. Eur. Imp F | 110.4%             |                          | 101.9-105.1%              |                          | Zadovoljava                |
| IMP 1          | 79.1%              |                          | 90.5-93.1                 |                          | Zadovoljava                |
| Etilvanilin    | 75.9%              |                          | 93.7-95.6%                |                          | Zadovoljava                |
| Vanilin        | 79.5%              |                          | 80.1-85.4%                |                          | Zadovoljava                |

**4.2.8. Stabilnost**

Stabilnost otopina uzorka je ispitana ostavljanjem pripremljenih otopina koncentracije 1 mg/mL u začepljenim prozirnim volumetrijskim tikvicama 24 sata na sobnoj temperaturi. U otopini uzorka entakapona nije nastalo niti jedno novo onečišćenje te su sva ostala onečišćenja ispod granice kvantifikacije (Tablica 15.). Ovime je dokazana stabilnost otopina tijekom 24 sata.

**Tablica 15. Stabilnost uzorka entakapona tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi**

| # | Substancija    | Svježe pripremljena otopina | Otopina nakon stajanja 24h na sobnoj temperaturi | Razlika. % |
|---|----------------|-----------------------------|--------------------------------------------------|------------|
| 1 | Ph. Eur. Imp I | 0.08                        | 0.08                                             | 0.00%      |
| 2 | Ph. Eur. Imp F | 0.12                        | 0.12                                             | 0.00%      |
| 2 | Etilvanilin    | 0.01                        | 0.01                                             | 0.00%      |

Eksperimentalni dio ovog rada obuhvatio je razvoj i validaciju SFC metode s UV detekcijom za ispitivanje kontrole kakvoće aktivne farmaceutske supstancije. Postignuta je visoka osjetljivost i zadovoljavajuća separacija u trajanju jedne analize od samo 18 minuta. U usporedbi s postojećom razvijenom UPLC metodom, vrijeme analize skraćena je dvostruko, što uvelike olakšava korištenje SFC metode u rutinskim analizama laboratorija kontrole kvalitete. Selektivnost metode je poboljšana jer ona sada razdvaja dvanaest onečišćenja entakapona sintetiziranih u Pliva Hrvatska d.o.o. Struktura glavnih onečišćenja potvrđena je korištenjem LC-MS tehnike.

Razvijena SFC metoda u usporedbi s USP HPLC metodom te UHPLC metodom razvijenom u Pliva Hrvatska d.o.o., pokazuje bolji izbor upravo zbog brzine analize, osjetljivosti, cijene, ekološke prihvatljivosti, kao i razdvajanje većeg broja onečišćenja, odnosno bolje selektivnosti.

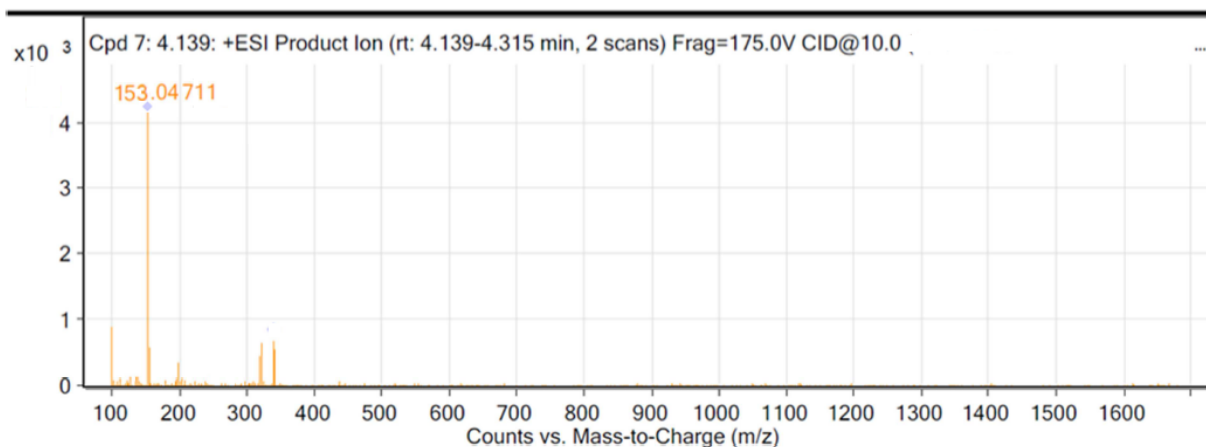
## 5. ZAKLJUČAK

Analitičke metode su ključan element životnog ciklusa farmaceutskog proizvoda, upravo zbog njihove uloge u razvoju i kontroli kakvoće proizvoda kroz čitav životni vijek djelatne tvar. Od samog početka razvoja nove molekule analitičke metode su neophodne svakom sintetičaru, a neadekvatno razvijene analitičke metode mogu dovesti do nepouzdanih rezultata koji mogu biti ključni za daljnji razvoj proizvoda.

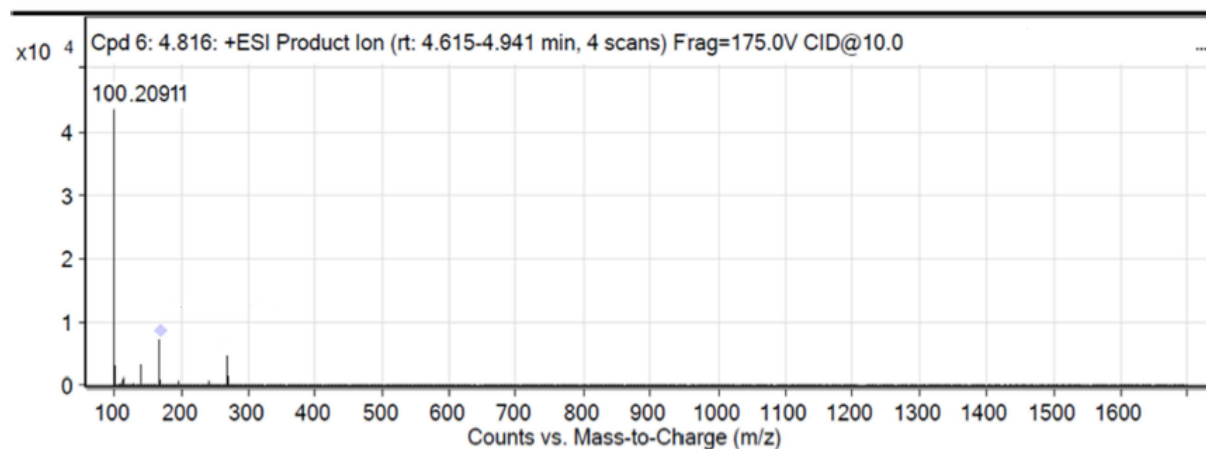
Validacija analitičke metode jamči postizanje vjerodostojnih rezultata analize tijekom dugoročnog korištenja metode pri čemu se oslanjaju na statističke potvrde valjanosti rezultata prilikom validacije parametara kao što su točnost, preciznost, selektivnost, linearnost, radno područje, granice detekcije i kvantifikacije. Ključni parametri validacije koji pružaju uvid funkcionalnosti metode prilikom rutinske upotrebe i procjenjuju utjecaj kritičnih analitičkih faktora su robusnost, odnosno izdržljivost metode.

Na primjeru razvoja i validacije metode za analizu dvanaest onečišćenja entakapona pokazane su mogućnosti superkritične fluidne kromatografije koja još uvijek nije prvi izbor kod razvoja metoda budući da UPLC još uvijek prednjači. Industrija je prepoznala potrebu razvoja analitičkih metoda koje pružaju potpuno razumijevanje svrhe postupaka kontrole i dizajniranja smislenog ispitivanja prikladnosti sustava. Potpuno razumijevanje namjene metode znači poznavanje molekule, njenih onečišćenja i puteva razgradnje, osjetljivosti na razne čimbenike, uvjeta skladištenja, poželjan rok valjanosti te u konačnici kritične attribute kvalitete. Razvoj analitičke metodologije treba predstavljati ugradnju kvalitete u proizvod od samog početka.

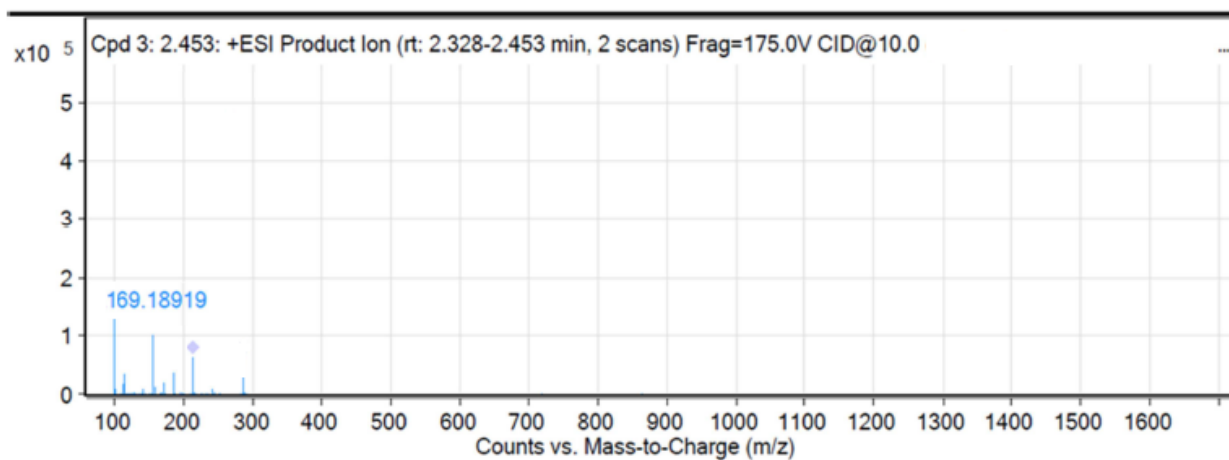
## 6. PRILOZI



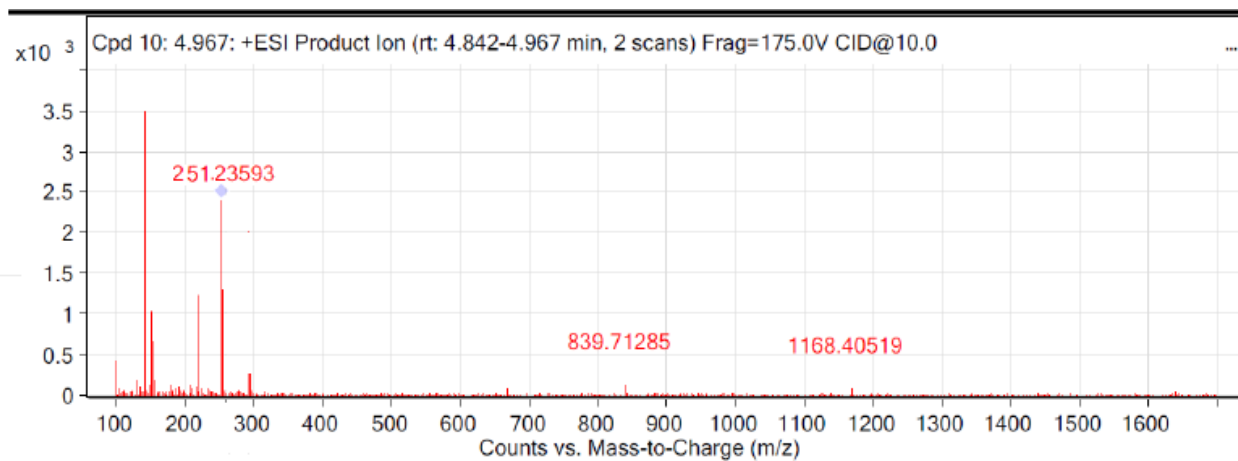
### Slika 13. MS/MS-Vanilin



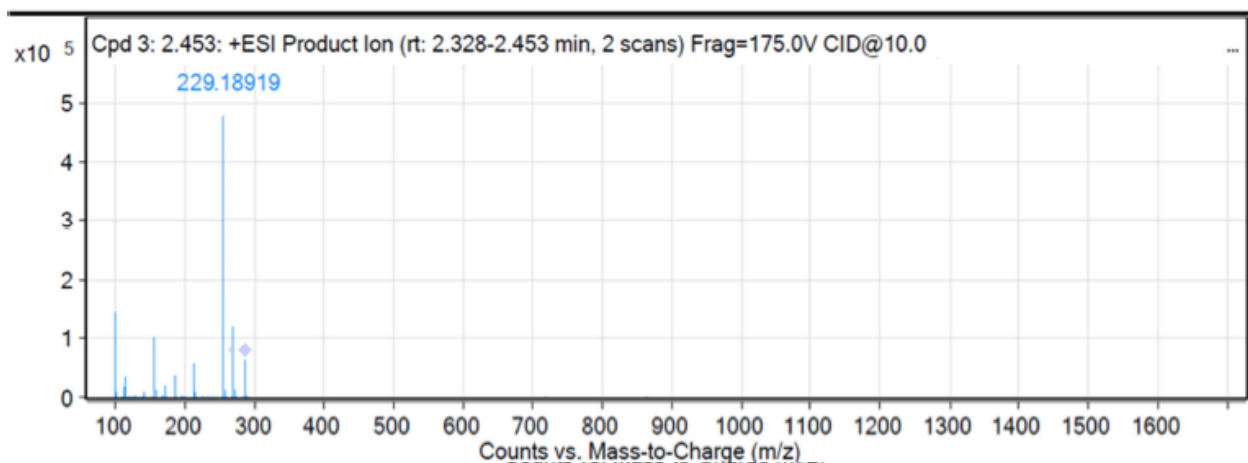
### Slika 14. MS/MS-Etilvanilin



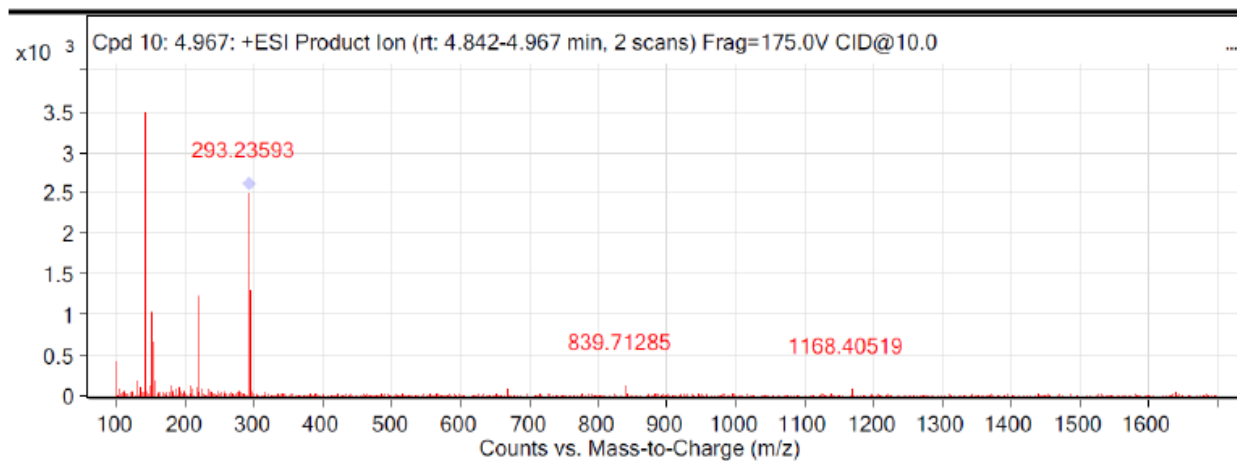
### Slika 15. MS/MS-IMP 1



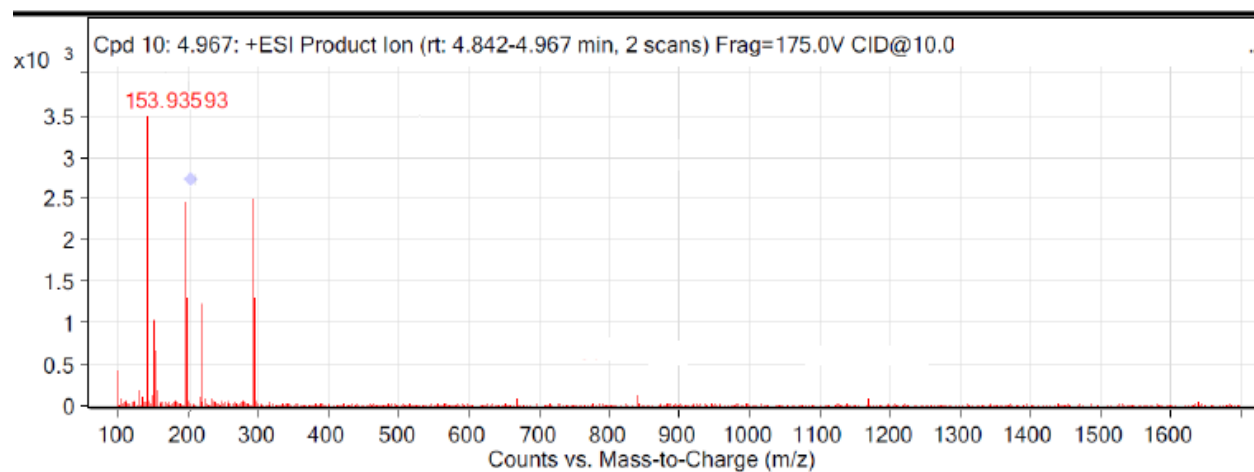
Slika 16. MS/MS-Eu.Ph. Imp F



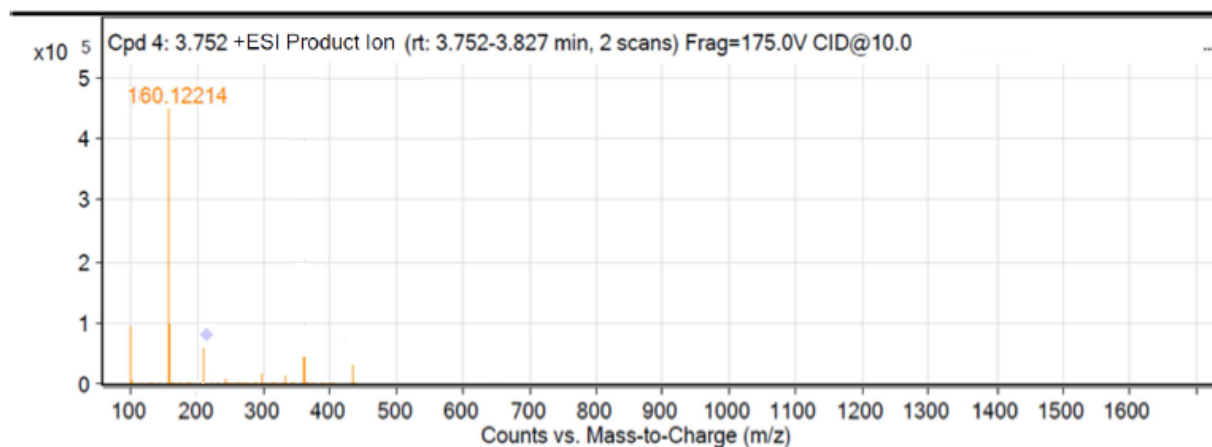
Slika 17. MS/MS-Eu.Ph. Imp B



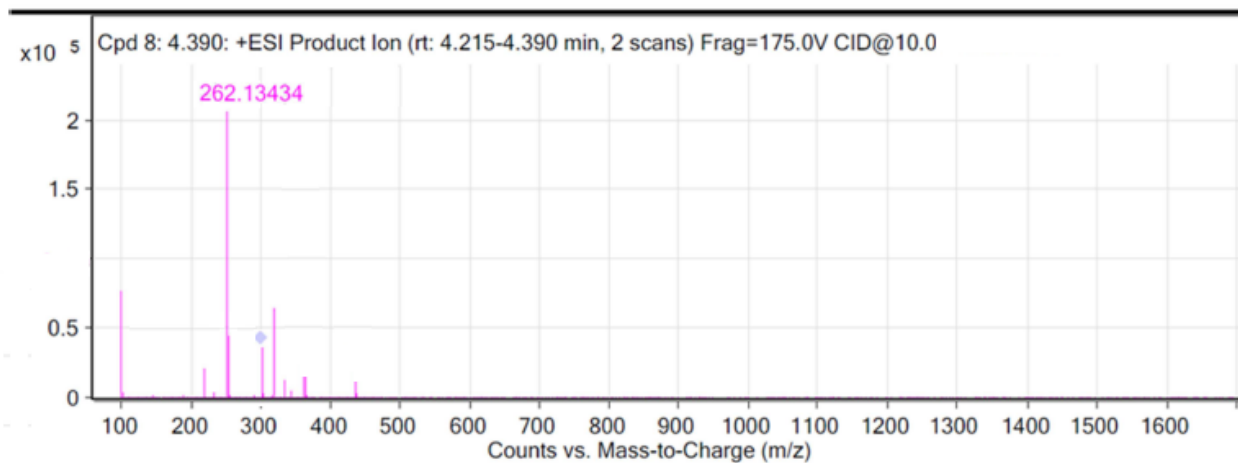
**Slika 18. MS/MS- Eu.Ph. Imp I**



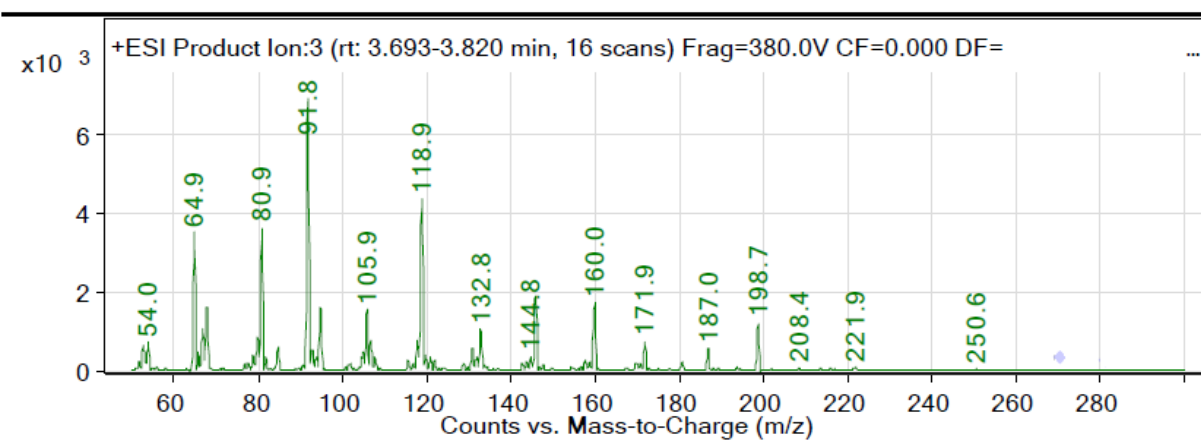
**Slika 19. MS/MS -Eu.Ph. Imp G**



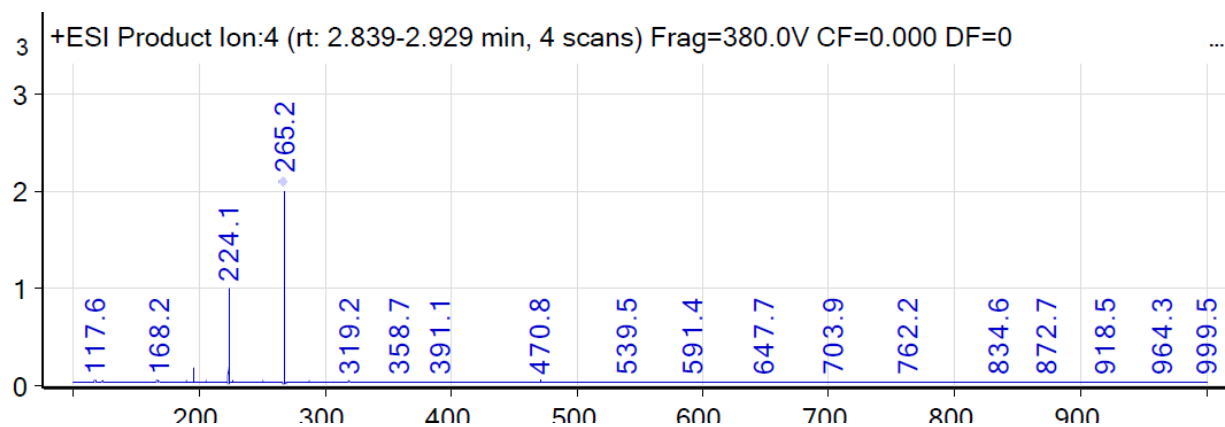
**Slika 20. MS/MS -IMP 2**



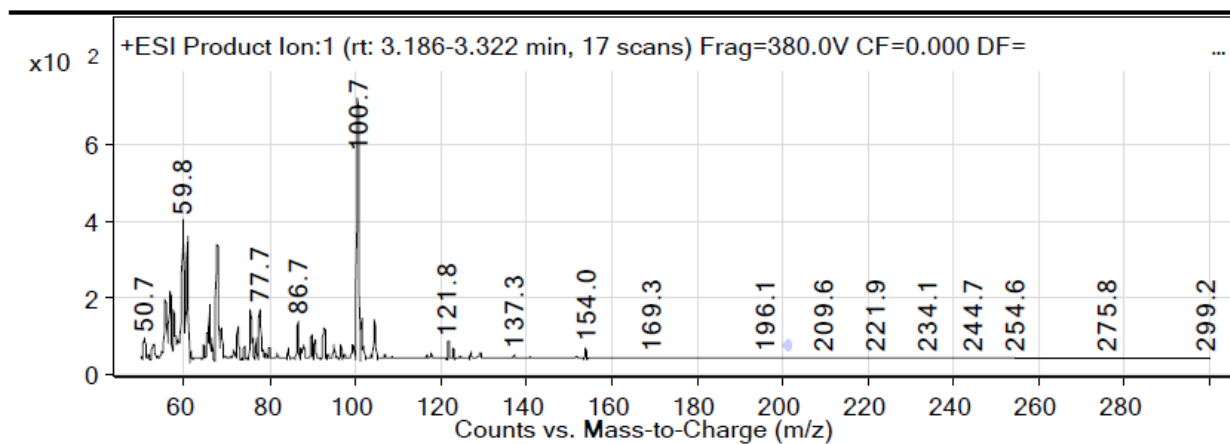
Slika 21. MS/MS - Eu.Ph. Imp A



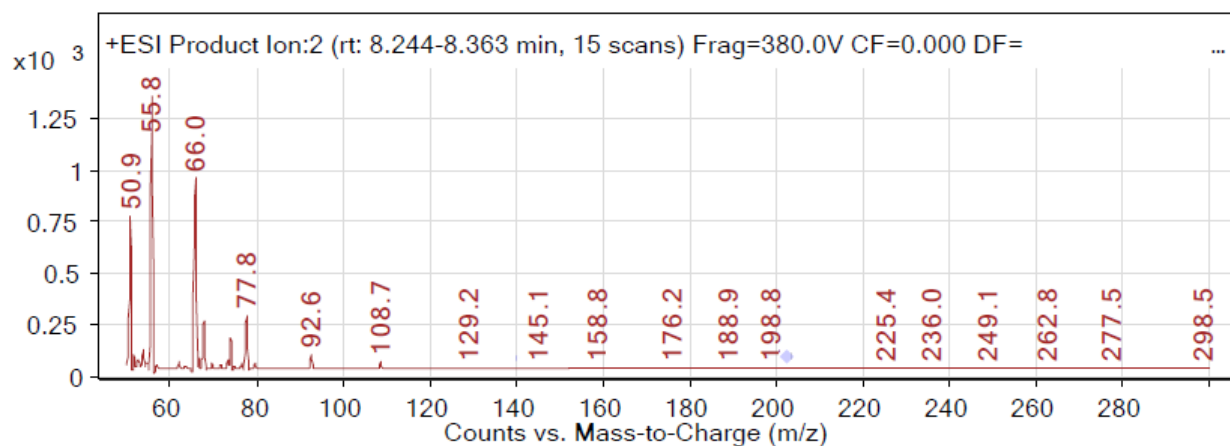
Slika 22. MS/MS -Entakapon



Slika 23. MS/MS -IMP 3



Slika 24. MS/MS -IMP 4



Slika 25. MS/MS -IMP 5

## 7. LITERATURA

1. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs, *J. of Pharmaceut. A.* 4 (2014) 159–165.
2. R. P. Riberio, J. C. Gasparetto, R. O. Vilhena, T. M. Guimaraes de Francisco, C. A. F. Martins, M. A. Cardoso, R. Pontarolo, Simultaneous determination of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-Omethyldopa and dopamine in human plasma by an HPLC–MS/MS method, *Bioanalysis* 7 (2015) 207–220.
3. M. F. Abdel-Ghany, L. A. Hussein, M. F. Ayad, M. M. Youssef, Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture, *Mol. and Biomol. Spect.* 171 (2017) 236–245.
4. A. Vemić, B. Jančić Stojanović, I. Stamenković, A. Malenović, Chaotropic agents in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities, *J. of Pharmaceut. Biomed.* 77 (2013) 9–15.
5. N. G. Mohamed, M. S. Mohamed, Determination of antiparkinsonism drug entacapone, *NODCAR* (2009) 85–89.
6. N. Soukhova, Z. Kassymbek, S. Bradby, A. Martin-Esker, P. White, S. Wahab, Development of characterization methods for entacapone in a pharmaceutical bulk, *J. of Pharmaceut. Biomed.* 54 (2011) 860–865.
7. J. Janković, Parkinson's disease: clinical features and M. Aleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam, A. Hafeez, Ultra performance liquid chromatography (UPLC) - A review, *Austin J. Anal. Pharm. Chem.* 2 (2015) 1056–1060.
8. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* 65 (2016) 471–482.
- 10 M. Petrović, D. Barcelo, LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 486–493.
- 11 W. W. Buchberger, Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge, *Analytica Chimica Acta* 593 (2007) 129–139.

12. M. W. Dong, K. Zhang, Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *Trends in Analytical Chem.* (2014) 1–15.
13. P. W. Carr, D. R. Stoll, Two-dimensional liquid chromatography, principles, practical implementation and applications, *Agilent technologies*, (2015) 1–14.
14. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 645–674.
15. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons, New Jersey, 1979.
16. M. Runje, Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku str, 36-37
- 16 E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry, Principles and Applications, Wiley, Third Edition (2007) 33–36.
17. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengute tehnike tekućinski kromatograf spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina* 45 (2009) 218–232.
18. T. A. Berger, Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 785 (1997) 3–33.
19. Theory of HPLC, Supercritical Fluid Chromatography, Chromacademy, Crawford Scientific, 2008, str. 1–32.
20. E. Klesper, A. H. Corwin, D. A. Turner high pressure gas chromatography above critical temperatures, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 700–701.
21. M. Runje, Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku str, 29-33
22. P. R. Eckard, L. T. Taylor, G. C. Slack, Method development for the separation of phospholipids by subcritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 241–247.
23. R. W. Stringham, B. R. Krueger, J. Marshall, Use of elevated flow rates in preparative subcritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 112–116.
24. H. Fischer, O. Gyllenhaal, J. Vessman, K. Albert, Reaction of aliphatic amines in supercritical carbon dioxide by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and implications for supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 75 (2003) 62–626.
25. L. S. Dainetree, A. Koridowski, P. York, Separation processes for organic molecules using SFC technologies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 351–372.

26. A. Huetz, E. Klesper, Efficiency in supercritical fluid chromatography as a function of linear velocity, pressure/density, temperature and diffusion coefficient employing *n*-pentane as the eluent, *J. Chromatogr. A* 607 (1992) 79–89.
27. M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae, *Food Chem.* 98 (2006) 136–148.
28. M. Novotny, S. R. Springston, P. A. Peaden, J. C. Fjeldsted, M. L. Lee, Capillary supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 53 (1981) 407A–414A.
29. A. Périat, A. Grand-Guillaume Perrenoud, D. Guillarme, Evaluation of various chromatographic approaches for the retention of hydrophilic compounds and MS compatibility, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3141–3151.
30. R. McClain, M. Przybyciel, R. E. Majors, A systematic study of achiral stationary phases using analytes selected with a molecular diversity model, *LC–GC N. Am.* 29 (2011) 894–906.
31. L. T. Taylor, Packed column supercritical fluid chromatography of hydrophilic analytes via water-rich modifiers, *J. Chromatogr. A* 1250 (2012) 196–204.
32. V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Nováková, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 56–71.
33. Z. Wang, O. Liu, B. Donovan, The path forward for SFC in the drug development environment – An industrial perspective, *Am. Pharm. Rev.* 12 (2009) 94–99.
34. V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Nováková, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 56–71.
35. ICH Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures Q2(R1), 2005.
36. A. Dispas, P. Lebrun, E. Ziemons, R. Marini, E. Rozet, P. Hubert, Evaluation of the quantitative performances of supercritical fluid chromatography: From method development to validation, *J. Chromatogr. A* 1353 (2014) 78–88.