

# Razvoj i validacija UHPLC metode prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za određivanje onečišćenja fosamprenavira

---

Perko, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:552163>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



**Sara Perko**

**Razvoj i validacija UHPLC metode prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za određivanje onečišćenja fosamprenavira**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Pliva Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović i suvoditeljstvom dr.sc. Kornelije Lasić, mag. pharm.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović i komentorici dr.sc. Korneliji Lasić, mag. pharm., što su mi omogućile izradu diplomskog rada u Plivi, pružajući mi na taj način uvid u svijet farmaceutske industrije i znanosti, a posebno im zahvaljujem na nesebičnoj i dragocjenoj pomoći pri samoj izradi i pisanju diplomskog rada. Posljednje, ali ne i manje važno, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili najveća podrška i uljepšali mi dane studiranja.*

## Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Fosamprenavir.....	1
1.1.1.	Farmakokinetika fosamprenavira.....	1
1.2.	Kromatografske tehnike odjeljivanja .....	3
1.2.1.	Kromatografski parametri .....	3
1.2.2.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	8
1.3.	Načelo kvalitete ugrađene u dizajn (QbD).....	11
1.3.1.	Implementacija načela kvalitete ugrađene u dizajn u analitičke metode .....	12
1.4.	DryLab® metoda .....	14
1.5.	Validacija analitičkih postupaka .....	17
1.5.1.	Parametri validacije.....	18
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	22
3.	MATERIJALI I METODE .....	23
3.1.	Materijali.....	23
3.2.	Radni instrumenti.....	23
3.3.	Metode .....	23
3.3.1.	Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja fosamprenavira.....	23
3.3.2.	Priprema otopine pufera i diluenta za UHPLC analizu.....	25
3.3.3.	Priprema otopina za ispitivanje relativnog odaziva detektora .....	25
3.3.4.	Priprema otopina standarda.....	25
3.3.5.	DryLab® analiza .....	26
3.3.6.	Priprema otopina za validaciju metode .....	27
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	30
4.1.	Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja fosamprenavira.....	30
4.2.	Određivanje valne duljine detekcije.....	35
4.3.	DryLab® analiza.....	36
4.4.	Validacija UHPLC metode .....	42
4.4.1.	Selektivnost .....	43
4.4.2.	Granica dokazivanja i granica određivanja .....	46
4.4.3.	Linearnost.....	50
4.4.4.	Točnost.....	54
4.4.5.	Preciznost .....	57
4.4.6.	Radno područje .....	59
4.4.7.	Stabilnost.....	60
4.4.8.	Sažetak rezultata validacije metode .....	61
5.	ZAKLJUČAK .....	62
6.	LITERATURA:.....	63
7.	SAŽETAK/SUMMARY .....	65
8.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

### 1.1. Fosamprenavir

Fosamprenavir se primjenjuje u obliku kalcijeve soli. Radi se o bijelom prahu čija je topljivost 0,31 mg/ml u vodi pri 25°C. Povećana topljivosti u odnosu na amprenavir je jedna od prednosti fosamprenavira, jer je na taj način smanjena učestalost doziranja na jednom do dvaput dnevno, kao i veličina samog dozirnog oblika, što omogućuje lakšu primjenu lijeka (<https://pubchem.ncbi.nlm.gov/>, Lv i sur, 2015; Chilukuri i sur, 2014; Vierling i Greiner, 2003).

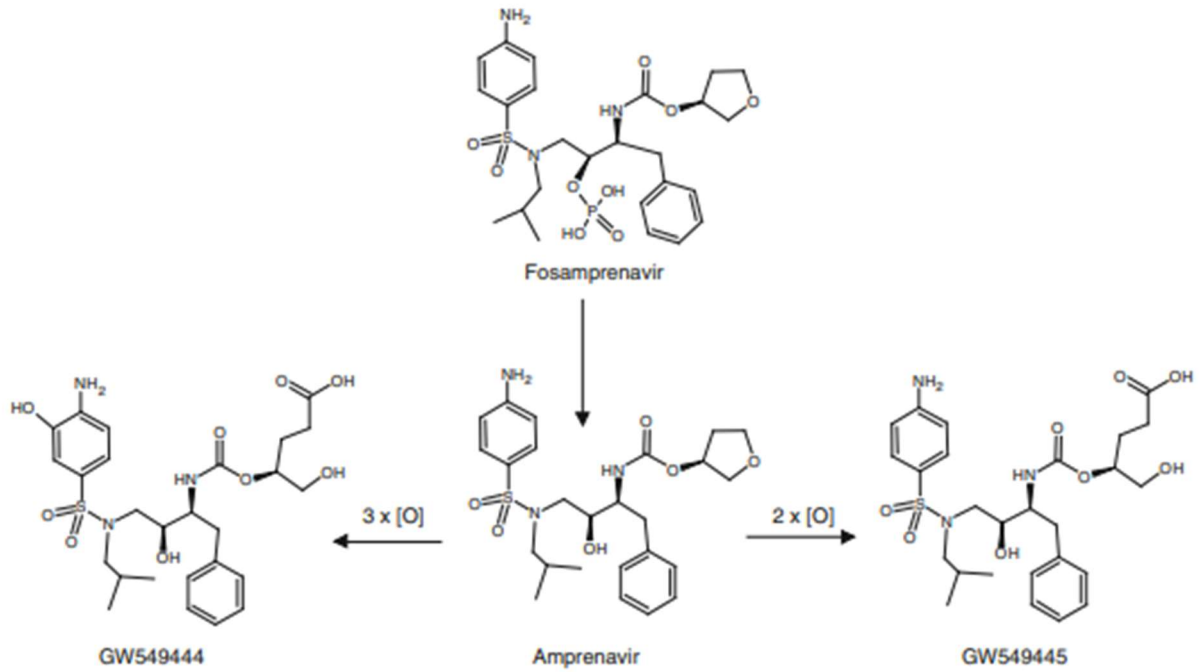
Strukturno gledano, fosamprenavir (Slika 1.) je fosfatni ester amprenavira, odnosno prolijek amprenavira, inhibitora proteaze odobrenog za liječenje HIV-1 infekcije. Za vrijeme HIV replikacije, HIV proteaza reže virusne polipeptidne produkte Gag i Gag-Pol gena kako bi se proizveli proteini virusne jezgre i esencijalni virusni enzimi. Fosamprenavir interferira s navedenim procesom i u obliku aktivnog metabolita amprenavira se veže na aktivno mjesto proteaze, sprječavajući obradu polipeptidnih prekursora Gag i Gag-Pol gena, zbog čega nastaju samo nezrele neinfektivne virusne čestice

([www.drugbank.com](http://www.drugbank.com); <https://reference.medscape.com>; Lv i sur, 2015).

#### 1.1.1. Farmakokinetika fosamprenavira

Nakon oralne primjene membranska permeabilnost fosamprenavira je loša te se pomoću alkalne fosfataze brzo pretvara u aktivni amprenavir. Smatra se da je na razini crijevnog epitela 99% fosamprenavira konvertirano u amprenavir. Koncentraciju amprenavira u plazmi moguće je izmjeriti 15 minuta nakon doziranja, a maksimalna plazmatska koncentracija (C<sub>max</sub>) nastupa 1,5-2 sata nakon primjene fosamprenavira. Amprenavir je supstrat P-glikoproteina, te se apsorbira pasivnom difuzijom. Hrana ne utječe na bioraspodjelu lijeka, samo odgađa apsorpciju za 30 minuta, stoga se lijek može uzimati neovisno o unosu hrane. Nadalje, volumen distribucije amprenavira je značajan i iznosi 430 L. Poznato je da se lijek koncentrira u limfocitima, prelazi placentu te ga nalazimo i u majčinom mlijeku. Vežanje za proteine plazme je 90%, većinom za serumski albumin i  $\alpha$ 1-kiseli glikoprotein. Metabolizira se u jetri putem enzima citokrom P450 3A4 do dva glavna oksidacijska produkta (Slika 1.). Istodobnom primjenom s ritonaviro, potentnim inhibitorom citokroma P450 3A4, značajno se povećava serumski koncentracija amprenavira. S obzirom da je i sam inhibitor citokroma P450 3A4, potreban je oprez pri istodobnoj primjeni lijekova koji su supstrati tog enzima. Fosamprenavir se može koristiti u kombiniranoj terapiji s drugim antiretroviralnim

lijekovima. Vrlo se mala količina nepromijenjenog fosamprenavira i amprenavira (<1%) izlučuje urinom i fecesom (Wire i sur., 2006; Falcoz i sur., 2002).

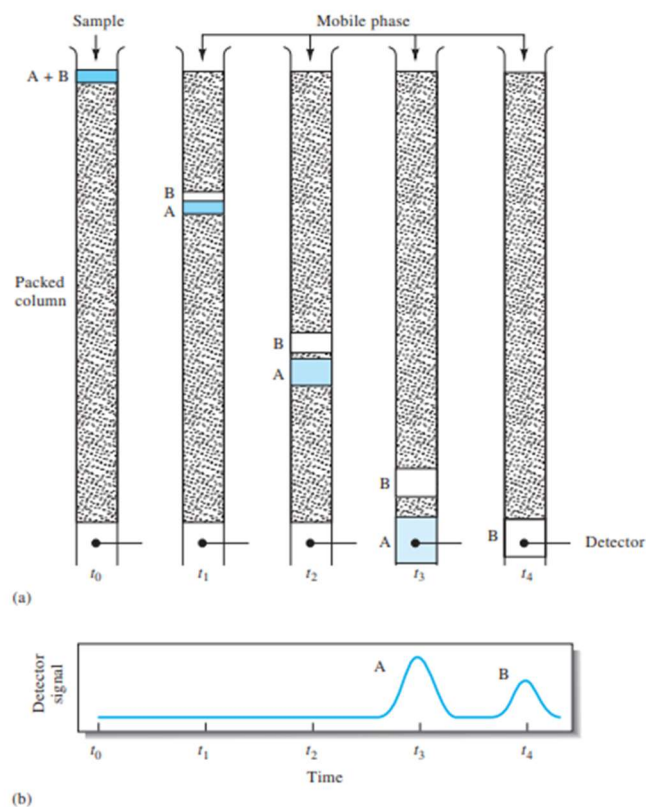


Slika 1. Metabolička konverzija fosamprenavira u amprenavir i njegova dva glavna metabolita

## 1.2. Kromatografske tehnike odjeljivanja

Kromatografija je široko rasprostranjena i nezamjenjiva analitička tehnika za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje sastavnica kompleksnih smjesa. (Skoog i sur., 2013).

Kromatografske tehnike dijele se s obzirom na stacionarnu i mobilnu fazu. Stacionarna faza može biti krutina, tekućina nanosena na krutinu i gel, međutim glavna podjela je prema mobilnoj fazi koja može biti plin, tekućina ili superkritični fluid. Primjer kromatografskog odjeljivanja sastavnica na koloni prikazan je na Slici 2. Sastavnice uzorka putuju niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između mobilne i stacionarne faze. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze, a može se temeljiti na razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te stereokemijskim interakcijama (Nigović, 2019a; Skoog i sur, 2013; Kazakevich i Lobrutto, 2007; Kaštelan, 2003).

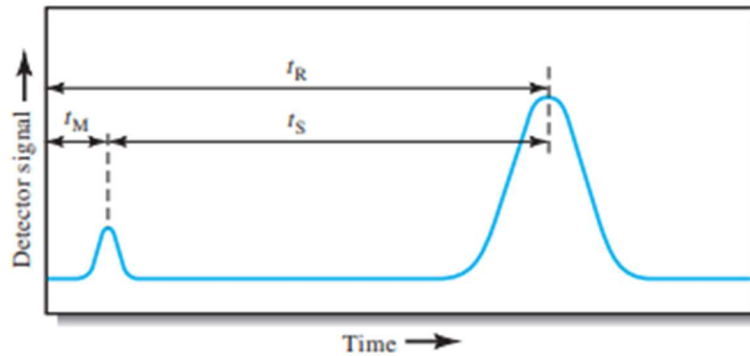


Slika 2. (a) Odjeljivanje sastavnica A i B kromatografskom metodom elucije; (b) signal detektora u različitim fazama elucije

### 1.2.1. Kromatografski parametri

Jedan od parametara vidljivih iz kromatograma je vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ), a definira se kao vrijeme potrebno pojedinoj sastavnici da nakon nanošenja uzorka stigne u detektor.

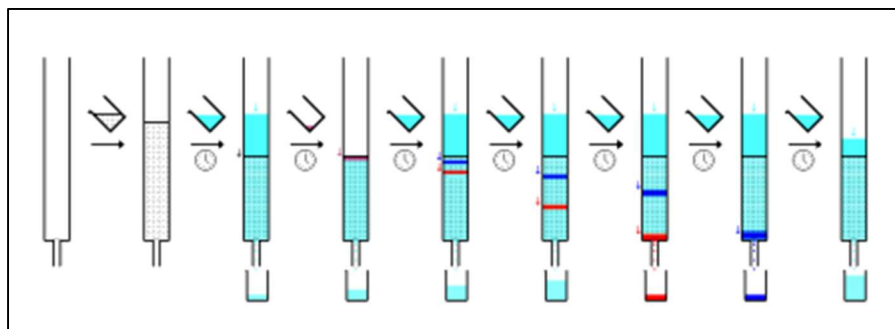
Predstavlja veličinu na temelju koje se identificira tvar, a ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima analita i stacionarne faze te o mobilnoj fazi i tlaku. Vrijeme zadržavanja analita koji samo prolazi ne zadržavajući se na koloni, naziva se vrijeme nezadržavane molekule, odnosno mrtvo vrijeme ( $t_M$ ) prikazano na Slici 3 (Nigović, 2019a; Skoog i sur, 2013; Kazakevich i Lobrutto, 2007).



Slika 3. Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) i mrtvo vrijeme ( $t_M$ )

Volumen zadržavanja ( $V_R$ ) je volumen mobilne faze koji je potreban da analit nakon nanošenja dođe do detektora (Slika 4.), a računa se prema jednadžbi (1) u kojoj je  $t_R$  vrijeme zadržavanja, a  $F$  brzina protoka mobilne faze (mL/min) (Nigović, 2019a; Skoog i sur, 2013; Kazakevich i Lobrutto, 2007).

$$V_R = t_R * F \quad (1)$$



Slika 4. Eluiranje uzorka odgovarajućim volumenom mobilne faze

Faktor zadržavanja ( $k$ ) opisuje brzinu gibanja tvari na koloni. Naziva se još i omjer distribucije mase ( $D_m$ ) ili faktor kapaciteta ( $k'$ ), a predstavlja omjer količine tvari u stacionarnoj fazi i količine tvari u mobilnoj fazi iz čega proizlazi formula (2) gdje je  $V_s$  volumen stacionarne faze,  $V_m$  volumen mobilne faze, a  $K_c$  ravnotežni omjer raspodjele. Dok



se analit giba kroz kolonu, u svakom trenutku se uspostavlja ravnoteža između stacionarne i mobilne faze. Ako je ravnoteža pomaknuta prema mobilnoj fazi, analit se eluira i obratno.

$$k = Kc \frac{Vs}{Vm} \quad (2)$$

Ovaj parametar može se odrediti iz kromatograma (3) što je i najjednostavnije pomoću vremena zadržavanja analita ( $t_R$ ) i mrtvog vremena ( $t_M$ ) (Nigović, 2019a; Skoog i sur, 2013; Kazakevich i Lobrutto, 2007)

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

Nadalje, od parametara su također važni površina pika (A), visina pika (h) i širina pika na polovice maksimalne visine ( $W_h$ ), a za djelotvornost kolone bitni su teorijski tavani, razlučivanje ( $R_s$ ), relativno zadržavanje (r) ili koeficijent selektivnosti ( $\alpha$ ), faktor simetrije ( $A_s$ ) te omjer vrha i dola (p/v). Djelotvornost kolone može se kvantitativno izraziti brojem i visinom teorijskih tavana. Teorijski tavani predstavljaju broj uspostavljenih ravnoteža između stacionarne i mobilne faze, odnosno koliko se puta molekula distribuirala između stacionarne i mobilne faze. Djelotvornost kolone se povećava porastom broja tavana (N) prikazanog formulom (4) gdje je  $t_R$  vrijeme zadržavanja, a  $W_h$  širina pika na polovici maksimalne visine. Djelotvornost kolone pada povećanjem visine tavana (H) prikazane formulom (5) gdje je L duljina kolone, a N broj tavana (Dong, 2019; Nigović, 2019a; Skoog i sur, 2013; Kazakevich i Lobrutto, 2007).

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (4)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

Razlučivanje kolone ( $R_s$ ) je kvantitativna mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka.  $R_s > 1,5$  odgovara odjeljivanju dvaju susjednih pikova na osnovnoj liniji.

Maksimalno dopušteno preklapanje pikova je 0,3%. Razlučivanje kolone može se poboljšati produženjem kolone ili povećavanjem faktora zadržavanja ( $k$ ). Prikazano je jednadžbom (6) u kojoj je  $t_{R1}$  vrijeme zadržavanja tvari 1,  $t_{R2}$  vrijeme zadržavanja tvari 2,  $W_{h1}$  širina pika na polovici maksimalne visine tvari 1, te  $W_{h2}$  širina pika na polovici maksimalne visine tvari 2. Jednadžba vrijedi uz uvjet da je  $t_{R2} > t_{R1}$  (Dong, 2019; Nigović, 2019a; Skoog i sur, 2013; Kazakevich i Lobrutto, 2007).

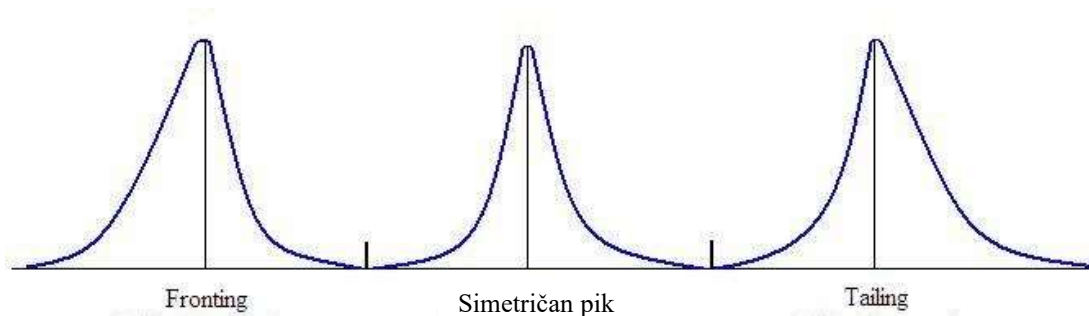
$$R_s = \frac{1.18 (t_{R1} - t_{R2})}{W_{h1} + W_{h2}} \quad (6)$$

Relativno zadržavanje ( $r$ ) ili koeficijent selektivnosti ( $\alpha$ ) pokazuje koliko će dobro kromatografska kolona odijeliti dva sastojka. Računa se prema formuli (7) gdje je  $t_M$  mrtvo vrijeme,  $t_{RA}$  vrijeme zadržavanja supstance A (npr. neko onečišćenje), a  $t_{RB}$  vrijeme zadržavanja supstance B (tvar s kojom se uspoređuje) (Dong, 2019; Nigović, 2019a; Skoog i sur, 2013; Kazakevich i Lobrutto, 2007).

$$r = \frac{t_{RA} - t_M}{t_{RB} - t_M} \quad (7)$$

Faktor simetrije ( $A_s$ ) može biti jednak 1 i tada je pik simetričan, no ako je veći od 1 pik ima "tailing", a ako je manji od 1 pik ima "fronting" (Slika 5.). Računa se prema jednadžbi (8) gdje je  $W_{0.05}$  širina pika na 1/20 visine pika, a  $d$  je udaljenost od maksimuma pika do vodećeg dijela pika mjerena na 1/20 njegove visine. Do nesimetričnosti pika može doći zbog adsorpcije analita na aktivna mjesta stacionarne faze, razgradnje uzorka, unosa velike količine uzorka na kolonu ili loše "uhvaćenog" analita pri unosu na kolonu (Dong, 2019; Nigović, 2019a; Skoog, 2013).

$$A_s = \frac{W_{0.05}}{2d} \quad (8)$$



Slika 5. "Tailing" i "fronting" kromatografskog pika

Omjer vrha i dola ( $p/v$ ) koristi se kada ne postoji prikladna kromatografska metoda kojom bi se odvojio analit od onečišćenja te se posljedično dobivaju kromatografski pikovi analita i onečišćenja koji nisu razdvojeni na baznoj liniji. Prikazan je jednadžbom (9) gdje  $H_p$  predstavlja udaljenost od bazne linije do vrha pika onečišćenja, a  $H_v$  udaljenost od bazne linije do točke gdje su pik onečišćenja i pik analita spojeni (dol) (Nigović 2019a; Council of Europe, 2003).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (9)$$

Kod kvantitativnog određivanja bitni parametri su omjer signala i šuma ( $S/N$ ) te ponovljivost sustava ( $RSD\%$ ). Omjer signala i šuma važan je za točnost određivanja, a jednak je omjeru dvostruke visine pika ( $H$ ) i šumu bazne linije ( $h$ ) što se vidi u jednadžbi (10) (Nigović 2019a; Council of Europe, 2003).

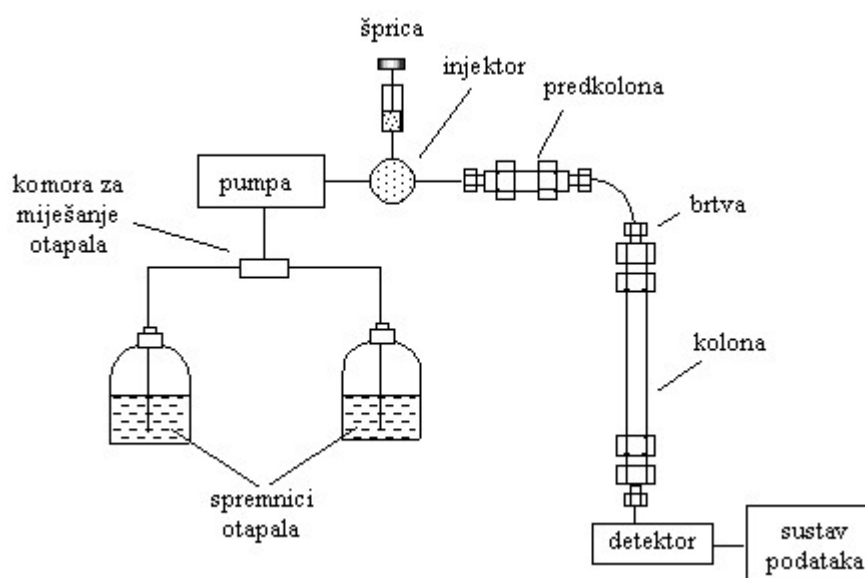
$$S/N = \frac{2H}{h} \quad (10)$$

Ponovljivost sustava ( $RSD\%$ ) je ponovljivost odaziva detektora dobivena slijedom uzastopnih mjerenja za najmanje tri injektiranja. Formula (11) prikazuje omjer standardne devijacije  $s$  i aritmetičke sredine  $\bar{x}$  (Nigović 2019a; Council of Europe, 2003).

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \quad (11)$$

### 1.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (Slika 6.) je uređaj za analizu sastavljen od spremnika za otapala mobilne faze, pumpe koja proizvodi visoke tlakove (400-600 bar), injektora, predkolone (opcionalno), kolone za odjeljivanje (s termoregulatorom) i detektora. Mobilna faza pod vrlo visokim tlakom prolazi kroz kolonu dugu 5 do 25 cm i promjera 3 do 5 mm, u kojoj se nalazi čestice stacionarne faze veličine 3 do 10  $\mu\text{m}$ . Upravo zbog smanjene veličine čestica kromatografija se izvodi pod vrlo visokim tlakovima što povećava djelotvornost, ali i cijenu ovakvog uređaja (Skoog i sur., 2013; Luterotti, 2002).



Slika 6. Shematski prikaz tekucinskog kromatografa visoke djelotvornosti

Postoji više vrsta stacionarnih i mobilnih faza. Čestice stacionarne faze mogu biti različitog oblika, veličine, površine i poroznosti. U uporabi su silikagel, glinica ili porozni grafit (adsorpcija), smole i polimeri s kiselim ili bazičnim skupinama (ionska izmjena), porozni silikagel ili polimeri (gel-kromatografija namijenjena za biološke molekule kao što su proteini i glikoproteini, a temelji se na odjeljivanju prema veličini čestica), različiti kemijski modificirani polimeri, silikagel ili porozni grafit (razdioba) te celulozom, derivatima amiloze, proteinima, peptidima ili ciklodekstrinima modificirane kolone (za kiralnu kromatografiju). Najčešći mehanizam odjeljivanja u primjeni je razdioba, gdje se koristi kemijski modificirani silikagel kao stacionarna faza, te polarna mobilna faza. Silikagel se reakcijom organoklorsilana sa -OH skupinama (silaniziranjem) prevodi u stacionarne faze različite polarnosti. Neke od njih su prikazane u Tablici 1. Važno je da su kod modificiranja sve

silanolne grupe pokrivena, inače dolazi do "tailinga" pikova uslijed adsorpcije pozitivno nabijenih analita na disociranim silanolnim skupinama (Nigović 2019a; Kazakevich, 2007; Smith, 2004; Council of Europe, 2003).

**Tablica 1. Kemijske modifikacije silikagela**

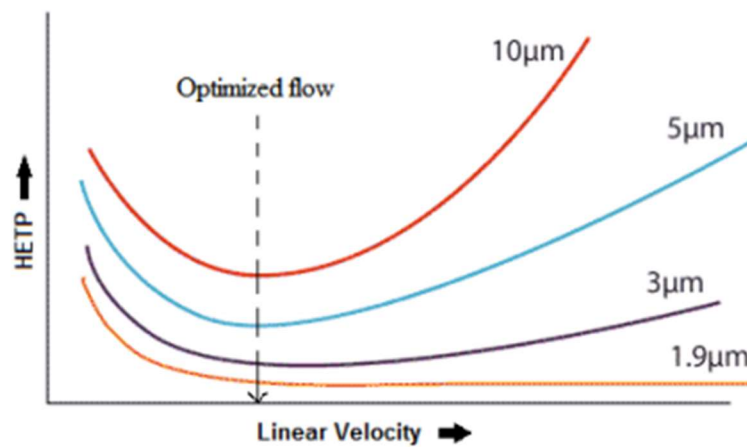
Naziv silikagela	R
oktilsili	$-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$ (C <sub>8</sub> )
oktadecilsilil	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$ (C <sub>18</sub> )
fenilsilil	$-(\text{CH}_2)_n\text{-C}_6\text{H}_5$
aminopropil	$-(\text{CH}_2)\text{-NH}_2$
cijanopropil	$-(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$
diol	$-(\text{CH}_2)_3\text{-OCH(OH)-CH}_2\text{-OH}$

Razlikujemo normalno faznu i reverzno faznu kromatografiju. Kod normalno fazne kromatografije stacionarna faza je polarna, a mobilna manje polarna. Koristi se smjesa polarnih i nepolarnih otapala, pri čemu prevladava udio nepolarnih. Kod reverzno fazne kromatografije stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza je polarna. Često se koristi kombinacija organskih otapala s vodom, uz uvjet da je udio vode kontroliran kako bi se zadržala reproducibilnost rezultata. Mobilnu fazu je potrebno filtrirati da se uklone čestice veće od 0.45 μm i degazirati da se izbjegne stvaranje mjehurića zraka u detektoru.

Eluacija može biti izokratična i gradijentna. Tijekom izokratične eluacije ne mijenja se sastav mobilne faze, dok se kod gradijentne eluacije sastav mobilne faze može mijenjati u drugi (Nigović 2019a; Council of Europe, 2003; Ahuja i Scypinski, 2001).

U današnje vrijeme sve se više koristi tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC). Razlikuje se od tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti po tome što se koristi stacionarna faza punjena česticama manje veličine (manje od 1,9 μm) te iz tog razloga zahtjeva pumpu koja proizvodi još više tlakove (do 1000 bar). Iz Van Deemterove jednadžbe proizlazi da će se smanjenjem veličine čestica stacionarne faze postići veća djelotvornost kolone i brzina protoka mobilne faze što onda zahtjeva upotrebu manje količine mobilne faze (Slika 7.). Time je postignuto drastično bolje razlučivanje i osjetljivost metode te skraćeno vrijeme analize što u konačnici dovodi do

bolje kvalitete i smanjene cijene analize (Dong, 2019; Sahu i sur, 2018; Hussain i Shaikh, 2016; Taleuzzaman i sur, 2015).



Slika 7. Van Deemterove predikcije za različite veličine čestica stacionarne faze; HEPT-visina ekvivalentna teorijskom tavanu (djelotvornost kolone)

Nadalje, za HPLC i UHPLC metode komercijalno su dostupni i mnogi detektori, uključujući UV detektor s nizom dioda (engl. *Diod Array Detector*, DAD), elektrokemijski, fluorescencijski, detektor raspršenja svjetla u uparenom uzorku (engl. *Evaporative Light Scattering Detector*, ELSD), maseni detektor i drugi. Najčešće se upotrebljava UV detektor s nizom dioda jer mnogi spojevi apsorbiraju svjetlost pri valnoj duljini 190-600 nm, odnosno u vidljivom i UV području (Swartz, 2010).

### 1.3. Načelo kvalitete ugrađene u dizajn (QbD)

Međunarodno vijeće o harmonizaciji (engl. *International Council on Harmonisation*, ICH) definira načelo kvalitete ugrađene u dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) kao sistematičan pristup razvoju farmaceutskog proizvoda koji započinje predefiniranjem ciljeva. Naglašava poznavanje proizvoda te razumijevanje i kontrolu samog procesa, a temelji se na znanstvenim činjenicama i upravljanju rizicima.

Uzimajući u obzir iznimnu važnost kvalitete proizvoda, minimum osiguravanja kvalitete koji bi trebao biti uključen u farmaceutski razvoj proizvoda obuhvaća sljedeće točke:

1. definiranje profila kvalitete ciljanog proizvoda (engl. *Quality Target Product Profile*, QTPP) u smislu kakvoće, sigurnosti i učinkovitosti na koje utječe put primjene, farmaceutski oblik, bioraspodjeljivost, jačina i stabilnost proizvoda
2. identificiranje potencijalnih kritičnih atributa kvalitete (engl. *Critical Quality Attributes*, CQAs) lijeka, tako da se te karakteristike proizvoda koje utječu na kvalitetu proizvoda mogu detaljnije proučavati i kontrolirati
3. utvrđivanje kritičnih parametara kvalitete aktivnih i pomoćnih tvari te odabir tipa i količine pomoćnih tvari u cilju osiguravanja odgovarajuće kvalitete proizvedenog lijeka
4. biranje prikladnog proizvodnog procesa definiranjem kritičnih procesnih parametara (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) čije varijacije mogu utjecati na CQAs proizvoda, stoga se moraju pratiti kako bi se osigurala željena kvaliteta rezultata analize
5. definiranje kontrolne strategije.

Nadalje, dodatne QbD smjernice razvoja proizvoda uključuju sljedeće značajke:

1. sistematična evaluacija, razumijevanje i poboljšavanje formulacije proizvoda i proizvodnog procesa uključujući identifikaciju karakteristika proizvoda i parametara proizvodnje koji mogu imati učinak na CQAs proizvoda kroz prethodno stečeno znanje, eksperimente i procjenu rizika te utvrđivanje funkcionalnih odnosa karakteristika materijala i parametara proizvodnje s CQAs proizvoda
2. kontrolna strategija temelji se na pojačanom razumijevanju proizvoda i procesa proizvodnje u kombinaciji s upravljanjem rizicima

3. QbD pristupom se uspostavlja dizajn u prostoru (engl. *Design Space*, DS) definiran kao višedimenzionalna kombinacija i interakcija unesenih varijabli i procesnih parametara koji osiguravaju kvalitetu. U tu svrhu, eksperimentalni dizajn (engl. *Design of Experiments*, DoE) predstavlja osnovu za primjenu QbD pristupa.

Kao rezultat, ovaj sistematičniji pristup mogao bi ubrzati kontinuirani razvoj i uvođenje inovacija kroz proizvodni ciklus (Lasić i sur, 2020; Sahu i sur, 2018; ICH Q8 (R2), 2009).

### **1.3.1. Implementacija načela kvalitete ugrađene u dizajn u analitičke metode**

Za razliku od tradicionalnog pristupa razvoju metode koji se temelji na principu pokušaja i pogreške te osigurava kvalitetu analizom proizvoda na kraju proizvodnog ciklusa (engl. *Quality by Testing*, QbT), načelo kvaliteta ugrađena u dizajn zagovara ugradnju kvalitete u proizvod već od samog početka. Njegove prednosti su mnogobrojne, a neke od njih su visoka razina sigurnosti u kvalitetu proizvoda, smanjenje troškova i povećanje učinkovitosti proizvodnog procesa za industriju, otvaranje prilika za inovacije i kontinuirani napredak te prednosti vezane uz regulatorni dio.

Načelo kvalitete ugrađene u dizajn u analitičkim metodama temelji se na dijeljenju znanja i kontinuiranom razvoju. Koristi procjenu na temelju rizika kako bi se dizajnirao razvoj, validacija i transfer metode te postiglo jačanje izdržljivosti metode. Preporuka tih smjernica je i korištenje prethodnih iskustava razvoja metode kod promjene u formulaciji proizvoda ili u slučaju pojave novog onečišćenja, kako bi se skratilo vrijeme razvoja metode uz zadržavanje visoke kvalitete i smanjenje troškova. Nadalje, smjernice olakšavaju i savladavanje regulatornih izazova u industriji kako bi se usvojile postojeće ili nove, netradicionalne analitičke tehnologije za razvoj novih i već odobrene proizvode. Fokus navedenog načela je na razumijevanju metode, odnosno shvaćanju kako promjene u ulaznim parametrima utječu na rezultate analize, promatranju različitih odnosa između instrumenta, uzoraka i parametara metode, razumijevanju mehanike na temelju znanja kemije, biokemije i fizike te uključivanju prethodno stečenih znanja o tehnikama i metodama.

Primjer primjene načela kvalitete ugrađene u dizajn je i programski paket za optimizaciju i razvoj metode DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka). DryLab® definira ciljeve metode kao što je uvjet da je rezolucija veća od 1,5 te da je vrijeme analize minimalno i da je metoda izdržljiva. Nadalje, određuje kritične parametre odjeljivanja kao što su vrijeme i oblik gradijenta, temperatura, pH eluenta, stacionarna faza itd. Dizajniranje eksperimenta prikazano je 1D, 2D i 3D DryLab® modelima na temelju kojih se donosi odluka o odabiru kolone i



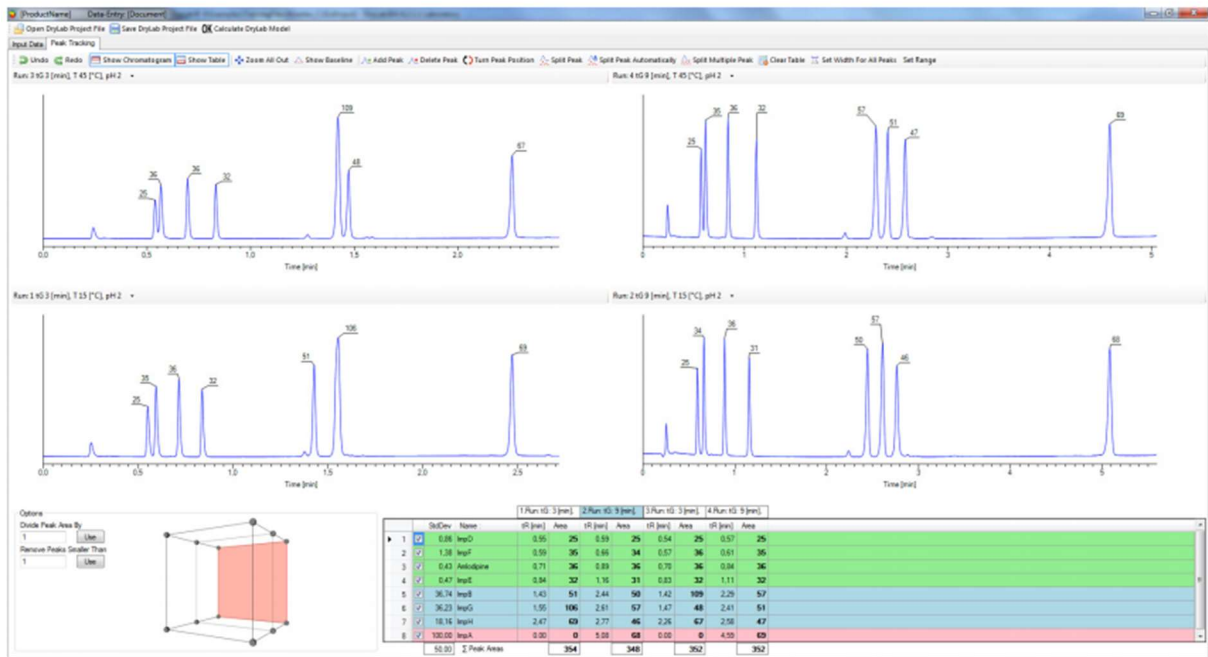
optimizira se eluent. U konačnici definira se dizajn u prostoru (engl. *Design space*) koji omogućava ispitivanje robusnosti metode i kontinuirano poboljšanje metode korištenjem informacija koje ovaj softver pruža (<http://molnar-institute.com>, 2021; Lasić i sur, 2020).

#### 1.4. DryLab® metoda

DryLab® je programski paket koji se koristi za eksperimentalno modeliranje i na osnovi nekoliko prethodno dobro definiranih eksperimentalnih parametara predviđa kromatografsko ponašanje sustava. Neki od parametara koji se trebaju definirati su način eluiranja (izokratično ili gradijentno), sastav i protok mobilne faze, dužina i promjer kolone te dimenzija čestica stacionarne faze. Njegovom primjenom postiže se ušteda vremena i smanjenje utroška resursa pri optimizaciji metoda kao i u njihovoj rutinskoj primjeni. Primjenjuje se i kod transfera metoda gdje upućuje na to koji su kritični parametri metode, odnosno na promjenu kojih parametara je sustav osjetljiviji, što osigurava bolju kvalitetu metode. Jedna od novijih mogućnosti DryLab® softvera je procjena robusnosti (izdržljivosti) metode uz definiranje i vizualni prikaz prostora dizajna, kombinaciju značajnih ulaznih parametara i parametara proizvodnje koji osiguravaju odgovarajuću kvalitetu u optimizaciji i procjeni metode, što je važno za prethodno opisano načelo kvalitete ugrađene u dizajn (Terzić i sur, 2014).

Teorijska podloga za DryLab® program je solvofobna teorija prema kojoj je kromatografija objašnjena putem termodinamičkih načela te predstavljena kao reverzibilno vezanje molekula analita s ligandom na površini stacionarne faze. Glavni utjecaj na vezanje ima mobilna faza prije nego privlačne sile između analita i liganda, a sila odgovorna za vezanje je smanjivanje nepolarne površine izložene mobilnoj fazi. Međutim, ova teorija ne uzima u obzir osobine stacionarne faze pa su one dodatno proučavane i implementirane u DryLab® softver.

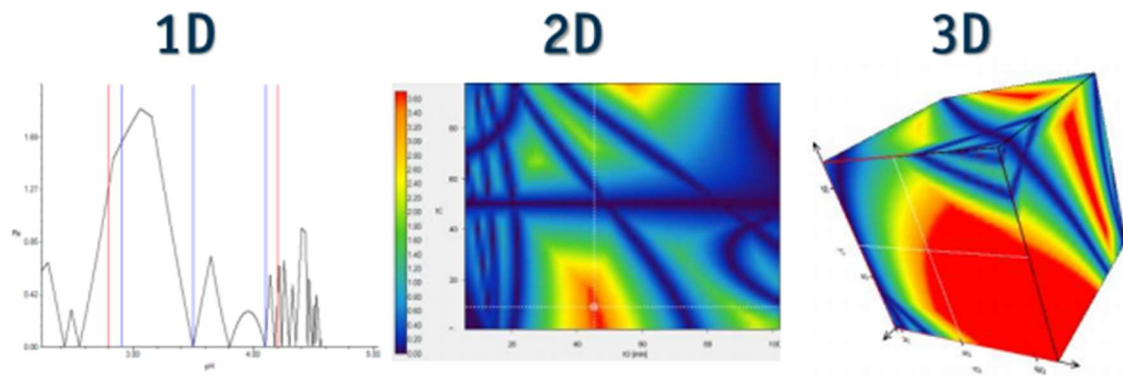
DryLab® program ima opciju automatskog praćenja pikova komponenti u više kromatografskih analiza na osnovi njihove površine (Slika 8.), stoga je potrebno unijeti vremena zadržavanja i površine pikova komponenti uzorka iz inicijalnih kromatografskih analiza. Pri tome volumen injektiranja u provođenim eksperimentima (engl. *basic runs*) mora biti konstantan. Pogrešno prepoznavanje pikova može rezultirati pogrešnim razumijevanjem kromatografskog odjeljivanja što čini korak praćenja pikova najbitnijim u dobivanju pouzdanih rezultata (Lasić i sur, 2020; Terzić i sur, 2014).



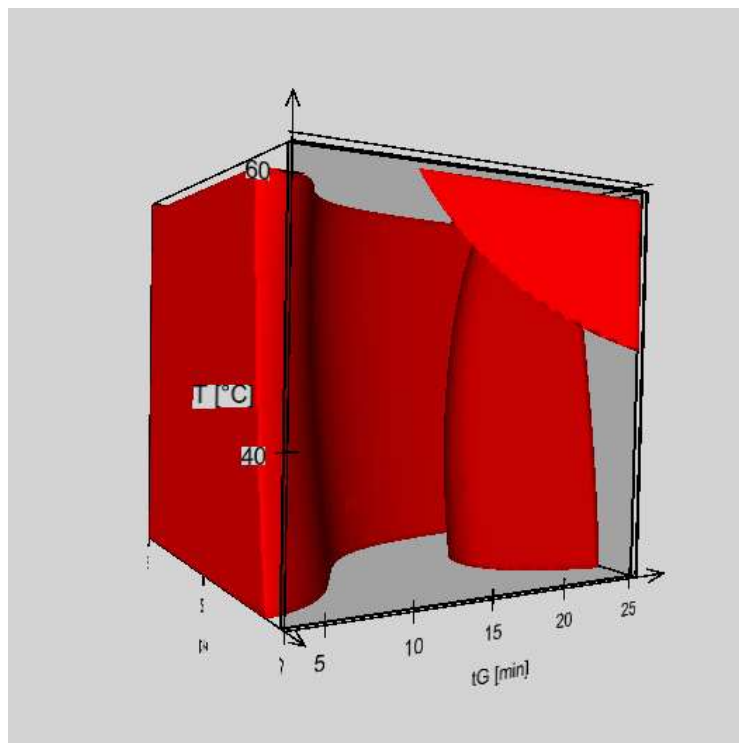
Slika 8. Praćenje pikova u DryLab® softveru

Nadalje, program zahtijeva i unos karakteristika kromatografske kolone (duljina, promjer i veličina čestica stacionarne faze), protoka mobilne faze, temperature, pH vrijednosti mobilne faze te sastava mobilne faze (sadržaj organskog otapala i sadržaj vodene faze s koncentracijom modifikatora npr. trietilamina). Nakon unosa potrebnih podataka generira se model kromatografskog ponašanja uzorka koji se predstavlja kritičnom rezolucijskom mapom (engl. *Critical Resolution Map*, CRM). Program računa kritičnu vrijednost parametra rezolucije (najmanja vrijednost parametra rezolucije između dva analita koji se najlošije razdvajaju) i vizualno je predstavlja 1D, 2D i 3D rezolucijskim mapama (Slika 9.). Zadovoljavajuće odjeljivanje prikazano je područjima crvene boje, dok područja plave boje predstavljaju uvjete u kojima dolazi do koeluiranja sastavnica. Također, na modelima rezolucijskih mapa može se vidjeti i robusnost metode (Slika 10.).

Zaključno, sve veća primjena DryLab® softvera u potpunosti je opravdana, jer program značajno skraćuje vrijeme razvoja metode pružajući važne informacije korisniku, u skladu je s načelom kvalitete ugrađene u dizajn i olakšava transfer metode, a uz to je i ekološki prihvatljiv model koji smanjuje količinu otpada i štedi energiju (Terzić i sur., 2014).



Slika 9. 1D, 2D i 3D rezolucijske mape u DryLab® softveru



Slika 10. Prikaz robusnog prostora odabrane kolone u DryLab® softveru

## 1.5. Validacija analitičkih postupaka

Validacija analitičkih postupaka je u današnje vrijeme važan dio dobre analitičke prakse te je usko povezana s razvojem analitičke metode. Zato Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za humanu primjenu (engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) propisuje smjernice za validaciju analitičkih postupaka. Validacijom analitičkog postupka se utvrđuje, ali i dokumentira prikladnost ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. Kada je postupak validiran postoji jamstvo da će se u propisanim uvjetima njegove primjene (koji se osiguravaju ispitivanjem prikladnosti sustava) dobiti ispravni, pouzdani i konzistentni rezultati. Za proces validacije je iznimno važno da je oprema specificirana, da ispravno radi i da je adekvatno kalibrirana. Nadalje, važno je da je analitičar koji provodi analizu kompetentan i educiran da donese odgovarajuće zaključke tijekom procesa validacije. Parametri koji se određuju u postupku validacije metode su: specifičnost/selektivnost, linearnost i radno područje, točnost, preciznost, granica dokazivanja, granica određivanja i izdržljivost (robusnost). Ispitivani parametri ovise o namjeni metode koja se validira, što je prikazano u Tablici 2. Namjena metode može biti identifikacija farmaceutske tvari, ispitivanje graničnih vrijednosti onečišćenja ili njihovo kvantitativno određivanje te određivanje sadržaja farmaceutske tvari (Nigović, 2019b; Nigović i sur, 2019c; ICH Q2(R1), 2005; Kafil, 2011; Ravichadran, 2010; Kazakevich i Lobrutto, 2007; ICH Q2(R1), 2005; Ahuja i Scypinski, 2001).

**Tablica 2. Ispitivani parametri validacije ovisno o namjeni metode**

	identifikacija	ispitivanje onečišćenja-kvantifikacija	ispitivanje onečišćenja-granične vrijednosti	određivanje sadržaja
točnost	-	+	-	+
ponovljivost	-	+	-	+
srednja preciznost	-	+	-	+
specifičnost	+	+	+	+
LOD	-	-	+	-
LOQ	-	+	-	-
linearnost	-	+	-	+
radno područje	-	+	-	+

Razvoj i validacija metode traju sve dok propisani zahtjevi za validacijske parametre ne budu zadovoljeni. Opis analitičkog postupka treba biti detaljan kako bi ga svaki analitičar mogao ponoviti. Obuhvaća pripravu uzoraka, poredbenih tvari i reagensa, opis mjernih uređaja i instrumentalnih parametara analize te odgovarajuće formule za izračunavanje rezultata analize.

Validacija je prema zahtjevima dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing praxis*, GMP) i dobre laboratorijske prakse (engl. *Good laboratory praxis*, GLP) obvezni postupak pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode, kao i pri promjeni u nekom dijelu već validirane analitičke metode. Stoga je pri izmjeni u sintetskom putu aktivne farmaceutske tvari, izmjeni sastava farmaceutskog proizvoda i izmjeni analitičkog postupka potrebna revalidacija analitičke metode.

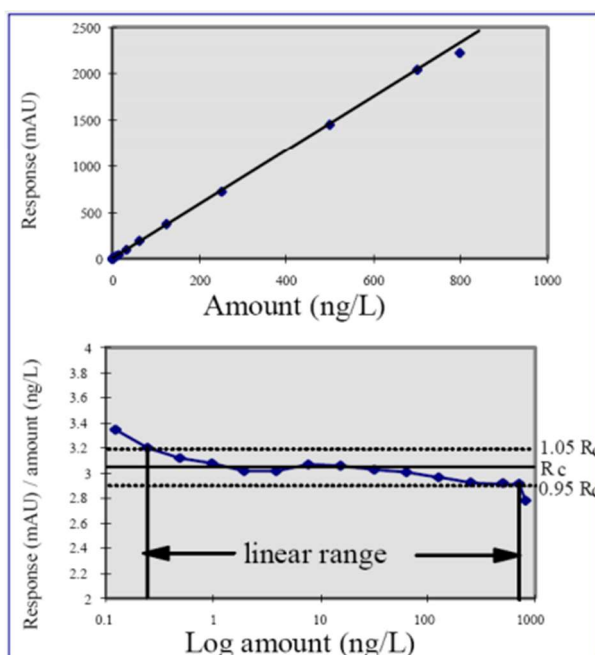
Analitičke metode opisane u farmakopejskim monografijama su već prethodno validirane. Međutim pri njihovoj primjeni u praksi potrebno je ispitati prikladnost sustava pomoću provjere različitih parametara kao što su razlučivanje, omjer vrha i dola ili faktor simetrije. Ukoliko ti parametri nisu odgovarajući, dopuštene su i određene promjene u uvjetima koje ne zahtijevaju revalidaciju metode. Ponekad je potrebno i verificirati farmakopejsku metodu umjesto revalidacije, na način da se procjenjuje samo dio parametara validacije kako bi se prikupili odgovarajući podaci i u konačnici dobili pouzdani rezultati. Verifikacijom se dokazuje da se analitička metoda prikladno koristi u određenom laboratoriju pod stvarnim uvjetima korištenja kako bi dala pouzdane rezultate (Nigović, 2019b; Nigović i sur, 2019c; ICH Q2(R1), 2005; Kapil, 2011; Ravichadran, 2010; Kazakevich i Lobrutto, 2007; ICH Q2(R1), 2005; Ahuja i Scypinski, 2001).

### **1.5.1. Parametri validacije**

Specifičnost (engl. *specificity*) je sposobnost analitičke metode da nedvojbeno razlikuje samo jednu komponentu od ostalih prisutnih u uzorku. Budući da je postići specifičnost analitičke metode rijetko moguće, najčešće se ispituje selektivnost (engl. *selectivity*) koja predstavlja mogućnost metode da točno odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka, odnosno matrice uzorka. Selektivnost se može ispitivati u svrhu identifikacije ili ispitivanja čistoće i određivanja sadržaja. U svrhu identifikacije rezultati analize se uspoređuju s referentnim materijalom, a kod ispitivanja čistoće i određivanja sadržaja čista tvar se cijepi očekivanim onečišćenjima ili pomoćnim tvarima te analizira uzorak. Oni se moraju dobro odjeljivati od analita i njihova prisutnost ne smije utjecati na rezultate analize. Ukoliko onečišćenja nisu dostupna, potiče se razgradnja uzorka kako bi nastala onečišćenja i mogle

ispitati interferencije usporedbom rezultata određivanja sadržaja i profila čistoće prije i poslije razgradnje. Korisno je ispitati i čistoću kromatografskog signala uzimanjem UV spektra na vrhu, uzlaznom i silaznom dijelu pika kako bi se provjerilo sastoji li se pik samo od jedne komponente .

Linearnost (engl. *linearity*) analitičke metode predstavlja njezinu sposobnost da unutar određenog intervala daje rezultate (odaziv detektora) koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Pripremaju se serije s različitim koncentracijama analita, najmanje pet različitih koncentracija koje predstavljaju pet točaka, a svaka koncentracija određuje se tri do šest puta te se crta regresijski pravac. Regresijski pravac je grafički prikaz ovisnosti analitičkog signala o koncentraciji analita. Linearnost metode izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca ( $r$ ). Linearnost može biti prikazana i kao ovisnost omjera signala i odgovarajuće koncentracije o logaritmu koncentracije analita. Tada je u linearnom području linija horizontalna (Slika 11.).



Slika 11. Grafički prikazi linearnosti analitičke metode

Radno područje mjerenja (engl. *range*) označava raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku, uključujući i granične vrijednosti, unutar kojeg primijenjena analitička metoda ima zadovoljavajuću točnost, preciznost i linearnost. Preporučeno radno područje za određivanje sadržaja aktivne tvari je 80-120%.

Točnost (engl. *accuracy*) analitičke metode je parametar koji pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Analizira se

uzorak poznate koncentracije te uspoređuju izmjerene i stvarne vrijednosti. Za utvrđivanje točnosti provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode, i to nakon ispitivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuje kao analitički prinos (engl. *recovery*) prikazan formulom (12) u kojoj je  $\bar{x}$  srednja izmjerena vrijednost, a  $\hat{x}$  stvarna vrijednost analita u uzorku. Točnost metode ukazuje na sustavnu pogrešku.

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} * 100 \quad (12)$$

Preciznost (engl. *precision*) analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Moguće ju je ispitati kroz najmanje pet do šest određivanja uz primjenu dvije do tri različite koncentracije koje se nalaze u području linearnosti. Preciznost se može iskazati kao ponovljivost (engl. *repeatability, intra-day precision*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision, inter-day precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost izražava podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu, najčešće unutar jednog dana. Srednja preciznost iskazuje odstupanje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka istom metodom pod različitim uvjetima (različiti dan, analitičar ili instrument) u istom laboratoriju. Najčešće se provodi unutar tri dana. S druge strane, obnovljivost izražava odstupanje rezultata dobivenih u različitim laboratorijima. Nadalje, preciznost se može izraziti kao standardno odstupanje, raspon pouzdanosti oko srednje vrijednosti te relativno standardno odstupanje (RSD%) koje je najčešće u upotrebi (prikazano formulom (13) gdje je  $s$  standardna devijacija, a  $\bar{x}$  aritmetička sredina). Granice prihvatljivosti za RSD% vrijednosti ovise o tipu analize i koncentraciji analita. Preciznost ukazuje na slučajne pogreške metode.

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (13)$$

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection, LOD*) je najniža koncentracija analita koja se može dokazati, ali ne i odrediti, prema zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (engl. *limit of quantitation, LOQ*) je najniža koncentracija analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću pri propisanim uvjetima metode. Granica dokazivanja i



određivanja određuju se razrjeđivanjem ispitivane otopine, a predstavljaju omjer signala i šuma ( $LOD = 3:1$  ili  $2:1$ ;  $LOQ = 10:1$ ). Uspoređuju se signali uzorka poznatih niskih koncentracija analita sa signalom slijepog pokusa. Mogu se odrediti i iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca putem navedenih formula (14) i (15).  $\sigma$  predstavlja standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, dok je  $a$  nagib kalibracijskog pravca, odnosno osjetljivost metode.

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{a} \quad (14)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{a} \quad (15)$$

Izdržljivost (engl. *robustness*) analitičke metode je mjera njezine sposobnosti da ostane nepromijenjena pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Indikator je pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine normalne primjene uz male promjene uvjeta u kojima se realno provode analize. Procjenjuje se variranjem jednog parametra, dok ostali ostaju nepromijenjeni, a njegov izbor ovisi o samoj metodi. Identificiraju se kritični faktori koji utječu na metodu, a analitičar definira uvjete koji moraju biti strogo kontrolirani tijekom provođenja analize. Kod kromatografskih metoda mogu se ispitati male promjene temperature, brzine protoka mobilne faze, promjena pH mobilne faze, kolone i slično.

Otpornost (engl. *ruggedness*) je mjera reproducibilnosti rezultata dobivenih analizom istog uzorka pod nizom očekivanih radnih uvjeta ispitivanja. Gleda se utjecaj okoline i radnih varijabli metode (različiti laboratorij, analitičar, instrument, šarže reagensa) na njezine rezultate. Prema ICH smjernicama definirana je kao obnovljivost, a pojam otpornost pojavljuje se u Američkoj farmakopeji.

Stabilnost (engl. *stability*) se definira kao stabilnost ispitivane otopine uzorka pod utjecajem temperature i vremena. Utvrđuje se ponovljenom analizom otopine uzorka nakon što je stajala neko vrijeme. Izražena je analitičkim prinosom, odnosno omjerom koncentracije analita prilikom prvog mjerenja i koncentracije analita nakon drugog mjerenja. Otopina je stabilna kada RSD% između izmjerenih vrijednosti ne prelazi 20% (Nigović, 2019b; Nigović i sur, 2019c; ICH Q2(R1), 2005; Kapil, 2011; Ravichadran, 2010; Kazakevich i Lobrutto, 2007; ICH Q2(R1), 2005; Ahuja i Scypinski, 2001).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tema ovog diplomskog rada je razvoj UHPLC metode za određivanje onečišćenja lijeka fosamprenavir kalcija. Kontrola onečišćenja u lijeku je apsolutni imperativ u farmaceutskoj industriji, kako bi proizvedeni lijekovi bili u potpunosti sigurni za primjenu kod bolesnika. Stoga je potrebno razviti za to odgovarajuću analitičku metodu. Tradicionalni razvoj metoda zasnovan je na promjeni jednog po jednog faktora ili metodi pokušaja i pogrešaka što zahtijeva puno vremena, resursa i iskusnog analitičara te je ponekad potreban naknadni razvoj, ponovljena validacija i transferiranje metode. U ovom radu primijenjeno je načelo kvalitete ugrađene u dizajn s ciljem razvoja robusne analitičke metode kojom se postižu pouzdani rezultati. Putem DryLab® programskog paketa određena je odgovarajuća kolona na kojoj je provedena analiza te odgovarajući pH mobilne faze, temperatura i vrijeme analize koji su bili najpogodniji za kvalitetno odijeljivanje analita i njegovih onečišćenja. Dobiven je i vizualni prikaz područja robusnosti metode te je lako uočeno u kojem području promjene parametara ne utječu na izvedbu metode. Takvim pristupom utrošeno je znatno manje resursa i vremena te je osigurano da je odabrana metoda robusna što je u skladu s QbD načelom.

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti novu analitičku metodu primjenom QbD pristupa za određivanje sadržaja onečišćenja fosamprenavir kalcija pomoću tehnike tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti obrnutih faza upotrebom detektora s nizom fotosenzitivnih dioda te razvijenu metodu validirati prema ICH smjernicama.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

U izradi ovog diplomskog rada korišteni su Plivini standardi (engl. *chemical reference substance*, CRS) ljekovite supstancije fosamprenavir kalcija (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API) i njegovih onečišćenja (3S)-okoslan-3-il N-[(2S,3R)-3-hidroksi-4-[N-(2-metilpropil)(4-aminobenzen)sulfonamido]-1-fenilbutan-2-il]karbamata, odnosno amprenavira i [3-amino-1-(4-amino-N-izobutilfenilsulfonamido)-4-fenilbutan-2-il dihidrogen fosfata], odnosno IMP 0,93. Acetonitril i metanol su nabavljeni od J.T.Bakera, kromatografskog su stupnja čistoće, a korištena voda je ultra visoke čistoće (Milli-Q Integral Purification System, Merck). Amonij acetat (NH<sub>4</sub>Ac) i EDTA-Na<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O nabavljeni su od Kemike.

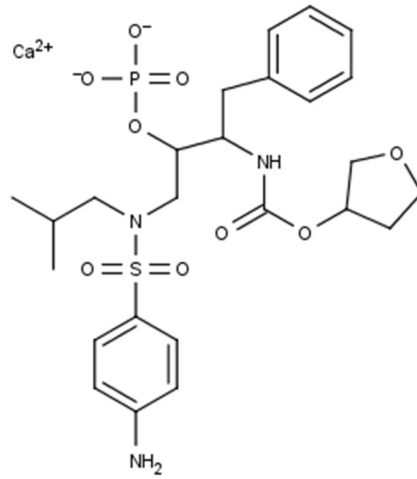
#### **3.2. Radni instrumenti**

Ispitivanja su provedena na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti Agilent 1290 Infinity II Systems (Agilent Technologies, SAD) koji se sastoji od binarne pumpe Agilent 1290 Infinity II Binary Pump, automatskog dodavača uzorka Agilent 1290 Infinity II High Performance Multisampler, grijača automatskog dodavača uzorka Agilent 1290 Infinity II Autosampler Thermostat, grijača odjeljka za kolonu Agilent 1290 Therm. Column Compartment i detektora Agilent 1290 Infinity II Diode Array Detector. Kao sredstvo za ispiranje brtvi (engl. *seal wash*) korišten je 10% izopropanol. Sredstvo za ispiranje igle iznutra (engl. *purge solvent*) i sredstvo za ispiranje igle izvana (engl. *wash solvent*) korištena je smjesa metanola i vode u volumnom omjeru 50:50. Svi kromatogrami procesirani su u programskom paketu Empower (Waters, Velika Britanija). Uzorci su vagani na vagama DeltaRange XPE205DR/M i Excellence Plus XS2002S/M proizvođača Mettler Toledo. Otapani su na kupelji Ultrasonic bath Sonorex proizvođača Bandelin. A pH mobilne faze određen je na pH metru InLab Expert Pro-ISM proizvođača Mettler Toledo.

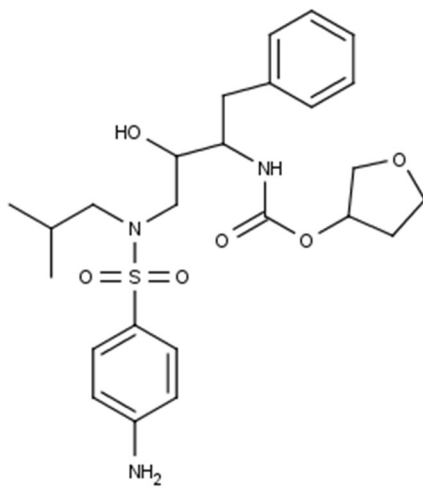
#### **3.3. Metode**

##### **3.3.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja fosamprenavira**

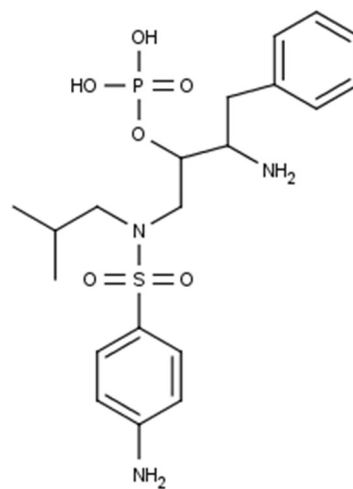
U programskom paketu Marvin Beans (ChemAxon, Mađarska) nacrtane su kemijske strukture onečišćenja i aktivne tvari fosamprenavir kalcija (Slika 12.-14.) kako bi program dao uvid u optimalni pH pufera za odjeljivanje sastavnica. Putem strukture moguće je izračunati koeficijent distribucije (logD) i pKa analita koje program onda prikazuje u numeričkom i grafičkom obliku.



Slika 12. Fosamprenavir kalcij



Slika 13. Amprenavir



Slika 14. IMP 0,93

### **3.3.2. Priprema otopine pufera i diluenta za UHPLC analizu**

U UHPLC analizi kao mobilna faza korišteni su pufer i acetonitril. Otopina pufera bila je 5 mM otopina amonijevog acetata pH 4 s dodanom soli EDTA- $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ . Odvagano je 0,39 g amonijevog acetata i 1 g EDTA- $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  u 1000 mL pročišćene vode. Vrijednost pH je pomoću razrijeđene octene kiseline i amonijaka prilagođena na 4.

Za pripremu diluenta korišteni su pročišćena voda i metanol u omjeru 50:50.

### **3.3.3. Priprema otopina za ispitivanje relativnog odaziva detektora**

Faktor relativnog odaziva detektora (engl. *relative detector response factor*, RRF) izražava osjetljivost detektora za određenu tvar u odnosu na poredbenu tvar, odnosno kod metode koja se razvija u ovom diplomskom radu predstavlja osjetljivost detektora za onečišćenje u odnosu na djelatnu tvar uzete u istoj količini. U svrhu određivanja relativnog odaziva detektora pripremljena je temeljna otopina (engl. *stock solution*) standarda fosamprenavir kalcija te temeljne otopine onečišćenja amprenavira i IMP 0,93 u koncentraciji 0,05 mg/mL. Razrjeđenjem temeljne otopine pripremljene su tri otopine, jedna s fosamprenavir kalcijem, druga s amprenavirom i treća s IMP 0,93, sve u koncentracijama 0,0005 mg/mL koje su zatim injektirane šest puta. Faktor odaziva detektora onečišćenja podijeljen je s faktorom odaziva detektora API-ja i dobiven je relativni odaziv detektora. Njegova vrijednost mora biti 0,8 - 1,20. Ukoliko odstupa potrebna je korekcija rezultata.

### **3.3.4. Priprema otopina standarda**

Za svaku analizu pripremljene su temeljne otopine standarda. Pripremljene su na način da je izvagano po 2,5 mg fosamprenavir kalcija, IMP 0,93 i amprenavira u tikvicu od 50 mL koja je do dvije trećine napunjena diluentom. Zatim je otopina stavljena na ultrazvučnu kupelj do otapanja uzorka. Tikvica je napunjena diluentom do oznake i promućkana. Otopina koncentracije na razini specifikacije (0,05%) dobiva se tako da se 0,5 mL pripremljene temeljne otopine razrijedi u 50 mL diluenta.

### 3.3.5. DryLab® analiza

S ciljem određivanja najkraće i najučinkovitije metode za određivanje onečišćenja fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93, kao i za ispitivanje robusnosti metode korišten je programski paket DryLab® (Molnar-institute, Njemačka).

Analize, sveukupno njih dvanaest, u kojima su kombinirani različiti eksperimentalni uvjeti (pH, temperatura kolone i gradijent) prikazani Tablicom 3., provedene su na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti na tri različite kolone: Agilent, Zorbax SB-Phenyl RRHD 1.8  $\mu\text{m}$  2,1 x 50 mm, Agilent, Zorbax EclipsePlus C18 RRHD 1,8  $\mu\text{m}$  2,1 x 50 mm, Acquity UPLC CSH C18 1,7  $\mu\text{m}$  MVK 2,1 x 50 mm. Nakon provedenih analiza dobiveni kromatogrami su integrirani koristeći Empower računalni program, te uneseni u DryLab® gdje su dalje obrađivani. Kao rezultat obrade podataka dobiven je računalni model koji opisuje odabrani sustav i promjene u funkciji vremena elucije, temperature i pH te optimalna i najrobusnija metoda i kolona za analizu fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja.

Tablica 3. Eksperimentalni uvjeti provedenih analiza

<b>Mobilna faza A</b>	5mM amonij acetat pH 3/5/7		
<b>Mobilna faza B</b>	acetonitril		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme (min)	Eluens A (%)	Eluens B (%)
	0	95	5
	3,00/9,00	5	95
	3,01/9,01	95	5
	5,00/11,00	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,5 mL/min		
<b>Detektor</b>	265 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30°C/60°C		
<b>Masena koncentracija uzorka (FOS-Ca<sup>2+</sup>, Amprenavir, IMP 0,93)</b>	0,5 mg/mL		

### 3.3.6. Priprema otopina za validaciju metode

#### Selektivnost

Svi relevantni kromatogrami su vizualno provjereni da nema interferencija između pikova, a selektivnost se utvrđuje kromatografskom analizom diluenta te otopine standarda i otopine uzorka fosamprenavir kalcija masene koncentracije 1 mg/mL necijepljene i cijepljene otopinama onečišćenja (amprenavira i IMP 0,93) masene koncentracije 0,0005 mg/mL.

#### Granica dokazivanja

Iz temeljne otopine fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93 koncentracije 0,05 mg/mL pripreme se otopine koncentracije 0,0001 mg/mL (0,01%) tako da se 2 mL 0,05% otopine razrijedi u 10 mL diluenta. Otopina se injektira tri puta.

#### Granica određivanja

Iz temeljne otopine fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93 koncentracije 0,05 mg/ml pripreme se otopine koncentracije 0,0002 mg/mL (0,02%) tako da se 5 mL 0,05% otopine razrijedi u 10 mL diluenta. Otopina se injektira šest puta.

#### Radno područje

Kao radno područje izabran je raspon između najniže i najviše koncentracije koje pokazuju preciznost, linearnost i točnost. Za definiranje radnog područja metode koriste se podaci dobiveni kod određivanja linearnosti, točnosti i preciznosti metode.

#### Linearnost

Studija linearnosti provedena je sa standardom glavne aktivne komponente fosamprenavir kalcija i s komercijalno dostupnim standardima poznatih onečišćenja, amprenavira i IMP 0,93. Razrjeđenjem temeljnih otopina standarda fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93 koncentracije 0,05 mg/mL pripremaju se otopine sljedećih koncentracija: 0,0002 mg/mL (0,02%), 0,0003 mg/mL (0,03%), 0,0005 mg/mL (0,05%), 0,00075 mg/mL (0,075%), 0,0010 mg/mL (0,1%), 0,0030 (0,3%), 0,0050 mg/mL (0,5%), 0,0075 mg/mL (0,75%), što je detaljnije prikazano u Tablici 4. Svaka otopina injektira se jednom. Nakon analize unosom dobivenih podataka prikaže se regresijski pravac te jednadžba pravca (nagib i odsječak pravca).

**Tablica 4. Priprema otopina fosamprenavir kalcija i poznatih onečišćenja za studiju linearnosti**

Otopina	Konačna masena koncentracija/ mg mL <sup>-1</sup>	Koncentracijski nivo / %	Volumen pipetiranja / mL	Odmjerna tikvca / mL
L1	0,0002	0,02	0,02	5
L2	0,0003	0,03	0,03	5
L3	0,0005	0,05	0,05	5
L4	0,00075	0,075	0,075	5
L5	0,0010	0,1	0,1	5
L6	0,0030	0,3	0,3	5
L7	0,0050	0,5	0,5	5
L8	0,0075	0,75	0,75	5

#### Točnost

Validacijski parametar točnosti metode čine parametri odstupanje od linearnosti (engl. *deviation from linearity*) te analitički prinos (engl. *recovery*). Otopine koncentracije 0,0002 mg/ml (0,02%), 0,0005 mg/ml (0,05%) i 0,0075 mg/ml (0,75%) pripravljene su razrjeđenjem temeljnih otopina fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93 koncentracije 0,05 mg/mL. Svaka otopina se injektira tri puta i gleda se devijacija od linearnosti.

Iz temeljne otopine amprenavira i IMP 0,93 koncentracije 0,05 mg/mL pripreme se razrijeđene otopine koncentracija 0,0003 mg/mL, 0,0005 mg/mL i 0,0075 mg/mL. Svakom pripremljenom otopinom posebno se cijepi prethodno odvagani uzorci standarda fosamprenavir kalcija tako da njegova koncentracija bude 1 mg/mL. Svaka cijepljena otopina injektira se tri puta i računa se analitički prinos.

#### Preciznost

Za ispitivanje ponovljivosti sustava iz temeljnih otopina standarda fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93 koncentracije 0,05 mg/mL pripremaju se razrijeđene otopine koncentracija 0,0003 mg/mL, 0,0005 mg/mL i 0,0075 mg/mL. Svaka razrijeđena otopina priprema se iz zasebne temeljne otopine. Svaka razrijeđena otopina injektira se tri puta.

Za ispitivanje ponovljivosti metode priprema se šest otopina uzorka fosamprenavir kalcija koje sadrže bar jedno onečišćenje u koncentraciji većoj od granice dokazivanja. Kako nije bio dostupan uzorak koji sadrži onečišćenja u propisanoj granici, pripravljene su otopine



standarda fosamprenavir kalcija koncentracije 1 mg/ml cijepljene otopinom onečišćenja koncentracije 0,0005 mg/ml, odnosno odvaži se 5 mg uzorka koji se onda u tikvici od 5 mL nadopuni do oznake otopinom za cijepljenje. Svaka otopina injektira se jednom.

Za ispitivanje srednje preciznosti priprema se po šest otopina amprenavira i IMP 0,93 u koncentraciji 0,0005 mg/mL kojima se onda cijepi uzorak fosamprenavir kalcija tako da njegova koncentracija iznosi 1 mg/mL, odnosno odvaži se 5 mg uzorka koji se onda u tikvici od 5 mL nadopuni do oznake otopinom za cijepljenje. Svaka otopina injektira se jednom. Ovaj postupak provode dva različita analitičara, na dvije različite kolone i instrumenta s razlikom jedan dan.

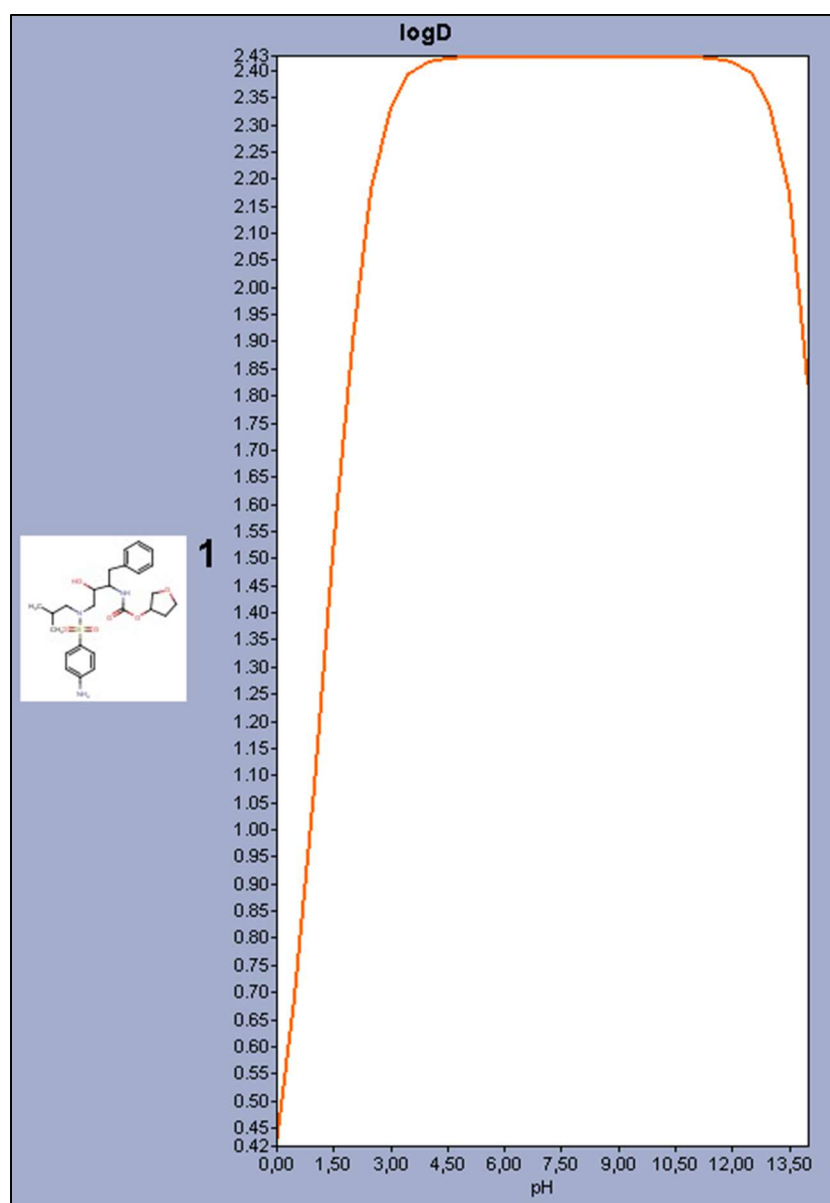
### Stabilnost

Ispitivanje stabilnosti otopina provodi se pripremanjem otopina standarda i uzorka fosamprenavir kalcija u koncentraciji 0,0005 mg/mL koje potom stoje dva tjedna na sobnoj temperaturi u bezbojnim tikvicama, te pripremanjem svježih otopina standarda fosamprenavir kalcija, također u koncentraciji 0,0005 mg/mL. Ukoliko nije došlo do razgradnje uzorka odnosno nisu prisutna onečišćenja iznad granice detekcije, otopine se cijepe otopinom onečišćenja, amprenavira i IMP 0,93 koncentracije 0,0005 mg/mL te se potom analiziraju.

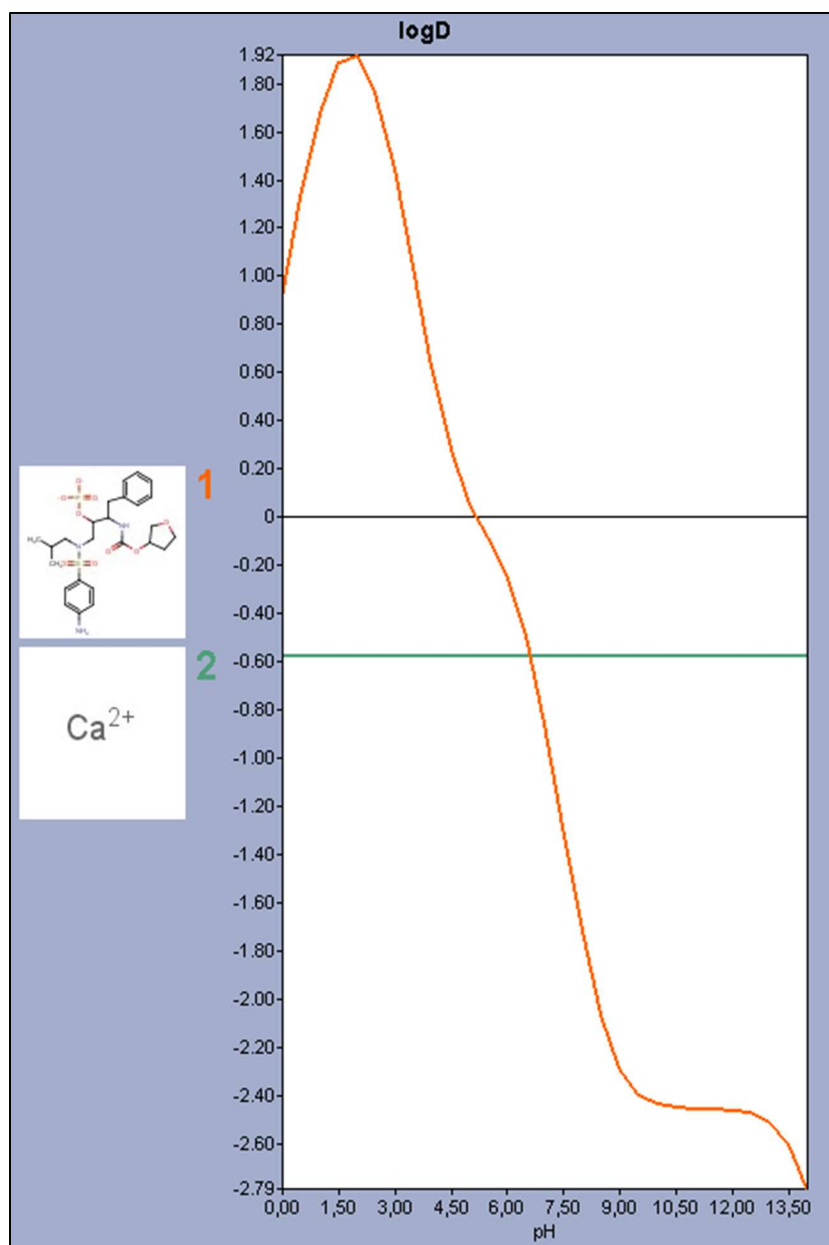
## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja fosamprenavira**

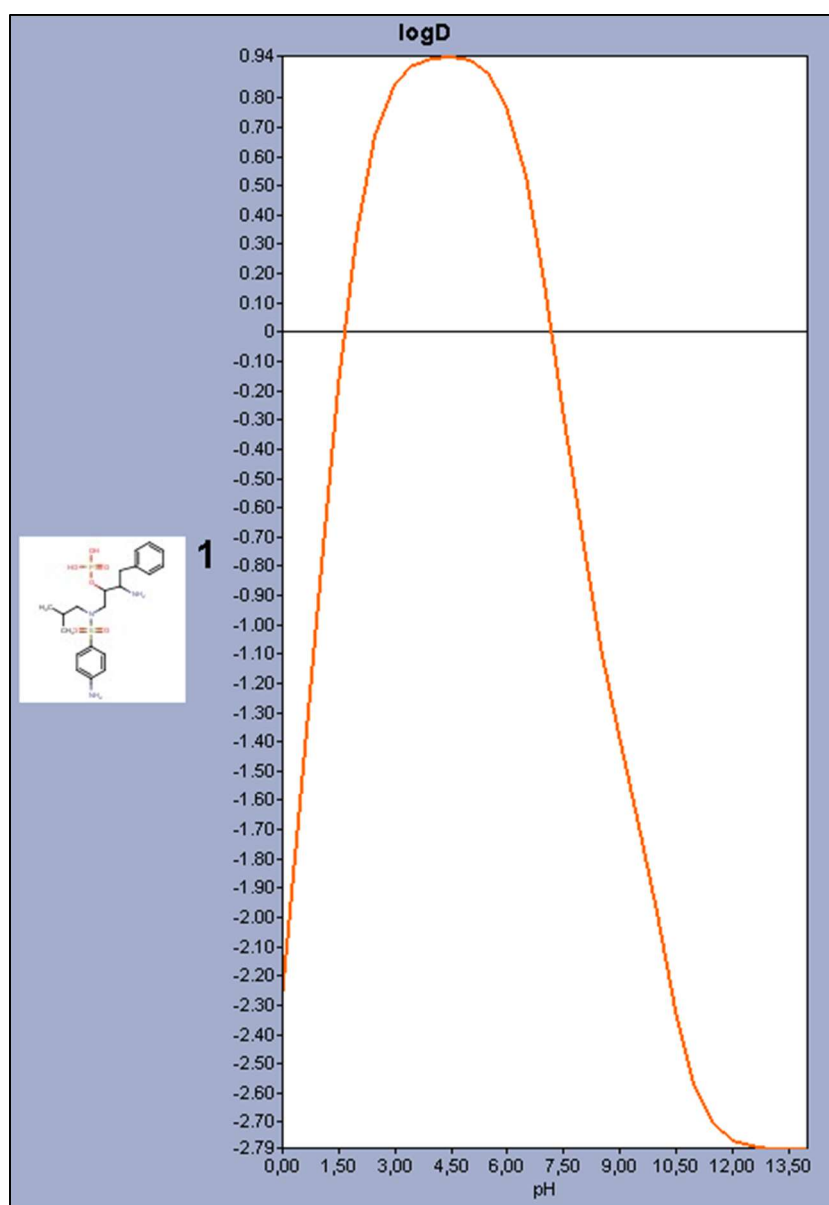
Kako bi se mogle odrediti prikladne vrijednosti pH mobilne faze A, preko ChemAxon računalne platforme utvrđena je ovisnost koeficijenta distribucije ( $\log D$ ) fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja (Slika 15.-18.) o pH. Sastavnice uzorka moguće je odijeliti u različitom rasponu pH. Za ravna područja pozitivne vrijednosti  $\log D$  očekuju se stabilna vremena zadržavanja u funkciji pH. Za fosamprenavir kalcij to je  $\text{pH} = 3$ , za amprenavir  $\text{pH} = 5 - 12$ , a za IMP 0,93  $\text{pH} = 4,5 - 6,5$ . Budući da su te vrijednosti za promatrane analite vrlo različite, moralo se eksperimentalno utvrditi koji pH će dati stabilna vremena zadržavanja. Vrijednosti  $\text{pK}_a$  fosamprenavir kalcija prikazane su na Slici 18. Iz slike se vidi da bi najbolje odjeljivanje bilo u lužnatom pH (8-12) jer se ne preporuča odabrati pH vrijednost u rasponu za jedinicu manje ili više od predviđenog  $\text{pK}_a$  analita. Međutim, takvi uvjeti nisu povoljni za kolonu jer dolazi do otapanja silikagela. Zbog toga su izabrane vrijednosti pH mobilne faze A za DryLab® računalni program 3, 5, i 7 te je nakon provedenih analiza kao najprikladnija izabrana pH vrijednost 4. Za pufer je odabran 5 mmol/L amonij acetat s  $\text{pK}_a$  vrijednošću 4,76.



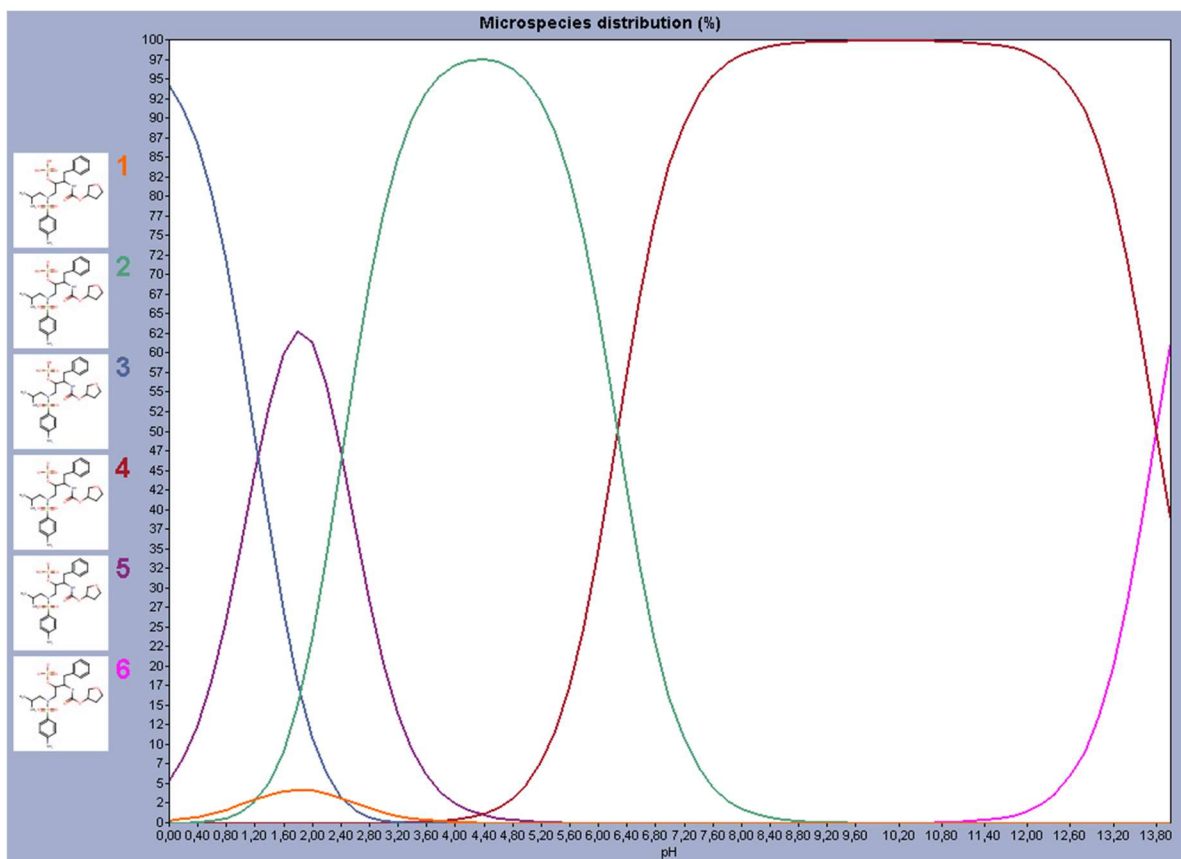
Slika 15. logD-pH amprenavir



Slika 16. logD-pH fosamprenavir kalcij



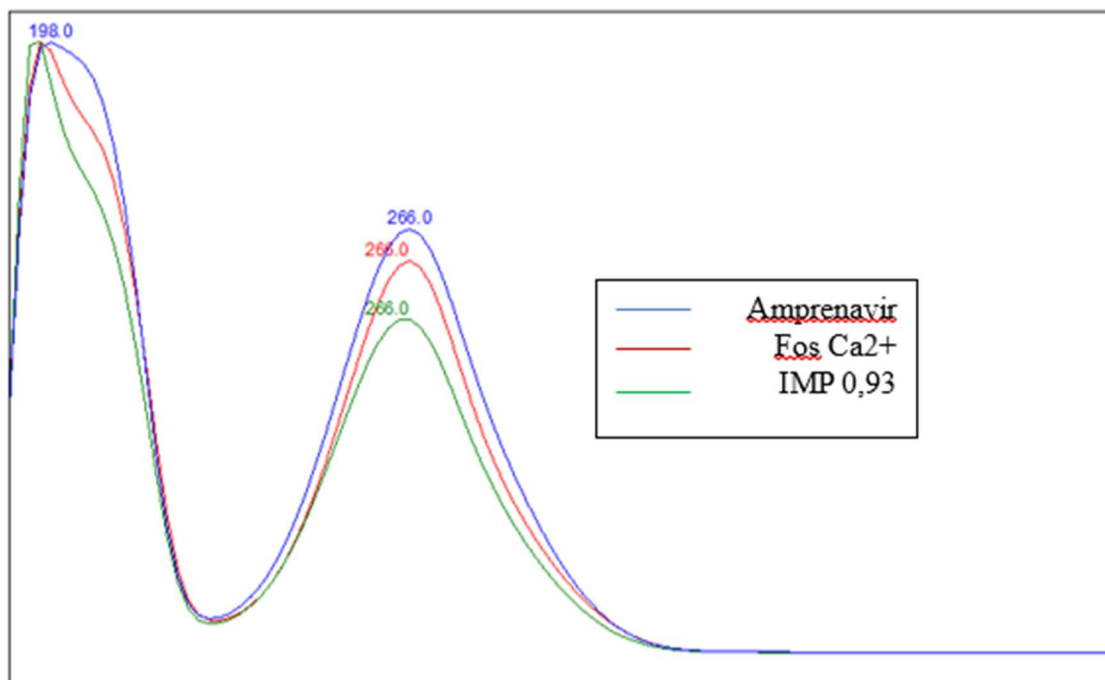
Slika 17.  $\log D$ -pH IMP 0,93



Slika 18. Predvideni pKa fosamprenavir kalcija

## 4.2. Određivanje valne duljine detekcije

Iz snimljenih UV spektara fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja, amprenavira i IMP 0,93 (Slika 19.) odabrana je valna duljina detekcije, odnosno valna duljina pri kojoj sve sastavnice najbolje apsorbiraju UV zračenje i mogu se najlakše detektirati. Odabrana vrijednost valne duljine detekcije je 265 nm.



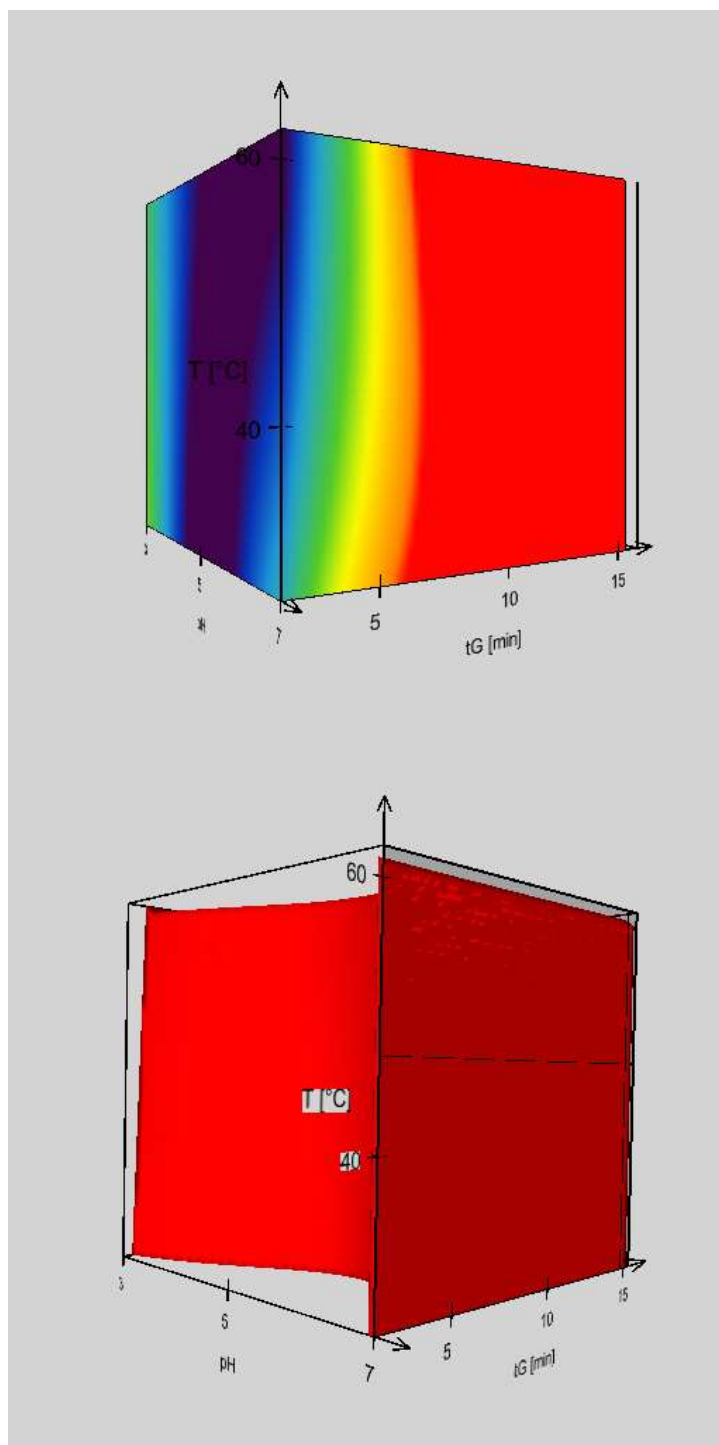
Slika 19. Preklopljeni UV spektri fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93

### 4.3. DryLab® analiza

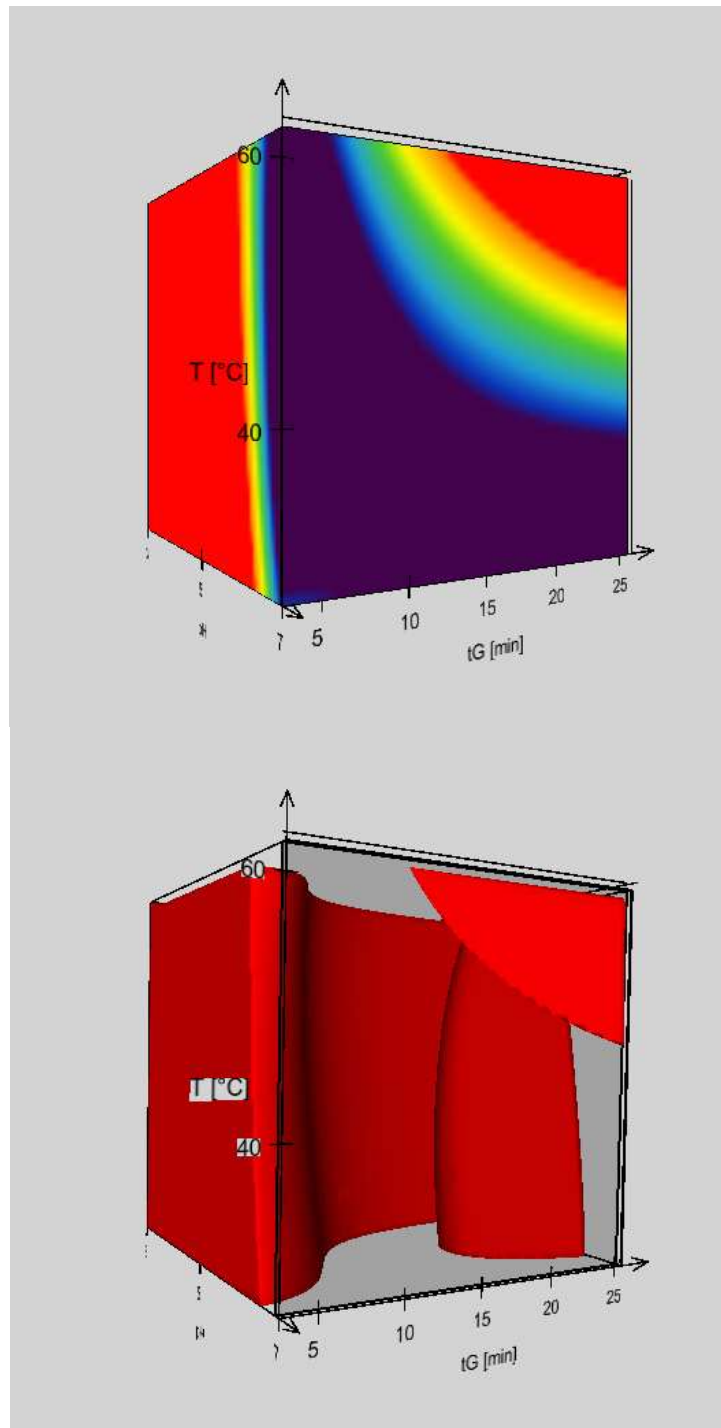
U ovom radu cilj je bio razviti što bržu i robusniju UHPLC metodu za određivanje fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja. Pregledom prethodnih radova vezanih za razvoj i validaciju metode za određivanje fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja utvrđeno je da su odabrane metode zahtijevale relativno dugo gradijentno vrijeme. Razlog tomu je što je razvoj tih metoda proveden na HPLC uređaju koji ima veće čestice stacionarne faze nego UHPLC uređaj. Kako je prethodno objašnjeno u potpoglavlju 1.2.2., manja veličina čestica stacionarne faze skraćuje vrijeme trajanja analize uz ostale navedene prednosti, kao što su povećanje osjetljivosti i razlučivanja. Nadalje, da bi se skratilo potrebno vrijeme samog razvoja metode prethodno spomenutim tradicionalnim načinom "pokušaja i pogreške", korišten je DryLab® računalni program. Primjena efikasnijeg uređaja i programa za razvoj metode usklađuje korišteni pristup s QbD načelima (opisanima u poglavlju 1.3.).

Kao kritični parametri odjeljivanja definirani su stacionarna faza, gradijentno vrijeme, temperatura kolone i pH mobilne faze A. U tu svrhu provedeno je dvanaest eksperimenata na tri različite stacionarne faze (prethodno opisane u potpoglavlju 3.3.5.). Rezultati tih analiza uvedeni su u DryLab® softver te su modeli uspješno potvrđeni programskom usporedbom provedenih i predviđenih eksperimenata. Programski su kreirane rezolucijske mape i 3D rezolucijske kocke (Slika 20.-22.). Rezolucijski modeli prikazuju visoku vrijednost razlučivanja crvenom bojom ( $R_s > 2$ ), a niske vrijednosti razlučivanja i preklapanje pikova plavom bojom ( $R_s = 0$ ). Na x, y i z osima nalaze se gradijentno vrijeme ( $t_G$ ), temperatura kolone (T) i pH vrijednost mobilne faze A (pH). Tamnocrvena područja koja ispunjavaju određene dijelove kocke (Slika 20. -22.) prikazuju višedimenzionalni robusni prostor dobiven na tri različite stacionarne faze. On predstavlja dizajn u prostoru definiran QbD načelima i u tom području promjena kritičnih procesnih parametara ne mijenja značajno kritične značajke kvalitete.

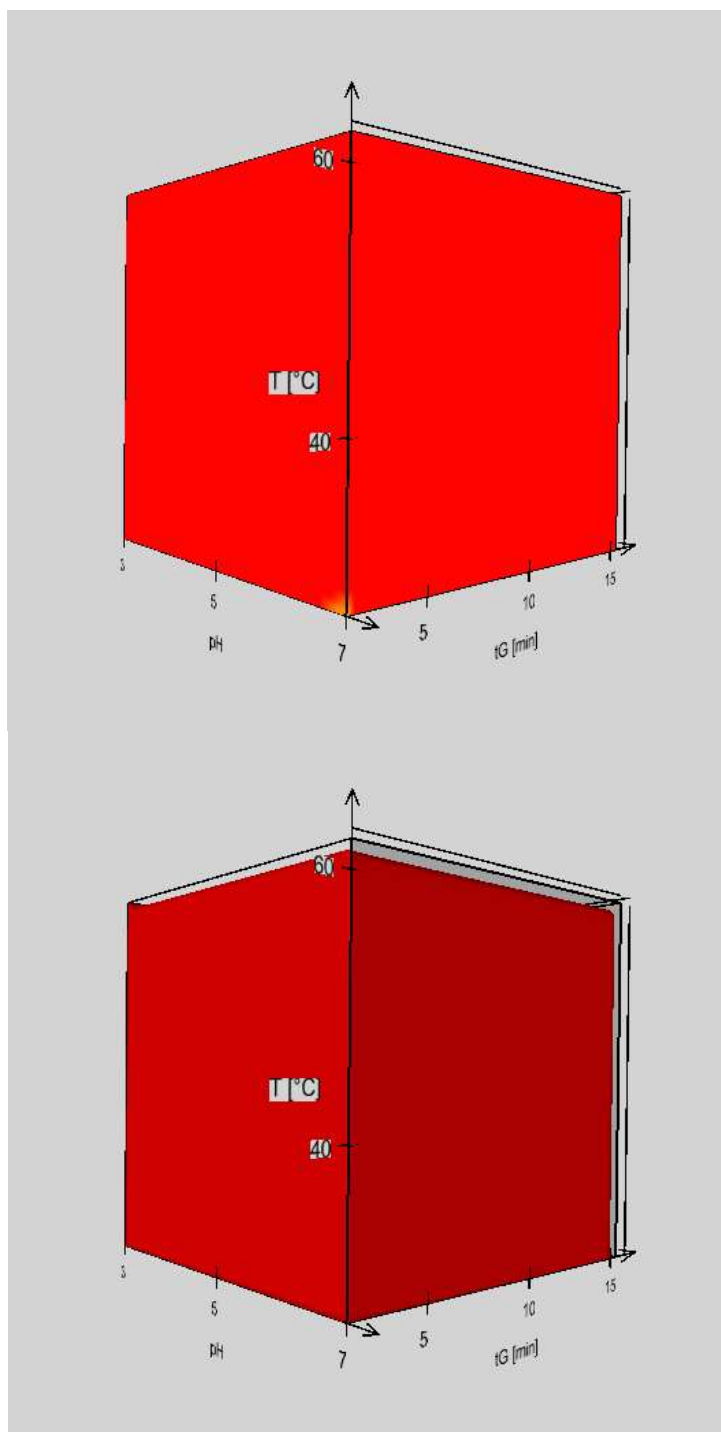




Slika 20. 3D rezolucijska kocka i robusno područje dobiveno na koloni CSH C18



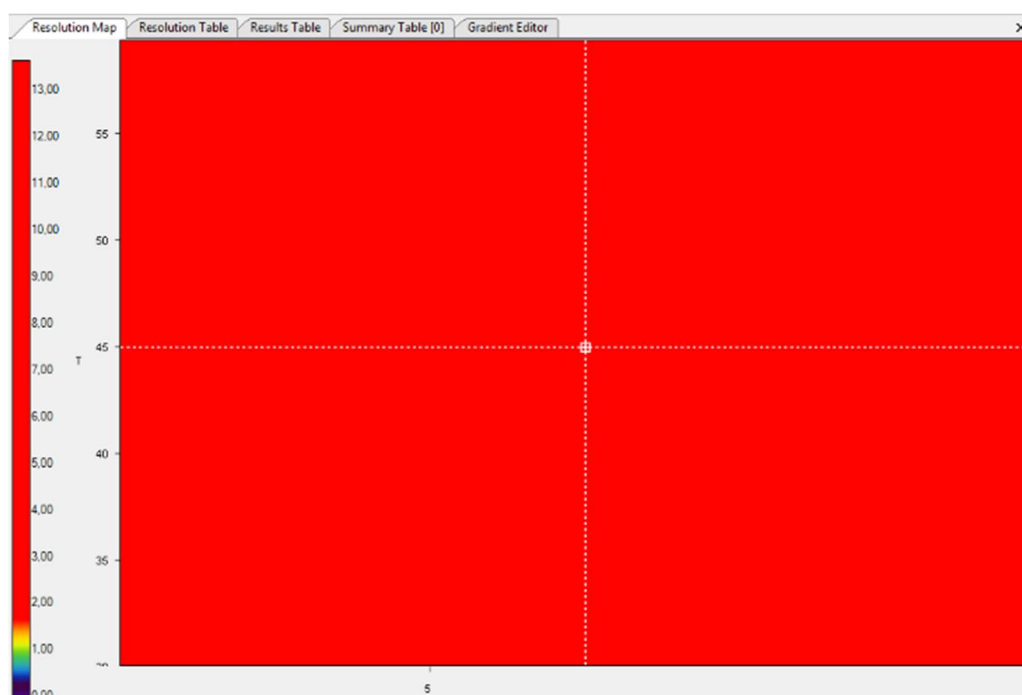
Slika 21. 3D rezolucijska kocka i robusno područje dobiveni na koloni SB-Phenyl



**Slika 22. 3D rezolucijska kocka i robusno područje dobiveni na koloni Eclipse Plus C18**

Na Eclipse Plus C18 koloni je za sve analite postignuto potpuno razdvajanje pikova u svakom od dvanaest eksperimenata. Tijekom eksperimenata redoslijed eluiranja pikova bio je jednak te nije došlo do koeluiranja pikova. Na CSH C18 koloni pri pH 5 i 7 dolazi do koeluiranja pikova fosamprenavir kalcija i IMP 0,93 neovisno o temperaturi te pri gradijntnom vremenu 3 minute nije postignuto zadovoljavajuće razlučivanje između pikova fosamprenavir kalcija i IMP 0,93. Na koloni SB-Phenyl zadovoljavajuće razlučivanje pikova postignuto je jedino pri temperaturi od 60°C i gradijntnom vremenu 15 minuta te pri pH vrijednosti nižoj od 6. U ostalim uvjetima dolazi do koeluiranja pikova fosamprenavira i IMP 0,93 ili nije postignuto zadovoljavajuće razlučivanje navedenih pikova. Za eksperiment je na temelju navedenih podataka, odabrana kolona Eclipse Plus C18 zbog širokog područja robusnosti i zadovoljavajućeg razlučivanja pikova pri nižem gradijntnom vremenu (3 minute). Takav odabir kolone u skladu je s ciljem ovog rada, odnosno s razvojem robusne i brze UHPLC metode.

Nakon odabira modela slijedi njegova potvrda. Ona podrazumijeva usporedbu *in silico* i eksperimentalno dobivenih rezultata, odnosno vremena zadržavanja pikova. Kao optimalna točka za verifikaciju odabrano je gradijntno vrijeme 6 min, temperatura kolone 45°C i pH 3 (Slika 23.). Nakon provedene analize uspoređena su vremena zadržavanja pikova dobivena eksperimentalno i *in silico*. Između njihovih vrijednosti utvrđeno je odgovarajuće slaganje te je time model uspješno verificiran.



Slika 23. Odabrana točka za potvrda modela eksperimentom

U konačnici slijedi odabir radne točke s gradijentnim vremenom 3 minute, temperaturom kolone 50°C i pH 4 (detaljnije prikazano u Tablici 5.). Kako bi model bio potvrđen, bilo je potrebno provesti eksperiment pri odabranim radnim uvjetima. Ponovnom usporedbom vremena zadržavanja pikova dobivenih eksperimentalno i *in silico* model je uspješno verificiran.

**Tablica 5. Odabrani kromatografski parametri za Eclipse Plus C18 kolonu**

<b>Mobilna faza A</b>	5 mM amonij acetat pH 4		
<b>Mobilna faza B</b>	acetonitril		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme (min)	Eluens A (%)	Eluens B (%)
	0	95	5
	3,00	5	95
	3,01	95	5
	5,00	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 µL		
<b>Protok</b>	0,5 mL/min		
<b>Detektor</b>	265 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50°C		

#### 4.4. Validacija UHPLC metode

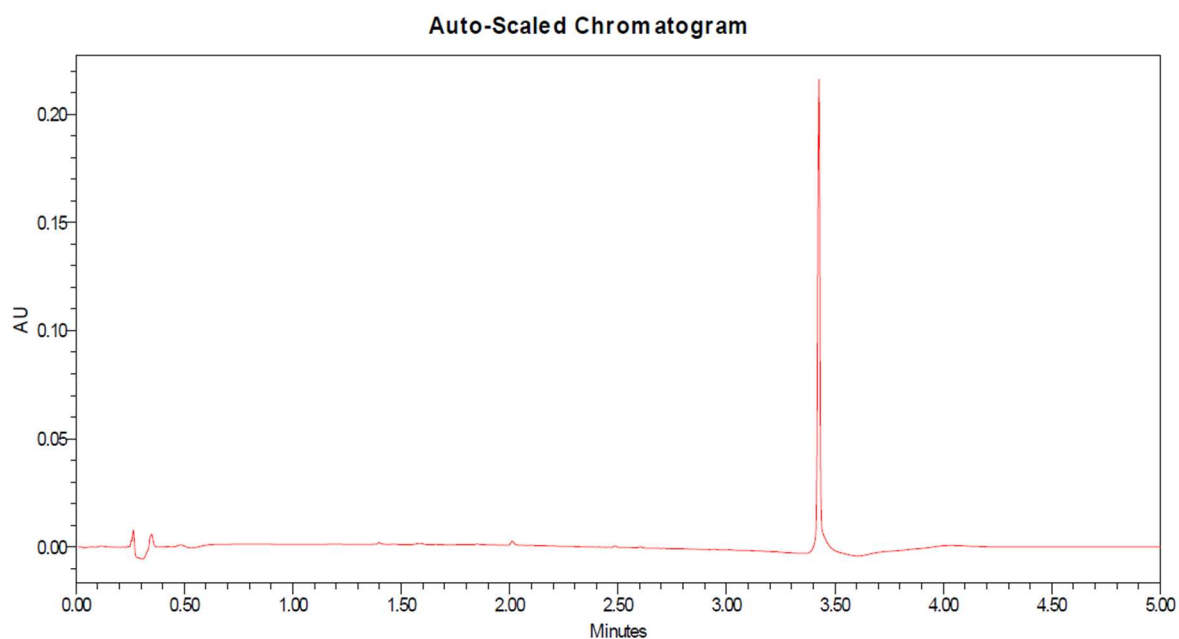
Razvijena UHPLC metoda za određivanje onečišćenja fosamprenavir kalcija validirana je sukladno ICH smjernicama o validaciji metode. U ovom radu potvrđeni su sljedeći validacijski parametri: selektivnost, linearnost, granice određivanja i dokazivanja, točnost, preciznost i stabilnost ispitivane otopine. Kriteriji prihvatljivosti prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Kriteriji prihvatljivosti za parametre validacije kromatografske metode

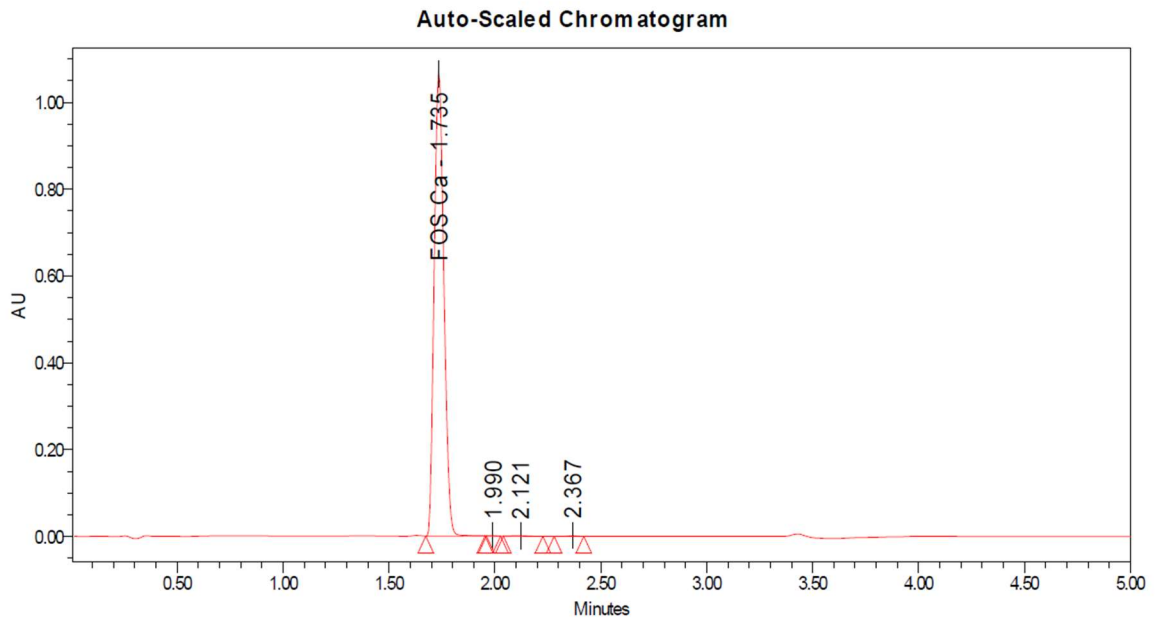
parametar validacije	kriterij prihvatljivosti
<b>linearnost</b>	
koeficijent korelacije	$\geq 0,990$
<b>granica detekcije</b>	
S/N	$> 3$
<b>granica kvatifikacije</b>	
S/N	$> 10$
prosječno odstupanje	$\leq 20 \%$
RSD površine pika	$\leq 15 \%$
<b>točnost</b>	
analitički prinos	
0,03 %	70 – 130 %
0,05 i 0,75 %	80 – 120 %
RSD	
0,01 – 0,05 %	$\leq 15 \%$
0,05 – 0,20 %	$\leq 10 \%$
devijacija od linearnosti	
0,02 %	$\leq 30 \%$
0,05 i 0,75 %	$\leq 20 \%$
<b>preciznost</b>	
ponovljivost sustava	
RSD	
0,01- 0,05 %	$\leq 15 \%$
0,05 – 0,20 %	$\leq 10 \%$
ponovljivost metode	
RSD	$\leq 10 \%$
srednja preciznost	
RSD	$\leq 10 \%$
<b>stabilnost</b>	
razlika u sadržaju onečišćenja	$\leq 20 \%$

#### 4.4.1. Selektivnost

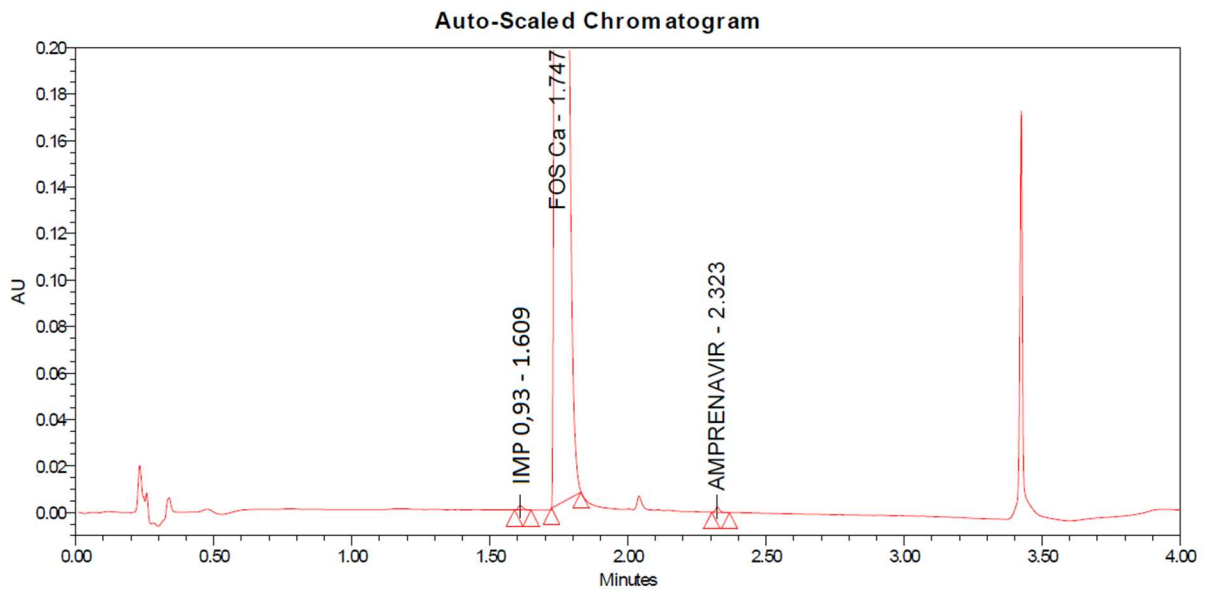
Selektivnost je parametar koji potvrđuje da razvijenom metodom možemo odrediti i razlikovati jedno onečišćenje od drugog onečišćenja i glavne tvari. Utvrđen je usporedbom snimljenih kromatograma slijepe probe (diluenta), otopine standarda fosamprenavir kalcija (cijepljene i necijepljene njegovim onečišćenjima, amprenavirom i IMP 0,93) te cijepljene i necijepljene otopine uzorka fosamprenavir kalcija. Kromatogrami navedenih otopina prikazani su Slikama 24. – 28. Pikovi su dobro odijeljeni i nema interferirajućih pikova.



**Slika 24. Kromatogram slijepe probe (diluenta)**

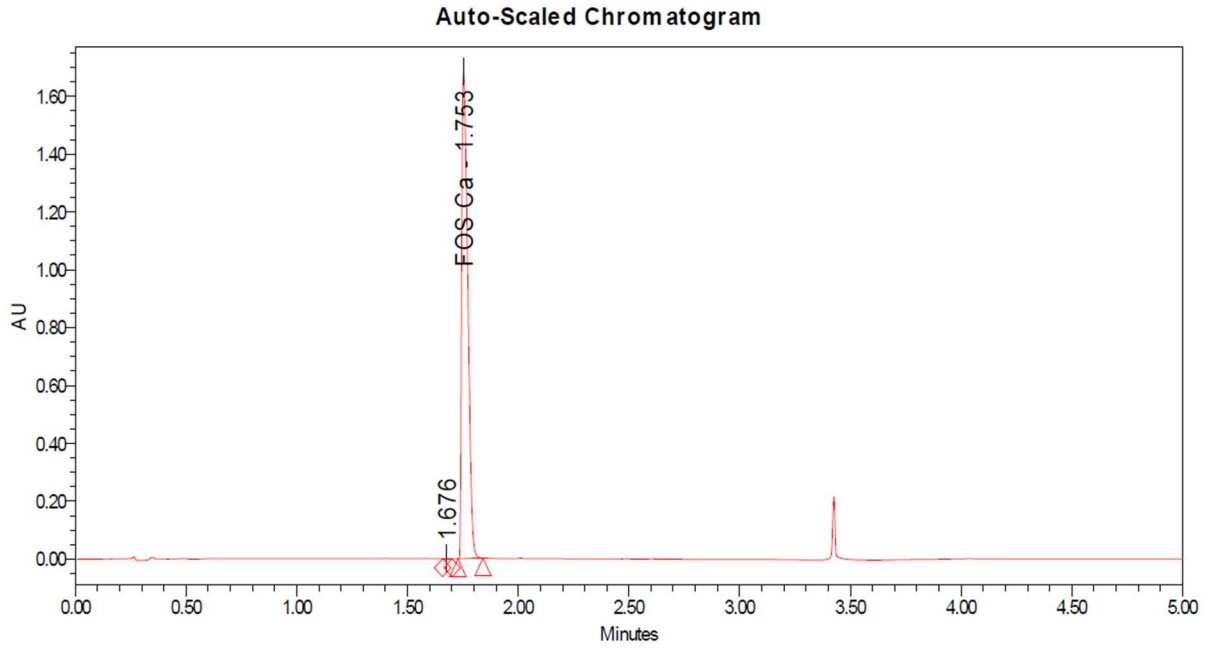


Slika 25. Kromatogram necijepljene otopine standarda fosamprenavir kalcija

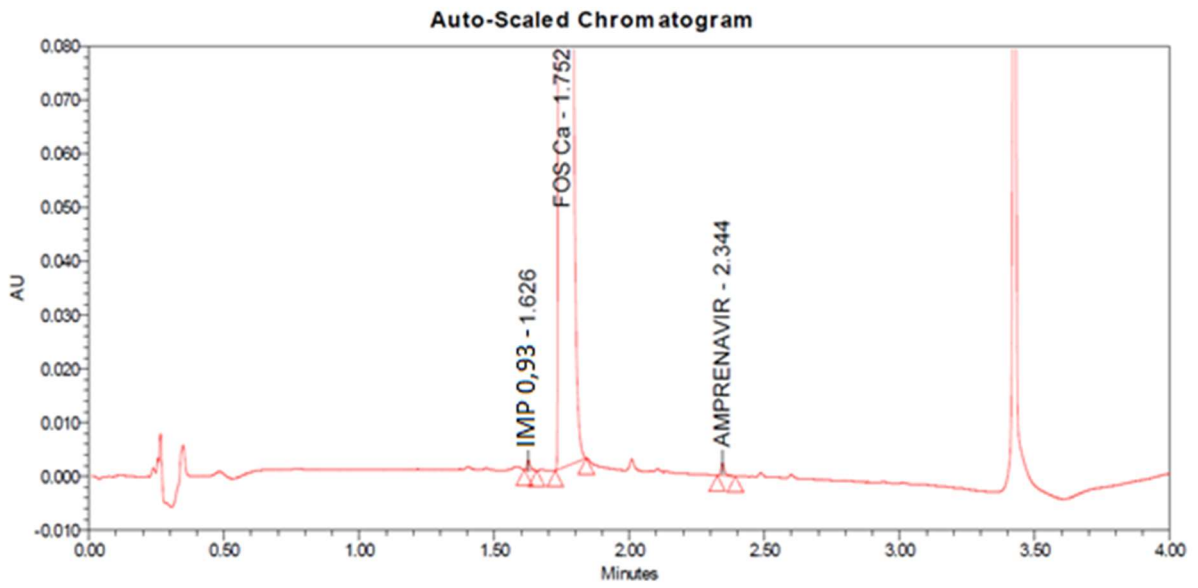


Slika 26. Kromatogram otopinom onečišćenja cijepljene otopine standarda fosamprenavir kalcija





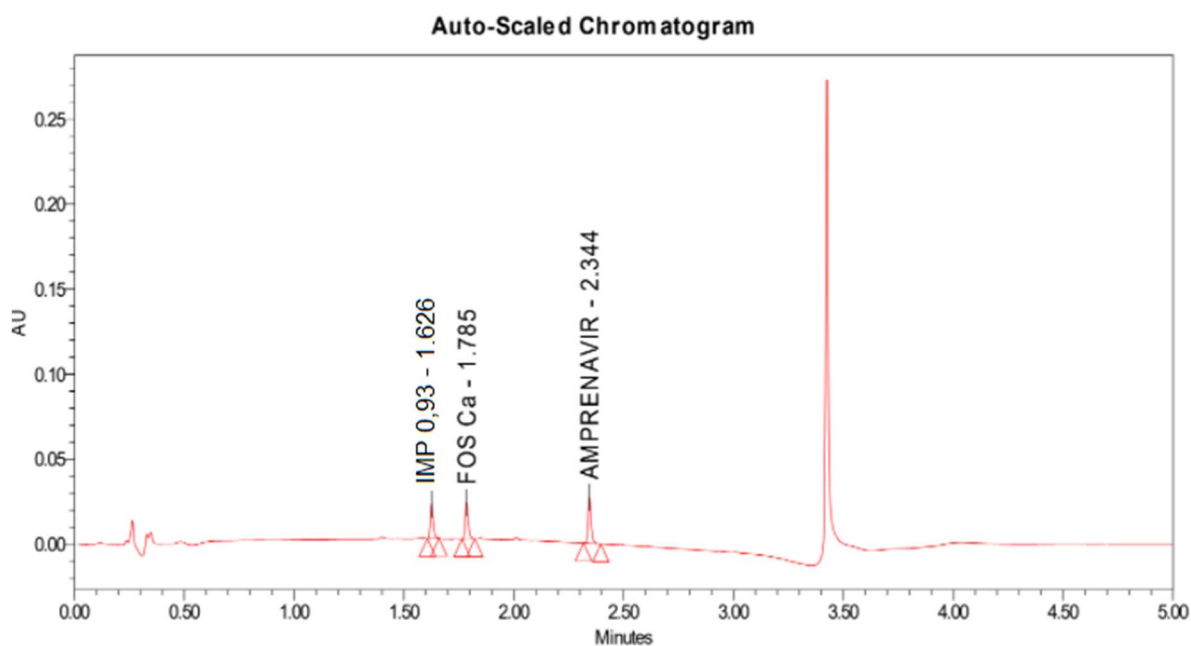
Slika 27 Kromatogram necijepljene otopine uzorka fosamprwnavir kalcija



Slika 28. Kromatogram otopinom onečišćenja cijepljene otopine uzorka fosamprenavir kalcija

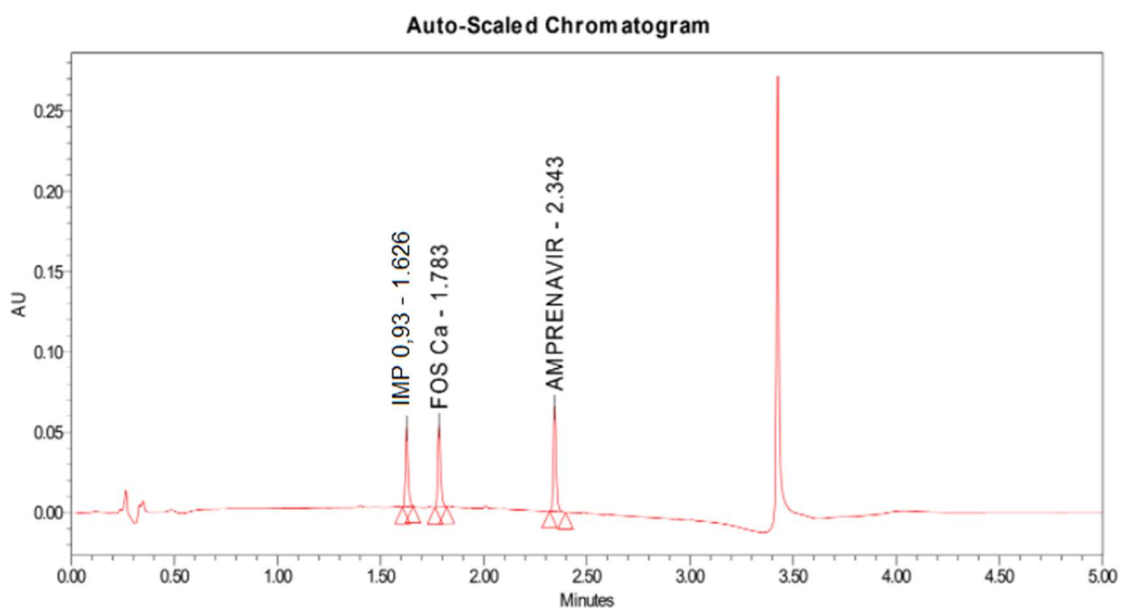
#### 4.4.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

Da bi se ispitala koja je najniža koncentracija analita koja se može detektirati i kvantificirati, analiziran je niz otopina standarda fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja (amprenavira i IMP 0,93) vrlo niskih koncentracija. Otopina masene koncentracije 0,0001 mg/mL (0,01 % radne koncentracije uzorka) rezultirala je omjerom signala kromatografskog pika i šuma većim od 3, te je odabrana kao granica detekcije (prikazana na Slici 29.). Sve komponente prisutne u uzorku u postotku manjem od 0,01 % neće biti detektirane ovom metodom.



**Slika 29. Kromatogram otopine za određivanje granice detekcije, otopina standarda fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja masene koncentracije 0,0001 mg/mL (0,01 % radne koncentracije uzorka)**

Nadalje, otopine masene koncentracije 0,0002 mg/mL (0,02 % radne koncentracije uzorka) rezultirala je omjerom signala kromatografskog pika i šuma većim od 10, te je odabrana kao granica kvantifikacije (prikazana na Slici 30.). Sve komponente prisutne u uzorku u postotku većem od 0,02 % mogu se kvantitativno odrediti koristeći opisanu metodu. Granica kvantifikacije dodatno je potvrđena validacijom točnosti i linearnosti.



**Slika 30. Kromatogram otopine za određivanje granice kvantifikacije, otopina standarda fosamprenavir kalcija i njegovih onečišćenja masene koncentracije 0,0002 mg/mL (0,02% radne koncentracije uzorka)**

Kao dodatni kriterij za ispitivanje granice određivanja izračunate su relativna standardna devijacija površine pikova i točnost za šest injektiranja prikazani Tablicama 7 - 9.

**Tablica 7. Točnost i relativno standardno odstupanje za utvrđivanje granice kvatifikacije za amprenavir**

Otopina	Površina pika	Točnost / %
QL1	1361	90,24
QL2	1398	93,14
QL3	1390	92,52
QL4	1420	94,87
QL5	1388	92,36
QL6	1394	92,83
<b>Srednja vrijednost</b>	1391,83	92,7
<b>SD</b>	19,00	
<b>RSD</b>	1,4	

**Tablica 8. Točnost i relativno standardno odstupanje za utvrđivanje granice kvatifikacije za fosamprenavir kalcij**

Otopina	Površina pika	Točnost / %
QL1	1609	106,98
QL2	1584	104,34
QL3	1639	110,15
QL4	1411	86,06
QL5	1442	89,33
QL6	1596	105,61
<b>Srednja vrijednost</b>	1546,83	100,4
<b>SD</b>	95,50	
<b>RSD</b>	6,2	

Tablica 9. Točnost i relativno standardno odstupanje za utvrđivanje granice kvatifikacije za IMP 0, 93

Otopina	Površina pika	Točnost / %
QL1	920	101,90
QL2	938	103,78
QL3	961	106,18
QL4	894	99,19
QL5	877	97,41
QL6	938	103,78
<b>Srednja vrijednost</b>	921,33	102,0
<b>SD</b>	31,12	
<b>RSD</b>	3,4	

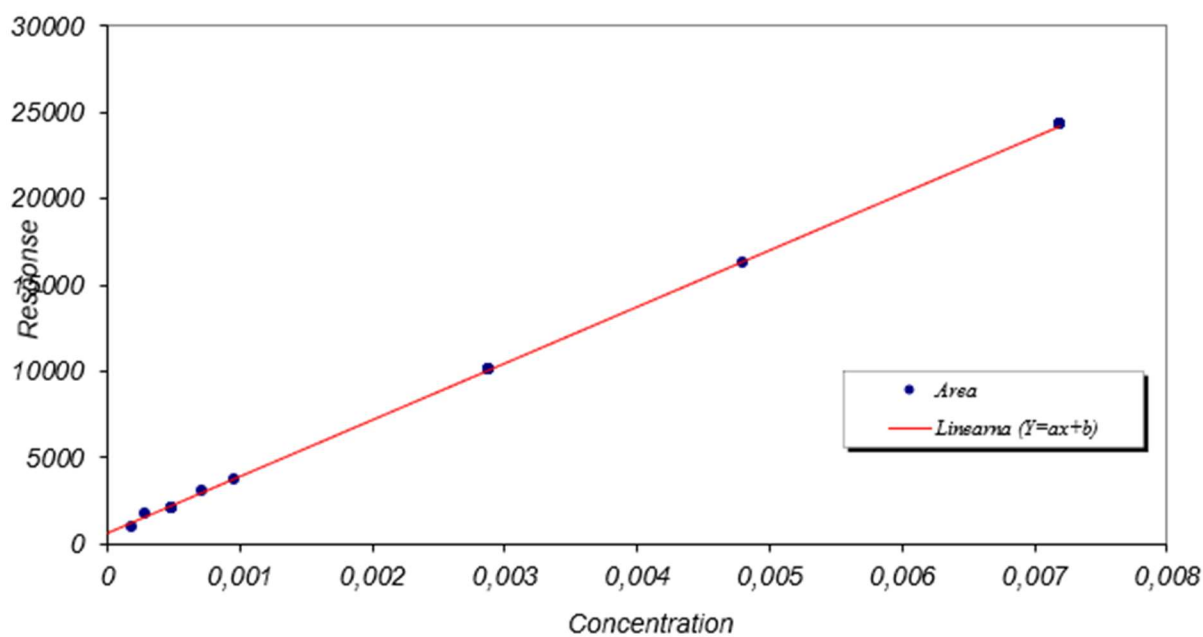
#### **4.4.3. Linearnost**

Ispitivanje linearnosti provedeno je za fosamprenavir kalcij i njegova dva onečišćenja, amprenavir i IMP 0,93. Kao donja granica masene koncentracije ispitivanja linearnosti uzet je limit kvatifikacije opisan u poglavlju 4.4.2. (0,0002 mg/mL, 0,02% radne masene koncentracije). Gornja granica postavljena je na 0,75% (0,0075 mg/mL) prema maksimalnim količinama onečišćenja za fosamprenavir kalcij.

Na temelju rezultata (Tablice 10. – 12.) provedene studije linearnosti grafički je prikazana ovisnost odaziva detektora o masenoj koncentraciji standarda (Slika 31. – 33.).

Tablica 10. Rezultati za studiju linearnosti fosamprenavir kalcija

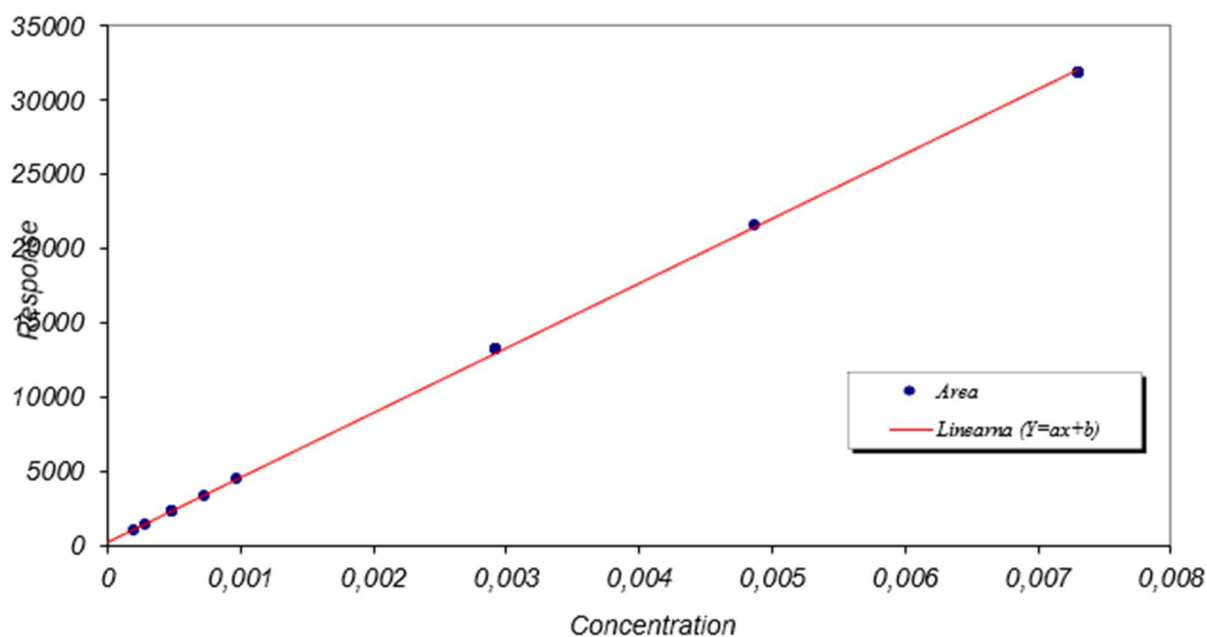
Otopina	Konačna masena koncentracija/ mg ml <sup>-1</sup>	Koncentracijski nivo / %	Površina pika
L1	0,0002	0,02	968
L2	0,0003	0,03	1774
L3	0,0005	0,05	2084
L4	0,00075	0,075	3107
L5	0,0010	0,1	3744
L6	0,0030	0,3	10093
L7	0,0050	0,5	16284
L8	0,0075	0,75	24291



Slika 31. Grafički prikaz ovisnosti odaziva detektora o koncentraciji otopine fosamprenavir kalcija

Tablica 11. Rezultati za studiju linearnosti amprenavira

Otopina	Konačna masena koncentracija/ mg ml <sup>-1</sup>	Koncentracijski nivo / %	Površina pika
L1	0,0002	0,02	961
L2	0,0003	0,03	1420
L3	0,0005	0,05	2352
L4	0,00075	0,075	3326
L5	0,0010	0,1	4489
L6	0,0030	0,3	13172
L7	0,0050	0,5	21597
L8	0,0075	0,75	31883

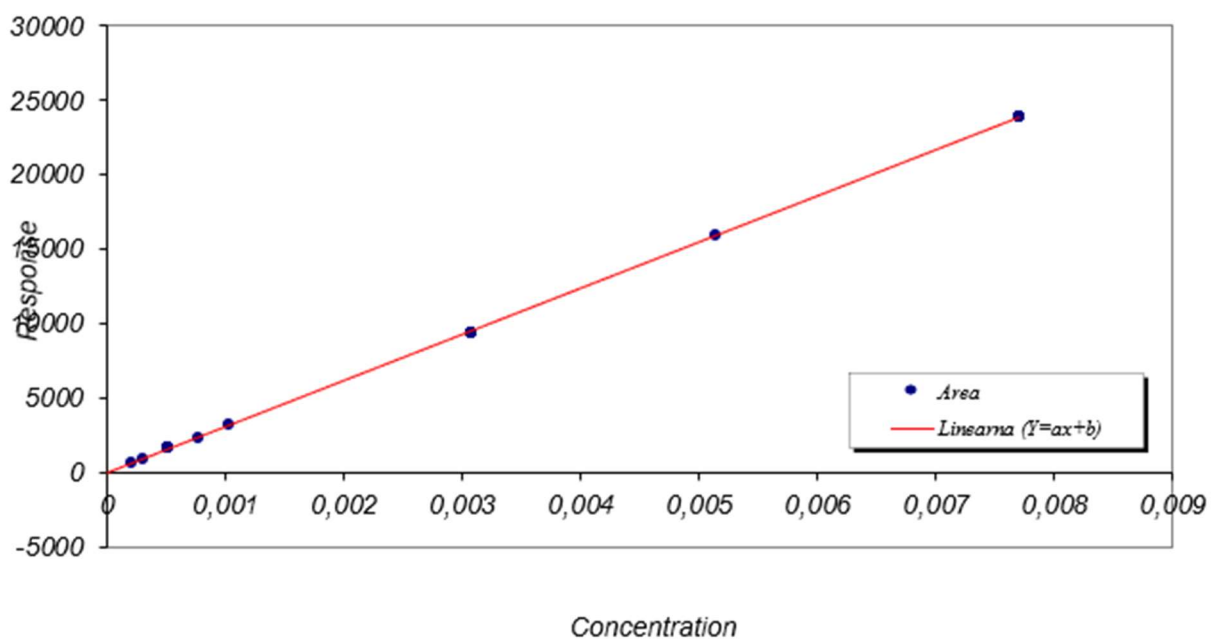


Slika 32. Grafički prikaz ovisnosti odaziva detektora o koncentraciji otopine amprenavira



Tablica 12. Rezultati za studiju linearnosti za IMP 0,93

Otopina	Konačna masena koncentracija/ mg ml <sup>-1</sup>	Koncentracijski nivo / %	Površina pika
L1	0,0002	0,02	604
L2	0,0003	0,03	892
L3	0,0005	0,05	1618
L4	0,00075	0,075	2289
L5	0,0010	0,1	3152
L6	0,0030	0,3	9432
L7	0,0050	0,5	15933
L8	0,0075	0,75	23925



Slika 33. Grafički prikaz ovisnosti odaziva detektora o koncentraciji otopine IMP 0,93

Iz baždarnih dijagrama određeni su nagib pravca a, odsječak b i koeficijent linearne regresije r prikazani u Tablici 13.

**Tablica 13. Pregled linearnosti za otopine fosamprenavir kalcija i onečišćenja, amprenavira i IMP 0,93**

analit	nagib pravca a	odsječak b	r
fosamprenavir kalcij	3290367	597	0,9997
amprenavir	4354905	212	0,9999
IMP 0,93	3108063	-57	1,0000

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da je metoda linearna za određivanje onečišćenja u rasponu koncentracijskih razina od 0,02 % do 0,75 %. S obzirom na to da je u navedenom koncentracijskom području uočena linearna ovisnost odziva detektora o masenoj koncentraciji dovoljna je priprema standardne otopine na jednoj koncentracijskoj razini.

#### 4.4.4. Točnost

Točnost metode za određivanje onečišćenja amprenavira i IMP 0,93 određena je na otopinama pripremljenim na tri koncentracijske razine: 0,02 %, 0,05 % i 0,75 %. Svaka otopina injektirana je tri puta. Rezultati za točnost metode određeni su kao odstupanje od linearnosti prikazani Tablicama 14. - 16.

**Tablica 14. Devijacija od linearnosti određena za studiju točnosti za fosamprenavir kalcij**

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Površina pika	Srednja vrijednost površine pika	RSD / %	Točnost / %	Srednja vrijednost točnosti / %
0,02	1	1306	1320	1,1	74,96	76,4
	2	1320			76,44	
	3	1334			77,92	
0,05	1	1914	1995	4,3	83,52	88,7
	2	2084			94,30	
	3	1987			88,15	
0,75	1	23093	24229	2,2	98,51	99,9
	2	23944			98,68	
	3	24841			102,47	

Tablica 15. Devijacija od linearnosti određena za studiju točnosti za amprenavir

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Površina pika	Srednja vrijednost površine pika	RSD / %	Točnost / %	Srednja vrijednost točnosti / %
0,02	1	1435	1418	1,8	96,05	94,7
	2	1431			95,73	
	3	1389			92,44	
0,05	1	2288	2274	0,6	97,81	97,2
	2	2273			97,10	
	3	2262			96,58	
0,75	1	31794	31834	0,1	99,18	99,3
	2	31826			99,28	
	3	31883			99,45	

Tablica 16. Devijacija od linearnosti određena za studiju točnosti za IMP 0,93

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Površina pika	Srednja vrijednost površine pika	RSD / %	Točnost / %	Srednja vrijednost točnosti / %
0,02	1	865	873	1,9	96,16	97,0
	2	892			98,98	
	3	863			95,95	
0,05	1	1576	1589	0,8	102,21	103,0
	2	1601			103,78	
	3	1590			103,09	
0,75	1	23711	23824	0,5	99,21	99,7
	2	23836			99,73	
	3	23925			100,10	

Analitički prinos određen je dodavanjem standardnih otopina onečišćenja u otopinu standarda fosamprenavir kalcija na tri koncentracijske razine: 0,03 %, 0,05 % i 0,75 %. Rezultati su prikazani u Tablici 17.

**Tablica 17. Analitički prinos određen za studiju točnosti za amprenavir i IMP 0,93**

Otopine onečišćenja	Površina pika standardne otopine onečišćenja	Srednja vrijednost površine pika standardne otopine onečišćenja	Površina pika u cijepljenoj otopini fosamprenavir kalcija	Srednja vrijednost površine pika u cijepljenoj otopini fosamprenavir kalcija	Srednja vrijednost analitičkog prinosa / %
<b>Koncentracijska razina 0,03 %</b>					
amprenavir	1486	1492	1491	1439	96,4
	1469		1414		
	1521		1412		
IMP 0,93	933	940	1180	1146	121,9
	919		1119		
	969		1140		
<b>Koncentracijska razina 0,05%</b>					
amprenavir	2520	2488	2504	2471	99,3
	2474		2448		
	2470		2463		
IMP 0,93	1646	1624	1907	1855	114,2
	1610		1828		
	1616		1831		
<b>Koncentracijska razina 0,75%</b>					
amprenavir	33759	33709	33945	33432	99,2
	33641		32974		
	33727		33376		
IMP 0,93	22998	23015	23384	23026	100,0
	22984		22688		
	23063		23007		

#### 4.4.5. Preciznost

Ponovljivost sustava određena je analizom otopina fosamprenavir kalcija i njegova dva onečišćenja pripremljenih na tri koncentracijske razine: 0,03 %, 0,05 % i 0,75 %. Svaka je otopina injektirana tri puta. Očitane su površine ispod kromatografskog pika svakog onečišćenja te izračunata srednja vrijednost i relativno standardno odstupanje (RSD) površine. Dobiveni rezultati prikazani su Tablicama 18.- 20.

Tablica 18. Ponovljivost sustava određena za studiju preciznosti za fosamprenavir kalcij

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Površina pika	Srednja vrijednost površine pika	RSD / %
0,03	1	1306	1320	1,1
	2	1320		
	3	1334		
0,05	1	1914	1995	4,3
	2	2084		
	3	1987		
0,75	1	23903	24229	2,2
	2	23944		
	3	24841		

Tablica 19. Ponovljivost sustava određena za studiju preciznosti za amprenavir

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Površina pika	Srednja vrijednost površine pika	RSD / %
0,03	1	1435	1418	1,8
	2	1431		
	3	1389		
0,05	1	2288	2274	0,6
	2	2273		
	3	2262		
0,75	1	31794	31834	0,1
	2	31826		
	3	31883		

Tablica 20. Ponovljivost sustava određena za studiju preciznosti za IMP 0,93

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Površina pika	Srednja vrijednost površine pika	RSD / %
0,03	1	865	873	1,9
	2	892		
	3	863		
0,05	1	1576	1589	0,8
	2	1601		
	3	1590		
0,75	1	23711	23824	0,5
	2	23836		
	3	23925		

Da bi se ispitala ponovljivost metode, standard fosamprenavir kalcija cijepjen je poznatim onečišćenjima –amprenavirom i IMP 0,93 na nivou 0,05%. U svrhu studije ponovljivosti analizirano je šest priprema cijepjenog fosamprenavir kalcija, dok je za ispitivanje intermedijske preciznosti ponovljena analiza na šest uzoraka od strane drugog analitičara, idući dan koristeći drugi instrument, mobilnu fazu i kolonu. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 21.

**Tablica 21. Rezultati studije ponovljivosti metode i intermedijske preciznosti za amprenavir i IMP 0,93**

<b>Uzorak</b>	<b>amprenavir / %</b>	<b>IMP 0,93 / %</b>
Ponovljivost_1	93,53	119,00
Ponovljivost_2	89,58	114,07
Ponovljivost_3	89,55	114,26
Ponovljivost_4	90,12	116,01
Ponovljivost_5	88,91	116,82
Ponovljivost_6	92,72	113,07
<b>Sadržaj onečišćenja / %</b>	<b>90,7</b>	<b>115,5</b>
<b>RSD / %</b>	<b>2,1</b>	<b>1,9</b>
Intermedijska_1	87,31	107,19
Intermedijska_2	83,94	107,72
Intermedijska_3	83,36	108,25
Intermedijska_4	82,68	106,86
Intermedijska_5	86,92	109,96
Intermedijska_6	83,11	107,13
<b>Sadržaj onečišćenja / %</b>	<b>84,60</b>	<b>107,9</b>
<b>RSD / %</b>	<b>2,4</b>	<b>1,1</b>

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti da je metoda ponovljiva te da provođenje analize od strane drugog analitičara, drugi dan na drugom instrumentu, drugoj koloni i korištenjem novo pripremljenih mobilnih faza, ne utječe značajno na dobivene rezultate. Potvrđeno je da su priprema uzorka i metoda analize precizni.

#### **4.4.6. Radno područje**

Za radno područje metode odabran je raspon koncentracija 0,0003 – 0,0075 mg/mL. U tom području dokazana je linearnost, preciznost i točnost metode.

#### 4.4.7. Stabilnost

Analiza otopine standarda i otopine uzorka, koji su stajali dva tjedna na sobnoj temperaturi u bezbojnim tikvicama, pokazala je da su standard i uzorak stabilni. Nema značajne promjene u sadržaju onečišćenja što je prikazano Tablicom 22. Niti jedan pik u kromatogramu nije izostao niti je došlo do degeneracije pikova.

**Tablica 22. Rezultati ispitivanja stabilnosti otopine uzorka i standarda fosamprenavir kalcija cijepljene onečišćenjima, amprenavirom i IMP 0,93**

<b>onečišćenje</b>	<b>razlika u sadržaju onečišćenja nakon 2 tjedna / %</b>
amprenavir (uzorak)	4,6
IMP 0,93 (uzorak)	5,7
amprenavir (STD)	7,1
IMP 0,93 (STD)	6,7



#### **4.4.8. Sažetak rezultata validacije metode**

Tijekom provođenja postupka validacije metode svi određeni validacijski parametri zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti prema propisanim smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju, prethodno prikazanima u Tablici 6. Metoda je selektivna, linearna, precizna i točna te su ispitivane otopine stabilne. Koncentracijska razina 0,01 % predstavlja limit detekcije, a 0,02 % limit kvantifikacije. Radno područje metode je 0,03 – 0,75 %. Budući da je postupak validacije bio uspješan, moguće je po odabranoj metodi provoditi daljnje analize.

## 5. ZAKLJUČAK

Razvijena je nova UHPLC-DAD metoda za određivanje onečišćenja fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93. Sistematičnim razvojem metode primjenom kvalitete ugrađene u dizajn uz korištenje DryLab® računalnog programa, omogućeno je razdvajanje ispitivanih onečišćenja u vrlo kratkom vremenu analize (3 minute) te je osigurano da će metoda u odabranim uvjetima biti robusna i dati pouzdane rezultate.

Novorazvijena metoda je validirana u skladu s ICH smjernicama u području primjene metode od 0,0003 mg/mL do 0,0075 mg/mL s granicom kvantifikacije od 0,0002 mg/mL i granicom dokazivanja od 0,0001 mg/mL. Komponente prisutne u uzorku u postotku manjem od 0,01 % neće biti detektirane, a veće od 0,02 % moći će se kvantitativno odrediti. Potvrđena je linearnost metode u području od 0,0002 mg/mL do 0,0075 mg/mL, kao i selektivnost jer je iz kromatograma vidljiva odvojenost svih pikova od glavne komponente te nema interferirajućih pikova na mjestu gdje je predviđeno vrijeme zadržavanja pika glavnog analita i pikova onečišćenja. Ispitana je točnost metode putem analitičkog prinosa na tri koncentracijske razine: 0,03 %, 0,05 % i 0,75 % pri čemu je vrijednost bila u granicama prihvatljivosti. Točnost je ispitana i putem devijacije od linearnosti na tri koncentracijske razine: 0,02 %, 0,05 % i 0,75 % pri čemu su svi rezultati također u granicama prihvatljivosti. Putem ponovljivosti sustava, ponovljivosti metode i srednje preciznosti dokazano je da je odabrana metoda precizna. Ponovljivost sustava ispitana je na tri koncentracijske razine: 0,03 %, 0,05 % i 0,75 % pri čemu su relativna standardna odstupanja bila ispod dopuštene granice (manje od 10 %) što zadovoljava postavljeni kriterij. U svrhu ispitivanja ponovljivosti metode i preciznosti ispitano je šest otopina fosamprenavir kalcija koncentracije 1 mg/mL cijepljene onečišćenjima koncentracije 0,0005 mg/mL te je dobiveno relativno standardno odstupanje u prihvatljivim granicama (manje od 10 %). Otopine standarda i uzorka stabilne su dva tjedna na sobnoj temperaturi.

Iz prethodno navedenog, može se zaključiti da je odabrana analitička metoda selektivna, linearna, precizna i točna te da su korištene otopine stabilne pri sobnoj temperaturi. Metodu je moguće primijeniti tijekom rutinskih analiza pripravaka koji sadrže fosamprenavir kalcij kao aktivnu supstanciju.

## 6. LITERATURA:

- Ahuja S, Scypinski S. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. Cambridge, Massachusetts, Academic Press, 2001, str. 281; 349-374; 415-427
- Chilukuri M, Narayanareddy P, HussianreddynK. Stability-Indicating HPLC Method for Determination of Fosamprenavir Calcium. *J Chromatog Sci*, 2014, 52, 781–787
- Council of Europe. Liquid Chromatography. U: European Pharmacopoeia, 4th edition. Council of Europe, 2003, str. 40-42
- Dong MW. HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. New Jersey, John Wiley & Sons, 2019, str. 15-24
- Falcoz C, Jenkins JM, Bye C, Hardman TC, Kenney KB, Studenberg S, Fuder H, Prince WTJ. Pharmacokinetics of GW433908, a prodrug of amprenavir, in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol*, 2002, 42, 887–898
- Fosamprenavir, <https://pubchem.ncbi.nlm.gov/>, pristupljeno 15.3.2021.
- Fosamprenavir, <https://go.drugbank.com>, pristupljeno 17.3.2021.
- Hussain S i Shaikh T. Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC): A new trend in analysis. *World J Pharm Res*, 2016, 5, 387-394
- Kapil K. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. U: Method Development and Validation of Analytical Procedures, Dehradun, Dev Bhoomi Institute of Pharmacy and Research, 2011
- Kaštelan-Macan M. Kemijska analiza u sustavu kvalitete. Školska knjiga, Zagreb, 2003, 535-546
- Kazakevich Y, Lobrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2007, str. 4 - 6; 15 - 32; 75 – 92; 455 - 499
- Lasić K, Turk AM, Nigović B. Quality by Design (QbD) approach for the development of a rapid UHPLC method for simultaneous determination of aglycone and glycoside forms of isoflavones in dietary supplements. *Anal Methods*, 2020, 12, 2082-2092
- Lexiva (Fosamprenavir), <https://reference.medscape.com>, pristupljeno 16.4.2021.
- Lv Z, Chu Y, Wang Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl)*, 2015, 7, 95-104
- Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2002
- Molnár-Institute for applied chromatography, <http://molnar-institute.com>, pristupljeno 18.3.2021
- Nigović B. Kromatografske tehnike odjeljivanja. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2019a.

Nigović B. Validacija analitičkih postupaka. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2019b.

Nigović B, Mornar A, Sertić M, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J. Vježbe iz analitike lijekova. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2019c, str. 150-153

Pharmaceutical Development, 2009, International Conference on Harmonisation, Q8 (R2)

Pharmaceutical Development, 2005, International Conference on Harmonisation, Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology

Ravichadran V, Shalini S, Sundram KM, Rajak H. Validation of analytical methods - strategies and importance. *Int J Pharmacy and Pharm Sci*, 2010, 2, 18–22.

Sahu PK, Ramiseti NR, Cecchi T, Swain S, Patro CS, Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 147, 590–611

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of Analytical Chemistry. Boston, CENGAGE Learning, 2013, str. 861-872; 912-921

Smith RM. Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods. U: Column Liquid Chromatography. Heftmann E, urednik, California, Elsevier Science, 2004, str. 95-138

Swartz, M. HPLC Detectors: a Brief Review. *J Liq Chrom Relat Tech*, 2010, 33, 1130-1150

Taleuzzaman M, Ali S, Gilani S, Imam S. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Austin J Anal Pharm Chem*, 2015, 1056, 2381-8913

Terzić J, Popović I, Jančić-Stojanović B. Aspects of DryLab software application in chromatography methods optimization and robustness testing. *Arh farm*, 2014, 64, 205-219

Vierling P, Greiner J. Prodrugs of HIV Protease Inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2003, 9, 1755-1770

Wire MB, Shelton MJ, Studenberg S. Fosamprenavir Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions of the Amprenavir Prodrug. *Clin Pharmacokinet*, 2006, 45, 137-168

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### **Razvoj i validacija UHPLC metode prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za određivanje onečišćenja fosamprenavira**

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti brzu, selektivnu i osjetljivu metodu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za određivanje onečišćenja fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93 na. Primjenom načela kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) znatno je skraćeno vrijeme razvoja metode te je utrošeno manje resursa što je ekološki prihvatljivije od tradicionalnog razvoja metode koji zahtjeva veći utrošak kemikalija. Prikladni pH za odjeljivanje sastavnica uspješno je predviđen pomoću programskog paketa Marvin Beans. Sustavno je proveden razvoj s UV detektorom uparene UHPLC metode obrnutih faza korištenjem DryLab® softvera za modeliranje. U programu ispitivani parametri bili su: stacionarna faza, vrijeme elucije, temperatura kolone i pH mobilne faze. Programski paket DryLab® uključuje i vizualni prikaz robusnog područja metode čime omogućava izbor eksperimentalnog područja u kojem promjena parametara metode neće značajno utjecati na rezultat analize. Na temelju dobivenih podataka metoda je razvijena na koloni Agilent, Zorbax EclipsePlus C18 RRHD (1,8  $\mu\text{m}$  2,1 x 50 mm). Kao pokretne faze korištene su amonijev acetat pH 4 i acetonitril. Optimizirana metoda može razdijeliti fosamprenavir kalcij od odabranih onečišćenja u vremenu od 3 minute i pri temperaturi kolone 50°C. Nakon razvoja, metoda je validirana prema ICH Q2 (R1) smjernicama. Dokazana je selektivnost, linearnost, točnost i preciznost metode te stabilnost ispitivanih otopina. Utvrđene su granice dokazivanja i određivanja te radno područje metode. Razvijena i validirana metoda može se koristiti u kontroli kvalitete za određivanje onečišćenja u farmaceutskim oblicima koji sadrže fosamprenavir kalcij kao djelatnu tvar.

### **Development and validation of UHPLC method using quality by design (QbD) approach for fosamprenavir impurities determination**

The main goal of this diploma thesis was the development of fast, selective and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography method (UHPLC) used for detection and quantification of impurities, amprenavir and IMP 0.93, in the samples with fosamprenavir calcium as API. Employing Quality by Design approach (QbD) the method development time was significantly reduced and the materials used were saved, which is ecologically more acceptable than traditional way requiring higher consumption of chemicals. The right pH value of the mobile phase was successfully predicted with Marvin Beans software. A new

reversed phase UHPLC method with UV detection development was systematically performed using the DryLab® software modelling package where stationary phase, gradient time, column temperature and the pH of the eluent were explored parameters. What DryLab® also includes is a visual presentation of method robust space which allows choosing the right experimental domain where the parameter change would not significantly affect analysis results. Based on the results of DryLab® experiment, the method was developed on Agilent, Zorbax EclipsePlus C18 RRHD (1.8 µm 2.1 x 50 mm) column. Ammonium acetate pH 4 and acetonitrile were used as mobile phases. Optimised gradient method was able to separate fosamprenavir calcium and selected impurities in 3 minutes with the column temperature of 50°C. After the development, validation was conducted according to Q2 (R1) guidelines of International Conference Harmonization (ICH). The developed method was validated with respect to selectivity, linearity, accuracy and precision as well as the solution stability. The limit of detection, limit of quantification and working range were also established. Developed and validated method can be used for quality control of pharmaceutical forms containing fosamprenavir calcium as an active substance.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### RAZVOJ I VALIDACIJA UHPLC METODE PREMA NAČELU KVALITETE UGRAĐENE U DIZAJN (QbD) ZA ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA FOSAMPRENAVIRA

Sara Perko

#### SAŽETAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti brzu, selektivnu i osjetljivu metodu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za određivanje onečišćenja fosamprenavir kalcija, amprenavira i IMP 0,93 na. Primjenom načela kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) znatno je skraćeno vrijeme razvoja metode te je utrošeno manje resursa što je ekološki prihvatljivije od tradicionalnog razvoja metode koji zahtjeva veći utrošak kemikalija. Prikadni pH za odjeljivanje sastavnica uspješno je predviđen pomoću programskog paketa Marvin Beans. Sustavno je proveden razvoj s UV detektorom uparene UHPLC metode obrnutih faza korištenjem DryLab® softvera za modeliranje. U programu ispitivani parametri bili su: stacionarna faza, vrijeme elucije, temperatura kolone i pH mobilne faze. Programski paket DryLab® uključuje i vizualni prikaz robusnog područja metode čime omogućava izbor eksperimentalnog područja u kojem promjena parametara metode neće značajno utjecati na rezultat analize. Na temelju dobivenih podataka metoda je razvijena na koloni Agilent, Zorbax EclipsePlus C18 RRHD (1,8  $\mu$ m 2,1 x 50 mm). Kao pokretne faze korištene su amonijev acetat pH 4 i acetonitril. Optimizirana metoda može razdijeliti fosamprenavir kalcij od odabranih onečišćenja u vremenu od 3 minute i pri temperaturi kolone 50°C. Nakon razvoja, metoda je validirana prema ICH Q2 (R1) smjernicama. Dokazana je selektivnost, linearnost, točnost i preciznost metode te stabilnost ispitivanih otopina. Utvrđene su granice dokazivanja i određivanja te radno područje metode. Razvijena i validirana metoda može se koristiti u kontroli kvalitete za određivanje onečišćenja u farmaceutskim oblicima koji sadrže fosamprenavir kalcij kao djelatnu tvar.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 66 stranica, 33 grafičkih prikaza, 22 tablica i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fosamprenavir, UHPLC, onečišćenja, kvaliteta ugrađena u dizajn, QbD

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Kornelija Lasić**, vanjski suradnik, Teva api I&R analitika

Rad prihvaćen: svibanj 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Analytical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF UHPLC METHOD USING QUALITY BY DESIGN (QbD) APPROACH FOR FOSAMPRENAVIR IMPURITIES DETERMINATION

**Sara Perko**

#### SUMMARY

The main goal of this diploma thesis was the development of fast, selective and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography method (UHPLC) used for detection and quantification of impurities, amprenavir and IMP 0.93, in the samples with fosamprenavir calcium as API. Employing Quality by Design approach (QbD) the method development time was significantly reduced and the materials used were saved, which is ecologically more acceptable than traditional way requiring higher consumption of chemicals. The right pH value of the mobile phase was successfully predicted with Marvin Beans software. A new reversed phase UHPLC method with UV detection development was systematically performed using the DryLab® software modelling package where stationary phase, gradient time, column temperature and the pH of the eluent were explored parameters. What DryLab® also includes is a visual presentation of method robust space which allows choosing the right experimental domain where the parameter change would not significantly affect analysis results. Based on the results of DryLab® experiment, the method was developed on Agilent, Zorbax EclipsePlus C18 RRHD (1.8  $\mu\text{m}$  2.1 x 50 mm) column. Ammonium acetate pH 4 and acetonitrile were used as mobile phases. Optimised gradient method was able to separate fosamprenavir calcium and selected impurities in 3 minutes with the column temperature of 50°C. After the development, validation was conducted according to Q2 (R1) guidelines of International Conference Harmonization (ICH). The developed method was validated with respect to selectivity, linearity, accuracy and precision as well as the solution stability. The limit of detection, limit of quantification and working range were also established. Developed and validated method can be used for quality control of pharmaceutical forms containing fosamprenavir calcium as an active substance.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 66 pages, 33 figures, 22 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Fosamprenavir, UHPLC, impurities, quality by design, QbD

Mentor: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kornelija Lasić, Ph.D.** *External Associate*, Teva api R&D Analytics

The thesis was accepted: May 2021.