

# Razvoj UHPLC metode za određivanje elvitegravira prema načelima kvalitete ugrađene u dizajn primjenom računalnog programa Fusion QbD

---

Gorički, Viktorija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:932565>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Viktorija Gorički

**Razvoj UHPLC metode za određivanje elvitegravira prema načelima kvalitete  
ugrađene u dizajn primjenom računalnog programa Fusion QbD**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi povjerenstva: prof. dr. sc. Sandra Babić  
prof. dr. sc. Irena Škorić  
dr. sc. Martina Biošić

Zagreb, srpanj 2021.

## SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je razviti i validirati analitičku metodu za određivanje aktivnog farmaceutskog sastojka, elvitegravira te njegovih poznatih onečišćenja prema načelima kvalitete ugrađene u dizajn.

Razvoj analitičkih metoda svakako je važan korak u procesu razvoja i proizvodnji lijekova. On zauzima ključnu ulogu u daljnim proizvodnim procesima kroz sve faze životnog ciklusa lijeka. Stoga je važno da razvijena analitička metoda bude pouzdana, precizna, robusna i selektivna. Princip kvalitete ugrađene u dizajn pruža nam brojne benefite nad tradicionalnim pristupom, a njegovim prihvaćanjem kontinuirano poboljšavamo robusnost proizvodnog procesa, kvalitetu proizvoda i produktivnost.

U ovom radu, slijedeći principe kvalitete ugrađene u dizajn te korištenjem programa Fusion AE<sup>TM</sup> uspješno je razvijena i optimirana kromatografska metoda. Razvijena metoda je validirana čime je dokazana njena prikladnost za određivanje elvitegravira.

**Ključne riječi:** elvitegravir, UHPLC, kvaliteta ugrađena u dizajn, Fusion AE<sup>TM</sup>

## ABSTRACT

The aim of this study was to develop and validate an analytical method for the determination of the active pharmaceutical ingredient, elvitegravir and its known impurities according to the principles of quality by design.

The development of analytical methods is certainly an important step in the process of drug development and production. It plays a key role in further production processes through all stages of the drug life cycle. Therefore, the developed analytical method must be reliable, accurate, robust and selective. The principle of quality by design provides us with numerous benefits over the traditional approach and by accepting it, we continuously improve the robustness of the production process, product quality and productivity.

In this paper, following the principles of quality by design and using the Fusion AE<sup>TM</sup> software, the chromatographic method was successfully developed and optimized. The developed method was validated, which proved its applicability for the determination of elvitegravir.

Keywords: elvitegravir, UHPLC, quality by design, Fusion AE<sup>TM</sup>

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Elvitegravir.....	2
2.2. Kromatografija .....	3
2.2.1. Parametri kromatografske separacije.....	5
2.2.2. Robusnost.....	8
2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	9
2.3.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	9
2.4. Kvaliteta ugrađena u dizajn.....	10
2.5. Kvaliteta ugrađena u dizajn u razvoju analitičkih metoda .....	15
2.5.1. Teorijska pozadina AQbD-ija.....	17
2.5.2. Fusion AE <sup>TM</sup> .....	19
2.6. Validacija analitičke metode .....	20
2.6.1. Specifičnost/selektivnost.....	21
2.6.2. Točnost i preciznost .....	21
2.6.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	22
2.6.4. Linearnost .....	22
2.6.5. Mjerno područje.....	23
3. Eksperimentalni dio .....	24
3.1. Materijali .....	24
3.1.1. Elvitegravir i onečišćenja.....	24
3.1.2. Kemikalije.....	25
3.1.3. Kromatografske kolone.....	25

3.2.	Instrumenti .....	25
3.2.1.	Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti .....	28
3.3.	Metode rada.....	29
3.3.1.	Priprema standardnih otopina elvitegravira i onečišćenja .....	29
3.3.2.	Priprema pokretne faze .....	30
3.3.3.	Razvoj i optimizacija metode.....	30
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	37
4.1.	Odabir pH-vrijednosti pokretne faze.....	37
4.2.	Razvoj metode u Fusion Ae <sup>TM</sup> .....	38
4.3.	Obrada rezultata u Fusion Ae <sup>TM</sup> .....	41
4.4.	Provedba eksperimenta prema predloženoj metodi .....	43
4.5.	Validacija .....	47
5.	Zaključak.....	50
6.	Literatura.....	51
7.	Prilozi.....	53

# 1. Uvod

Kvaliteta ugrađena u dizajn u razvoju analitičkih metoda postala je važno područje interesa u proizvodnji farmaceutski aktivnih tvari tijekom prošlog desetljeća. Glavni cilj kvalitete ugrađene u dizajn je razvoj dobro dizajniranih, razumljivih i kontroliranih procesa za proizvodnju i ispitivanje farmaceutskih tvari i proizvoda. Prvotno predloženi okvir kvalitete ugrađene u dizajn u razvoju analitičkih metoda istaknuo se pružanjem robusnih i dobro razumljivih analitičkih metoda za učinkovitu kontrolu procesa s ciljem isporuke visokokvalitetnih i izvrsno karakteriziranih farmaceutskih proizvoda, uz regulatornu fleksibilnost, kako bi se na odgovarajući način upravljalo analitičkim metodama tijekom životnog ciklusa proizvoda [1]. Razvoj ovog revolucionarnog koncepta znatno ubrzava proces proizvodnje novih terapijskih rješenja za razne bolesti današnjice.

Elvitegravir je inhibitor prijenosa lanca integraze virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) koji se koristi za liječenje HIV-1 infekcije kod odraslih osoba s iskustvom u antiretrovirusnom liječenju. Budući da je integraza neophodna za replikaciju virusa, inhibicija sprječava integraciju HIV-1 DNA u genom domaćina i na taj način blokira stvaranje HIV-1 provirusa i rezultirajuće širenje virusne infekcije [2].

Primjena elvitegravira, kao lijeka iz antiretrovirusne skupine, usporava napredovanje bolesti te poboljšava kvalitetu života oboljelih od AIDS-a. Liječenje sprječava ili smanjuje moguće komplikacije bolesti, omogućuje duži i kvalitetniji život te ujedno sprječava nehotečno širenje infekcije na druge [3].

Primjena razvijenog koncepta kvalitete ugrađene u dizajn u razvoju analitičkih metoda od velike je važnosti za dobivanje bržih, kvalitetnijih i selektivnijih metoda koje će kao rezultat dati izvrsna terapijska rješenja te poboljšati kvalitetu života ljudi.

## 2. Opći dio

### 2.1. Elvitegravir

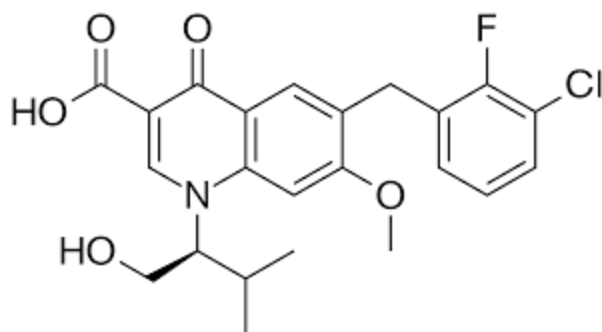
Elvitegravir (ELV) je aktivna farmaceutska tvar koja se u kombinaciji s drugim lijekovima koristi za liječenje HIV-1 infekcije. Molekulska formula elvitegravira je  $C_{23}H_{23}ClFNO_5$ , a njegova molarna masa iznosi  $447,883 \text{ g mol}^{-1}$  (**Slika 1.**)

Kombinirana upotreba anti-HIV lijekova kao dio visoko aktivne antiretrovirusne terapije (HAART) otvorila je novu eru u liječenju HIV infekcije. HAART-om je replikacija HIV-a izuzetno suzbijena te se uspješno održava smanjenje virusnog opterećenja kao i smanjenje smrtnosti. Do danas su u HAART-u naširoko korišteni inhibitori nukleotidne reverzne transkriptaze (NRTI), nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze (NNRTI) i proteazni inhibitori. Međutim, dugotrajna primjena lijekova koji smanjuju replikaciju virusa nažalost inducira pojavu inačica rezistentnih na lijekove što dovodi do neuspjeha liječenja. Kako bi se nosili s ovim problemom, otkrića novih inhibitora reverzne transkriptaze (RT) i proteaze (PR) kao i razvoj novih terapijskih rješenja su neophodna.

Elvitegravir je inhibitor HIV-1 integraze. Integracija je prepoznatljiv i bitan proces infekcije virusom HIV-1. HIV-1 integraza je jedan od tri glavna enzima virusa HIV-1 i neophodan je za ugradnju provirusne DNA HIV-1 u genom stanice domaćina [4]. Inhibitori integraze ne sprječavaju ulazak virusa u stanicu, već onemogućuju ugradnju virusnog genoma u genom stanice domaćina te u kombinaciji s drugim lijekovima mogu pridonijeti sprječavanju daljnjeg razvoja bolesti, smanjiti njene simptome, te produžiti životni vijek bolesnika [5].

Inhibitori integraze nova su skupina antiretrovirusnih lijekova s novim mehanizmom djelovanja i jedinstvenim profilom otpora. Integraza ima ključnu ulogu u životnom ciklusu HIV-1. Nakon ulaska virusa i konverzije HIV-1 jednolančane RNA do dvolančane DNA reverznom transkriptazom, integraza tvori predintegracijski kompleks te je ugrađena u jezgru. Integraza je stoga uključena u početne reakcije razbijanja i spajanja DNA odgovornih za vezanje komplementarne DNA za DNA domaćina [6].





**Slika 1.** Prikaz strukture elvitegravira

## 2.2. Kromatografija

Kromatografija je najčešće korištena analitička tehnika u farmaceutskoj analizi. Razumijevanje parametara koji utječu na kromatografsko razlučivanje omogućuje poboljšanje kromatografskih sustava. Mogućnosti za postizanje visokog razlučivanja kontinuirano rastu.

Kromatografske metode odjeljivanja se primijenjuju u različitim područjima. Pod pojmom kromatografskih metoda podrazumijeva se skup kromatografskih postupaka koji omogućuju odjeljivanje, a potom selektivno i osjetljivo dokazivanje/određivanje sastavnica u multikomponentnim uzorcima (smjesama). Tvari koje treba odijeliti podvrgavaju se ponovljenim razdiobama između dvije faze, nepokretne faze koja može biti čvrsta tvar ili tekućina i pokretne faze koja može biti plin, tekućina ili superkritični fluid. Kromatografske tehnike odjeljivanja temelje se na adsorpciji, razdiobi, ionskoj izmjeni ili isključenju (razlici fizikalno-kemijskih svojstava molekule) koje omogućuju odjeljivanje sastojaka iz smjese te su dane u **Tablici 1**. Uzorak koji je otopljen u pokretnoj fazi kreće se preko nepokretne faze koja je krutina, tekućina nanosena na krutinu ili gel u koloni ili na plohi.

Kromatografska analiza uključuje:

- separaciju sastojaka ispitivane smjese
- kvalitativnu ili kvantitativnu analizu odvojenih sastojaka.

**Tablica 1.** Podjela kromatografskih tehnika [7]

Mehanizam odjeljivanja	Nepokretna faza	Pokretna faza	Metoda
Adsorpcija	Krutina	Tekućina	LSC
		Plin	GSC
Razdjeljenje	Tekućina nanešena na čvrst nosač	Tekućina	HPLC, LLC
		Plin	GLC
		Superkritični fluid	SFC
Ionska izmjena	Krutina	Tekućina	IC
Isključenje	Krutina	Tekućina	SEC

Kromatografski postupak može se provoditi na koloni (stupcu) ili na ravnoj plohi (papir ili tanki sloj). Kolonski kromatografski postupci najčešće se koriste u svrhu kvantitativne analize ili u preparativne svrhe. Primjeri kolonskih kromatografskih postupaka su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC), plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*, GC), kromatografija superkritičnim fluidom (eng. *supercritical fluid chromatography*, SFC), ionska kromatografija IC (eng. *ionic chromatography*) te kromatografija isključenjem po veličini SEC (eng. *size-exclusion chromatography*). Zapis analitičkog signala u funkciji vremena zove se kromatogram, na kojem je prikaz kromatografskih krivulja (eng. *peak*) ili pikova pojedinih sastavnica.

Razdvajanje spojeva iz smjese vrši se na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza - nepokretne i pokretne. Nepokretna faza nalazi se u koloni u obliku čestica između kojih prolazi pokretna faza.

Razdvajanje spojeva ovisi o vrsti interakcija između pojedinog spoja i nepokretne, odnosno, pokretne faze. Ako spoj stvara povoljnije interakcije s nepokretnom nego s pokretnom fazom, dulje će se zadržati vezan na koloni, tj. imat će dulje vrijeme zadržavanja. Spojevi koji su zbog svojih fizikalnih svojstava dobro topivi u pokretnoj fazi imaju kratko vrijeme zadržavanja.

U kromatografiji normalne faze nepokretna faza je polarna, a pokretna faza nepolarna. Nepokretna faza može biti silikagel ili aluminijev oksid, s vezanim hidroksilnim skupinama koje stvaraju polarne interakcije sa spojevima u smjesi. Kao pokretna faza obično se koristi jako nepolarno otapalo, poput heksana. Ovaj način razdvajanja dobar je izbor za lipofilne molekule

koje nisu topive u vodenim otopinama. Kao što joj i samo ime govori, kromatografija reverzne faze koristi obrnuti princip od kromatografije normalne faze, što znači da je nepokretna faza nepolarna, a pokretna faza polarna. Ovaj način razdvajanja prvi je izbor za odjeljivanje neioniziranih i neutralnih molekula topivih u vodi. Ovdje su na silanolne skupine čestica silikagela u nepokretnoj fazi kemijski vezani alkilni lanci, najčešće oktadecilalkil (C18) ili manje lipofilni oktilalkil (C8). Slobodne silanolne skupine 2 mogu stvarati interakcije sa spojevima, produžujući time njihovo vrijeme zadržavanja, a rezultat su nesimetrični pikovi. Pokretna faza obično je na bazi vode, s dodanim slabim organskim otapalom koje se može miješati s vodom, poput acetonitrila ili metanola.

Prilikom razvoja metode postoji niz kromatografskih značajki koje je potrebno optimirati kako bi se postigla željena djelotvornost i preciznost. Sastavni dio svake metode je ispitivanje prikladnosti sustava kako bi se osiguralo da je kromatografski sustav prikladan za određenu namjenu. Značajke koje mogu utjecati na kromatografsko odjeljivanje su sljedeće: sastav, ionska jakost, temperatura i pH pokretne faze; protok pokretne faze; dimenzija kolone, temperatura kolone i tlak; karakteristike nepokretne faze koje uključuju tip kromatografskog nosača, veličinu čestica, poroznost i specifičnu površinu, površinske modifikacije nepokretne faze i stupanj kemijske modifikacije [7].

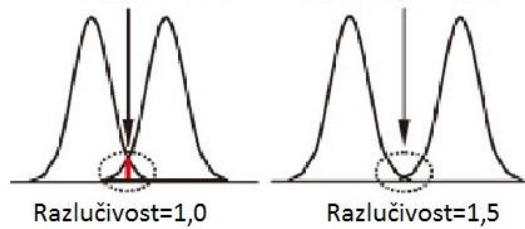
### **2.2.1. Parametri kromatografske separacije**

Prilikom razvoja kromatografske metode postoji niz parametara koje je potrebno optimirati kako bi metoda pa samim time i sama analiza bila što uspješnija. Neki od važnijih faktora kod razvoja metode su njena pouzdanost, cijena te vrijeme trajanja analize. U nastavku su dana tri najvažnija parametra o kojima ovisi razvoj svake uspješne metode [7].

#### **2.2.1.1. Razlučivanje kromatografskih pikova ( $R_s$ )**

Predstavlja kvantitativnu mjeru djelotvornosti separacije dviju kromatografskih krivulja (pikova). Definiramo je kao razliku u vremenu zadržavanja između dva vrha, podijeljenu sa zbrojem širina pikova.

Što je faktor razlučivanja veći, separacija je uspješnija. U pravilu veći faktor razlučivanja uzrokuje produženo vrijeme analize. Stoga je važno naći optimum između potpunosti separacije i potrebnog vremena. Najčešće se kao najmanji prihvatljivi iznos faktora razlučivanja uzima 1.5 kod kojeg dolina između dva pika dodiruje baznu liniju (**Slika 2.**).



**Slika 2.** Razlučivanje i separacija pikova

U većini slučajeva ipak se uzima minimalna vrijednost faktora razlučivanja između 1.75 do 2 kako bi se uklonila eventualna pogoršanja u razdvajanju.

Jednadžba za računanje faktora razlučivanja je

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)} \quad (1)$$

gdje su  $t_1$  i  $t_2$  vremena zadržavanja pikova koje promatramo, a  $w_1$  i  $w_2$  širine pikova mjerene na baznoj liniji između tangenata povučenih s obje strane pika [7].

#### 2.2.1.2. Faktor asimetrije ( $A_s$ ) [8]

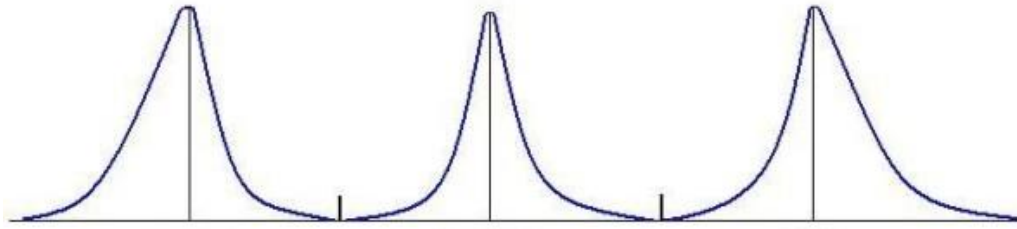
U stvarnom svijetu praktične kromatografije, potpuno simetrični pikovi veoma su rijetki. Puno češće se susrećemo s pikovima koji pokazuju određeni stupanj asimetrije, prikazano na **Slici 3**. simetričnost pika izražavamo faktorom asimetrije ( $A_s$ ). Faktor asimetrije iznosa 1.0 ukazuje na potpuno simetriju, iako je i potpuno prihvatljiv i onaj u iznosu  $1 \pm 0.5$ , ali najčešće ne uvijek dostižan.

Najkorišteniji način računanja faktora asimetrije je onaj prema američkoj farmakopeji te je dan

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (2)$$

Parametri  $a$  i  $b$  su vršne polovične širine pika, na 10 % njegove visine.

Uzroci loše simetrije mogu biti: stavljanje previše uzorka na kolonu, razgradnja uzorka, jaka adsorpcija analita na aktivni dio nepokretne faze, loše „uhvaćen“ analit prilikom unosa na kolonu ili prevelik mrtvi volumen u kromatografskom sustavu.



**Slika 3.** Prikaz asimetrije pikova [8]

Faktor asimetrije također direktno utječe na razlučivanje. Povećanjem faktora asimetrije na vrijednosti veće od 1.5 značajno se ugrožava razlučivanje koja se time smanjuje. Ovaj problem možemo minimizirati korištenjem novijih vrsta punila (*Type B Silica*) ili dodatkom aditiva pokretnoj fazi. Ipak, rijetko je moguće eliminirati ovu pojavu u potpunosti.

### 2.2.1.3. Broj teorijskih odsječaka

Mjera učinkovitosti kolone jest broj teorijskih odsječaka. Teorijski odsječak je područje u kromatografskom sustavu gdje se uspostavlja ravnoteža raspodjele komponente između pokretne i nepokretne faze. Kvaliteta razdvajanja komponenata na koloni ovisi o učestalosti uspostavljanja ravnotežne raspodjele između pokretne i nepokretne faze, dok pokretna faza nosi sastojak kroz kolonu. Budući da u realnom kromatografskom sustavu nema odijeljenih područja gdje bi se uspostavljala ravnoteža, teorijski odsječak je hipotetska veličina.

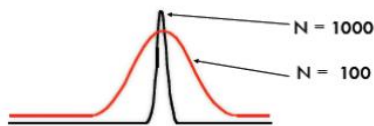
Separacija uzorka je tim učinkovitija što kolona ima više teorijskih odsječaka (**Slika 4.**), a broj odsječaka se povećava smanjenjem čestica samog punila.

Broj teorijskih odsječaka računamo prema formuli:

$$N = \frac{L}{HETP} = 16 \left( \frac{t_r}{w_b} \right)^2 = 5,545 \left( \frac{t_r}{w_h} \right)^2 \quad (3)$$

HETP je visina teorijskog odsječaka,  $t_r$  je vrijeme zadržavanja,  $w_h$  je širina pika na polovici njegove visine, dok je  $w_b$  širina pika na njegovoj osnovici.

Povećanjem broja teorijskih odsječaka, a samim time i efikasnosti kolone, krivulje eluiranja postaju uže, a brzina eluiranja se povećava što direktno smanjuje vrijeme analize [9].



**Slika 4.** Prikaz utjecaja broja teorijskih odsječaka na izgled pika

### 2.2.2. Robusnost

Robusnost je podložnost analitičke metode na promjene uvjeta ispitivanja u odnosu na različitost vrste uzoraka, analita, uvjete pohrane, uvjete okoliša i/ili uvjeta pripreme uzorka pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jest ili uz utvrđene manje izmjene. Na sve uvjete koji bi u praksi mogli biti podložni promjenama, a mogu utjecati na rezultat analize (npr. stabilnost reagensa, sastav uzorka, pH, temperatura) treba ukazati.

Test robusnosti provodi se s ciljem provjere pouzdanosti metode na promjenu različitih parametara. Prva faza provođenja testa robusnosti uključuje koje parametre je potrebno testirati. Parametre možemo podijeliti u dvije skupine:

- operativni parametri (analitički/operativni postupak)
- okolišni parametri (uvjeti okoliša)

Testiranje robusnosti iznimno je poželjno (**Tablica 2.**) budući da daje naznaku srednje preciznosti i ponovljivosti koja se može očekivati od metode, jer se procjenjuje njena sposobnost da podnese promjene koje se susreću u različitim laboratorijima. Omogućuje postavljanje ograničenja za sve parametre metode te ako su vrlo uski, u protokolu se podvlače dopuštena ograničenja [10].

**Tablica 2.** Prikaz potrebnih kriterija za razvoj pouzdane metode

<b>Parametri kromatografske metode</b>	<b>Kriterij</b>
Faktor razlučivanja	$R_s \geq 2$
Faktor simetrije	$A_s \leq 1.5$
Broj teorijskih tavana	Što veći
Robusnost	test robusnosti

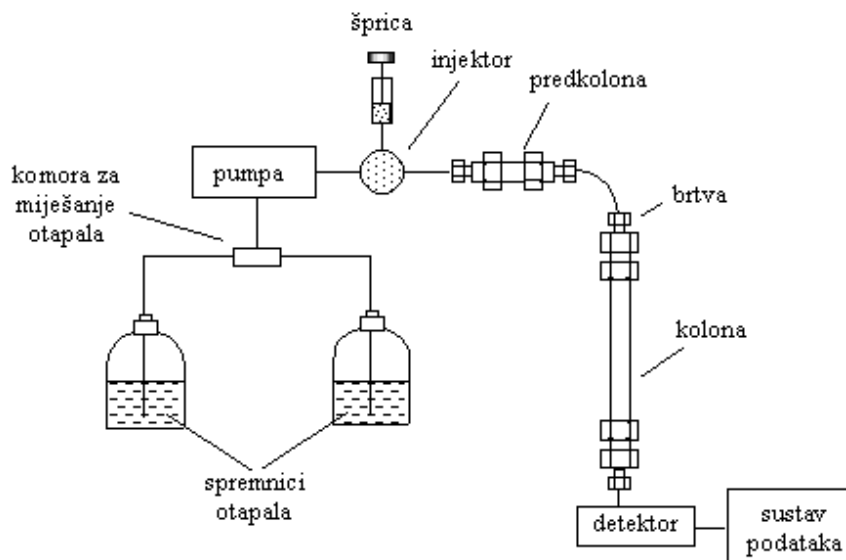
### **2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) metoda je koja se koristi u analitičke i preparativne svrhe. Kao i ostale kromatografske metode, temelji se na razdvajanju komponenata smjese kako bi se traženi analit mogao detektirati. U odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju, u metodi HPLC pokretna faza protječe kroz kolonu pod visokim tlakom, čime je skraćeno trajanje metode i znatno poboljšano razdvajanje komponenata smjese [11].

#### **2.3.1. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti**

Instrumenti za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (**Slika 5.**) pokazali su se kao jedan od najkorisnijih alata za područja kao što su prirodne znanosti, farmaceutska industrija, petrokemija, analiza okoliša i još mnogo toga.

Glavni dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti su: spremnik za pokretnu fazu, pumpa, sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor, spremnik za otpad i uređaj za zapis [11].



**Slika 5.** Shematski prikaz tekućinskog kromatografa [12]

Razlikujemo nekoliko vrsta detektora. UV/Vis detektor može snimati jednu odabranu valnu duljinu ili više njih, odnosno cijeli spektar od 190-800 nm. Takav UV detektor se sastoji od niza dioda (engl. *diode array detector*, DAD) te istovremeno pokriva široko UV/Vis područje valnih duljina s razlučivanjem od 1 nm. Primjenjuje se za analizu uzoraka u kojima spojevi imaju veliku razliku u apsorpciji ili kod uzoraka kod kojih se kromatografske krivulje preklapaju ali spojevi imaju različiti UV spektar, stoga služi i za identifikaciju prema UV spektru. Elektrokemijski detektor mjeri struju koja teče između radne i pomoćne elektrode, a struja nastaje zbog toga što odijeljeni analiti oksidiraju ili reduciraju promjenom potencijala između radne i referentne elektrode. Detektor indeksa loma mjeri promjene u indeksu loma pokretne faze prolaskom analita. Fluorescencijski detektor mjeri fluorescencijsku emisiju nakon pobuđivanja analita određenom valnom duljinom. Za strukturnu karakterizaciju onečišćenja često se koristi spregnuta tehnika tekućinske kromatografije sa spektrometrom masa (engl. *liquid chromatography - mass spectrometry*, LC-MS) kada se analit detektira detektorom masa [13].

#### 2.4. Kvaliteta ugrađena u dizajn

Kvaliteta ugrađena u dizajn (eng. *Quality by Design*, QbD) sustavni je pristup razvoju lijekova koji započinje s unaprijed definiranim ciljevima koristeći se znanstvenim činjenicama i primjenjujući postupke upravljanja rizicima kako bismo stekli bolje razumijevanje i kontrolu procesa. Princip QbD-ija razvija se u različitim granama farmaceutske industrije. To uključuje



primjenu kod razvoja procesa malih molekula, uključujući sintezu aktivne farmaceutske komponente (eng. *active pharmaceutical ingredient*, API).

Mogu se uvesti dva ključna pojma koja pomažu u provedbi i razumijevanju QbD-ija. Prvi koncept je „prostor dizajna“ koji definiramo kao višedimenzionalnu kombinaciju atributa i/ili parametara koji ukazuju na osiguranje kvalitete. Prostor dizajna kod farmaceutskog postupka proizvodnje lijekova uglavnom uključuje ulazni materijal, procesnu jedinicu te izlazni produkt. Izmijenjena definicije prostora dizajna predložena je za analitičke metode, pri čemu prostor dizajna uključuje bilo koju kombinaciju ulaznih varijabli koja osigurava kvalitetu podataka dobivenih određenom metodom. Sljedeći važan koncept je strategija upravljanja. Svrha strategije upravljanja je osigurati konačnu kvalitetu proizvoda. Strategija upravljanja dobiva se razumijevanjem procesa dobivenog oblikovanjem prostora dizajna [14].

Farmaceutska industrija trenutno prihvaća QbD koncept kako bi poboljšala robusnost proizvodnog procesa te kontinuirano poboljšala kvalitetu proizvoda i produktivnost. Potencijalne dobrobiti usvajanja ovog koncepta uključuju:

- omogućavanje kontinuiranog poboljšanja i tehnološke inovacije,
- učinkovitije korištenje industrijskih i regulatornih resursa,
- poboljšana robusnost metode kroz životni ciklus proizvoda i
- bolje razumijevanje i poboljšanje analitičkih metode

Principi QbD-ija mogu biti korišteni tijekom razvoja metode i njene validacije kako bi se osigurao ispravan izbor analitičko-mjerne tehnike te udovoljilo predviđenim zahtjevima izvedbe. Tradicionalni pristup razvoju metode, s druge strane, prilično je nesiguran zbog visokog stupnja varijabilnosti uključenog u svaku fazu [15]. Usporede tradicionalnog i QbD pristupa razvoju metode prikazana je u **Tablici 3**.

**Tablica 3.** Komparativni prikaz tradicionalnog i QbD pristupa razvoju metode

<b>Tradicionalni pristup</b>	<b>QbD pristup</b>
Optimalni uvjeti pronalaze se metodom pokušaja i pogreške	Započinje s unaprijed definiranim ciljem
Izvođenje metode ocjenjuje se tijekom validacije	Fokus na izvedbi je tijekom uspostavljanja ATP-a (eng. <i>analytical target profile</i> )
Ograničeno razumijevanje analitičkih varijabli	Sustavna evaluacija pojedinih varijabli i njihovih interakcija
Kvaliteta metode temelji se na rezultatima validaciji	Kvalifikacija izvedbe metode je osiguranje njene kvalitete
Nema prostora za daljnje poboljšanje	Fleksibilnost za implementaciju novih poboljšanja

QbD ima 4 ključne komponente [15]:

#### 1. Definiranje dizajna proizvoda

U ovom koraku određuje se cilj metode i identificiraju se svi kritični parametri metode.

#### 2. Procjena rizika

Ispituju se višedimenzijske kombinacije i interakcije atributa i procesnih parametara kako bi se osigurala kvaliteta. Kritične varijable u metodi se identificiraju tako da se odrede granice do kojih varijacije u metodi mogu utjecati na kvalitetu metode.

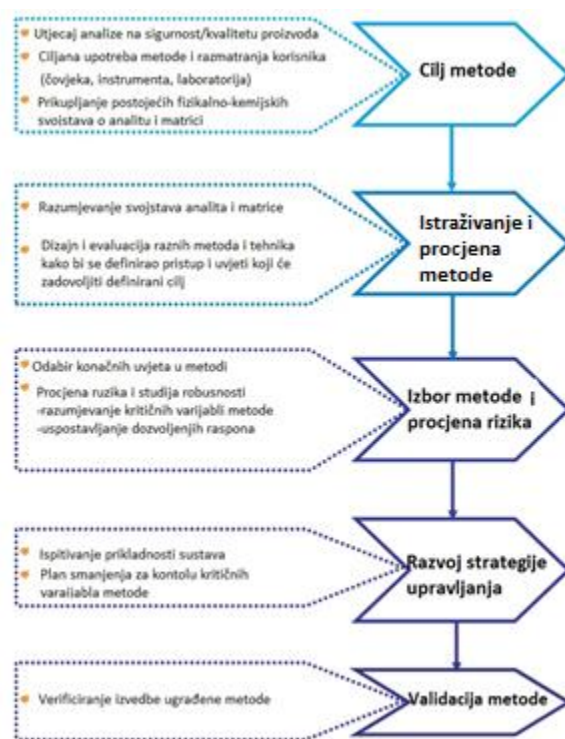
#### 3. Dizajn eksperimenta

Razumijevanje procesa na temelju poznatih varijabli. Uključuje provedbu eksperimenta, dokumentiranje i analizu dobivenih podataka.

#### 4. Strategija kontrole

Omogućuje cjeloviti pregled o tome kako je osigurana kvaliteta proizvoda (**Slika 6**). Za farmaceutsku industriju, sigurnost pacijenta i osiguranje kvalitete proizvoda imaju primarnu važnost, a ti ciljevi se postižu QbD pristupom. Druge prednosti QbD-ija su znanstveno razumijevanje procesa u farmaceutskoj industriji i metoda, procjena rizika temeljena na znanstvenim činjenicama, definirani kritični parametri kvalitete i analizirani njihovi učinci na

konačnu kvalitetu proizvoda. Također, poboljšana je robusnost metoda i procesa, a financijske dobrobiti u poslovanju djeluju kao pokretačka snaga u implementaciji QbD pristupa [16].



**Slika 6.** Shematski prikaz strategije razvoja metode [16]

Principe QbD-ija moguće je primijeniti na razvoj analitičkih metoda. Ovaj pristup može dovesti do boljih analitičkih metoda te pozitivno utjecati na šire aspekte razvoja QbD-ija.

U svijetlu raznolikosti analitičkih metoda koje mogu imati dobrobiti od ovog koncepta, potreban je strukturirani pristup razvoju analitičke metode. Strukturirani koraci počinju definiranjem cilja metode te prikupljanjem osnovnih podataka, zatim sustavno istraživanje i procjena alternativnih metoda, odabir obećavajuće metode koja odgovara definiranom cilju, procjena rizika za metodu uz odgovarajuće alate te u konačnici, razvoj strategije upravljanja kako bi se osigurala izvedba metode [17].

Razvoj farmaceutskog proizvoda primjenom QbD koncepta započinje razumijevanjem i definiranjem ciljnog profila kvalitete proizvoda (engl. *quality target product profile*, QTPP).

Ciljni profil kvalitete proizvoda je skup značajki koje treba postići da bi se osigurala željena kvaliteta, sigurnost i učinkovitost lijeka, uzimajući u obzir način primjene lijeka, farmaceutski oblik lijeka, bioraspoloživost, jakost, stabilnost i pakiranje. Nakon što je ciljni profil kakvoće proizvoda definiran, potrebno je definirati kritična svojstva kvalitete proizvoda (engl. *critical quality attributes*, CQAs). Identificiranje potencijalnih kritičnih svojstava kvalitete je potrebno kako bi se značajke proizvoda koje imaju utjecaj na kvalitetu proizvoda mogle istražiti i kontrolirati. Potencijalna kritična svojstva kvalitete definirana iz ciljnog profila kvalitete proizvoda i/ili na temelju prethodnog iskustva koriste se u usmjeravanju razvoja proizvoda i proizvodnog postupka.

Upravljanje rizicima u kvaliteti može poslužiti za postavljanje liste prioriteta potencijalnih kritičnih svojstava kvalitete. Nakon što su definirana kritična svojstva kvalitete, može se započeti s odabirom proizvodnog postupka koji će ih zadovoljiti. Kritične procesne značajke (engl. *critical process parameters*, CPP) su značajke procesa čija promjenjivost ima utjecaj na kritična svojstva kvalitete te ih stoga treba pratiti i nadzirati kako bi se osiguralo da proces daje proizvod željene kvalitete. Sljedeći element u razvoju prema QbD konceptu je procjena rizika, odnosno povezivanje svojstava polaznih materijala i procesnih značajki s kritičnim svojstvima kvalitete gotovog lijeka. Procjena rizika je dragocjen, znanstveno utemeljen, sustavni postupak koji se koristi za upravljanje rizicima u kvaliteti, a pomaže u identificiranju svojstava materijala i procesnih značajki koje potencijalno utječu na kritična svojstva kvalitete proizvoda. Procjena rizika se, u pravilu, provodi u ranoj fazi farmaceutskog razvoja, te se ponavlja kada se sakupi više informacija i iskustva. Za identifikaciju i određivanje važnosti svojstava koja imaju utjecaj na kvalitetu proizvoda mogu poslužiti alati za procjenu rizika. Početni popis mogućih značajki temeljen je na prethodno stečenom iskustvu i početnim eksperimentalnim podacima i može biti prilično opsežan, a može se mijenjati i rangirati na temelju daljnjih istraživanja. Popis se može dalje doraditi eksperimentima koji utvrđuju utjecaj pojedinih varijabli i potencijalnih interakcija. Kada su definirane važne značajke njihov utjecaj se dalje istražuje, primjerice kombinacijom eksperimentalnog dizajna, matematičkih modela ili studija koje dovode do razumijevanja mehanizma interakcija, kako bi se postiglo bolje razumijevanje procesa.

Za procjenu utjecaja više rangiranih varijabli najčešće se koristi eksperimentalni dizajn koji je strukturirano organizirana metoda za određivanje odnosa između svojstava koji utječu na proces

i rezultata tog procesa. Također je poznat i kao dizajn eksperimenata (engl. *design of experiments*, DOE). Odnos između ulaznih čimbenika procesa (svojstava materijala i značajki procesa) i kritičnih svojstava kvalitete proizvoda može se prikazati prostorom dizajna (engl. *design space*). Prostor dizajna predstavlja višedimenzionalnu kombinaciju i interakciju varijabli (npr. svojstva materijala) i procesnih značajki za koje je pokazano da dosljedno osiguravaju kvalitetu proizvoda. Prostor dizajna može se definirati za pojedinu operaciju proizvodnog procesa ili se može definirati jedinstveni prostor dizajna koji se proteže kroz cijeli proizvodni postupak. Rad unutar prostora dizajna ne smatra se promjenom. Rad izvan prostora dizajna smatra se promjenom i zahtjeva prijavu izmjene regulatornoj agenciji. Prostor dizajna predlaže podnositelj zahtjeva i on podliježe regulatornoj ocjeni i odobrenju. Nakon uspostavljanja prostora dizajna slijedi definiranje strategije kontrole. Strategija kontrole mora biti definirana na način da osigurava dosljednu proizvodnju proizvoda zadane kvalitete. Kontrolu treba definirati na temelju proizvoda, razumijevanja formulacije i procesa i ona minimalno treba uključivati kontrolu kritičnih procesnih značajki i svojstava materijala. Zadnji korak je upravljanje životnim ciklusom lijeka i kontinuirano poboljšanje. Može se pratiti učinkovitost procesa kako bi se osiguralo da proces dosljedno osigurava kvalitetni proizvod kako je i predviđeno prostorom dizajna. Učinkovitost procesa proizvodnje može se pratiti trend analizom, a za prostore dizajna koji su definirani pomoću matematičkih modela može biti korisna periodična provjera kako bi se osigurala učinkovitost modela. Smjernica predlaže i alternativni pristup validaciji procesa kroz proces kontinuirane verifikacije kojim se proizvodni proces kontinuirano prati i ocjenjuje [15].

## **2.5. Kvaliteta ugrađena u dizajn u razvoju analitičkih metoda**

Analitičke metode su među najkritičnijim procesima u razvoju i proizvodnji lijekova. One igraju ključnu ulogu u drugim proizvodnim procesima kroz sve faze životnog ciklusa lijeka. Nužno je stoga da analitička metoda bude točna, precizna i pouzdana.

Dosadašnji razvoj analitičkih metoda tekućinske kromatografije uglavnom se temeljio na tradicionalnom pristupu ispitivanja kvalitete metode nakon razvoja i na načelu pokusa i pogreške mijenjanjem jednog faktora u vremenu (engl. *one factor at time*, OFAT) sve dok se ne bi postiglo najbolje razlučivanje pikova [14]. Ovakvim pristupom se mogu razviti odgovarajuće metode, no njegovi nedostaci su nedovoljno istražena kombinacija svih značajki koji mogu utjecati na

kromatografsko razdvajanje, ograničeno razumijevanje sposobnosti metode, i nemogućnost upravljanja rizicima u kvaliteti. Dakle, to može biti vrlo dugotrajno, posebno kada se ispituju manje relevantni radni parametri metode sa zanemarivim učinkom na razdvajanje. Uz to, interakcije između parametara, koje se mogu pokazati važnima, rijetko se uzimaju u obzir za proučavanje. Stoga, razvoj OFAT pristupom često dovodi do neoptimizirane metode s nedovoljnim razumijevanjem učinaka višeparametarske interakcije, što u konačnici rezultira radnim svojstvima nerobusne metode.

QbD koncept predstavlja sustavni i znanstveni pristup razvoju metoda HPLC (**Slika 7.**) omogućujući ranije razumijevanje i identifikaciju varijabli koje utječu na izvedbene značajke metode. QbD omogućuje istovremeno optimiranje procesa razdvajanja i robusnosti metode te implementaciju strategije kontrole koja se temelji na boljem razumijevanju metode. U kontekstu tekućinske kromatografije, QbD koncept omogućuje simultano optimiranje procesa razdvajanja i robusnosti metode kroz cijelu eksperimentalnu domenu.



**Slika 7.** QbD tijekom razvoja analitičkih metoda (modificirano prema[18])

QbD koncept primijenjen u životnom ciklusu analitičkih metoda naziva se analitička kvaliteta utemeljena kroz dizajn (engl. *Analytical Quality by Design*, AQbD). AQbD omogućuje razvoj

robusnih i jeftinih analitičkih metoda koje će se primjenjivati tijekom cijelog životnog ciklusa lijeka i regulatornu fleksibilnost kroz definirani prostor dizajna, odnosno radno područje dizajna metode. S druge strane, AQbD se odnosi na primjenu analitičkih metoda u QbD razvoju lijekova. Kako je navedeno u ICH smjernici za farmaceutski sustav kvalitete [10] analitičke metode su ključni dio strategije kontrole pa primjena AQbD koncepta u proizvodnim postupcima osigurava da će unaprijed definirani zahtjevi za učinkovitost i kvalitetu proizvoda biti zadovoljeni. Uloga analitičkih metoda u razvoju lijekova je važna kako bi se razumjele međusobne interakcije komponenata lijeka, za mjerenje kritičnih svojstava kvalitete tijekom pokusa, proizvodnog procesa i kontrole te za kontinuiranu provjeru valjanosti kako bi se pratili trendovi u kvaliteti proizvoda. S obzirom da razvoj lijeka i njegova proizvodnja ovise o analitičkim metodama, osim primjene tradicionalno razvijenih analitičkih metoda u QbD razvoju lijekova povećava se potreba za strogim i sustavnim razvojem analitičkih metoda što dovodi do primjene QbD koncepta i u razvoju samih metoda. AQbD svojom metodologijom slijedi postojeći proces razvoja analitičkih metoda uz provođenje nekih dodatnih koraka u razvoju i korištenjem dodatnih alata. Ti alati omogućuju bolju procjenu dobivenih podataka i olakšavaju odabir kontrola koje je potrebno postaviti da bi metoda bila učinkovita. Primjena QbD načela u razvoju metoda je usmjerena na koncept ugradnje kvalitete u metodu tijekom njenog razvoja, za razliku od ispitivanja kvalitete metode nakon razvoja [16].

### **2.5.1. Teorijska pozadina AQbD-ija**

Prvi korak u AQbD jest unaprijed definirati zahtjev za metodom nazvan analitički ciljni profil (eng. *analytical target profile*, ATP). ATP je skup ciljeva analitičke metode koji definiraju što će se mjeriti te kriterije učinka. Potrebno ga je definirati prije početka razvoja metode. Nakon što ga odobre regulatorna tijela, ATP omogućuje veće kontinuirano poboljšanje metode podržavajući regulatornu fleksibilnost i treba ga razmotriti u svim fazama životnog ciklusa analitičkog postupka.

Nakon što je cilj analitičke metode definiran, potrebno je odabrati analitičku tehniku koja će ispuniti njegove zahtjeve. Postoje mnoge tehnike s određenim principima rada, međutim, HPLC se smatra najrelevantnijim. Ima veliki broj radnih varijabli, te je sposobna pružiti precizne i točne rezultate ako je optimirana na odgovarajući način i predviđenu svrhu.

Sljedeći korak je odabir kritičnih atributa metode, (eng. *critical material attributes*, CMA), odgovori izmjereni kako bi se kontrolirala izvedba metode. Budući da CMA predstavljaju snažnu vezu između predviđene svrhe metode i kriterija izvedbe prema ATP-u, mogu se tretirati kao specifikacije metode. CMA ovise o analitičkoj tehnici, principu rada i namjeni metode. Obično su povezane sa selektivnošću, preciznošću, osjetljivošću i točnošću metode.

Za HPLC metodu identifikacije onečišćenja, pri čemu se ocjenjuje kvaliteta razdvajanja, uobičajeni ključni CMA je razlučivanje. S druge strane, prilikom određivanja sadržaja HPLC metodom, točan rezultat često ovisi o obliku pika, pozivajući se na faktor asimetričnosti te broj teorijskih tavana kao dva važna CMA. Ovisno o odabranoj analitičkoj tehnici, mnogi različiti parametri mogu biti uključeni u izvedbu metode čija varijabilnost može imati značajan utjecaj na odabrane CMA-ove. U slučaju HPLC-a, razvoj metode može biti poprilično izazovan, budući da postoji nekoliko takvih parametara uključujući pH i koncentraciju pokretne faze, vrstu organskog otapala, temperaturu kolone, vremenski gradijent itd. Analitičar, stoga mora uložiti napor i znanje u ranu kritičnu procjenu parametara metode kako bi se identificirali parametri visokog rizika, odnosno one koje predstavljaju potencijalni rizik za metodu. Sve ove smjernice dale su poticaj znanstvenoj zajednici da istraži AQbD (**Slika 8.**). Procjena rizika može se provesti pomoću nekoliko alata. Jedan od najkorištenijih alata za procjenu je dijagram 'riblje kosti' ili Ishikawin dijagram koji identificira potencijalne čimbenike i raspoređuje rizike povezane s faktorima u kategorije povezane s instrumentima, materijalima, metodama, mjerenjima, laboratorijskom okolinom i ljudskim čimbenicima [19].



**Slika 8.** Utjecaj AQbD principa na poboljšanje razvoja metode [20]



Razvoj analitičke metode obično se provodi u dvije faze. U prvoj fazi provodi se odabir kolona s najboljom selektivnosti. Druga faza uključuje provođenje eksperimenata s ostalim instrumentalnim parametrima za koje se smatra da utječu na razdvajanja sastavnica. Zajednički cilj obje faze je pronaći najbolje postavke koje osiguravaju optimalne kromatografske rezultate. U tradicionalnom pristupu razvoju metode pojedinačno su se mijenjali pojedini parametri, a svi ostali su bili konstantni. Nedostatak tog pristupa je što se parametri koji najviše utječu na djelotvornost kromatografije (npr. kolona, pH, pokretna faza) teže i sporije prilagode. Noviji uređaji omogućuju lakše variranje tih parametara jer istodobno mogu koristiti više kolona i kanala za pokretne faze. U AQbD pristupu varira se kombinacija različitih parametara kroz niz eksperimenata pomoću kojih se opsežno ispituje područje eksperimenta. Dobiveni podaci statistički se obrađuju, no često dolazi do gubitka podataka u ključnim kromatografskim parametrima zbog velikih promjena u pikovima i zajedničkog eluiranja sastavnica uzorka. Zbog toga se odabir najboljeg kromatograma često svodio na vizualan pregled [21].

### **2.5.2. Fusion AE™**

Fusion AE™ je prva automatizirana programska platforma koja služi za razvoj i optimizaciju analitičke metode. Ona integrira učinkovita eksperimentalna pomagala u jednu automatiziranu okolinu. Fusion AE™ sadrži pet radnih okolina:

- Dizajn eksperimenta
- Unos i analiza podataka
- Grafički odziv
- Optimizacija
- Izvještaj

Postupak se sastoji od dvije faze. U prvoj fazi odabire se i identificira najprikladnija kolona, pokretna faza, pH te se aproksimiraju eksperimentalni uvjeti. U drugoj fazi, fazi optimizacije, koristi se odabrana kolona i pokretna faza s finijom varijacijom gradijenta, temperature kolone i protoka [22].

## 2.6. Validacija analitičke metode

Validacija metode jedna je od međunarodno priznatih oblika osiguranja kvalitete u analitičkoj kemiji. Pouzdana analitička metoda nužna je kako bi bila usklađena s nacionalnim i međunarodnim regulatornim propisima u svim područjima analize. Sukladno tome, međunarodno je priznato da laboratorij mora poduzeti odgovarajuće mjere kako bi se osiguralo da pruža rezultate prikladne kvalitete.

Stoga, validacija analitičkih postupaka usmjerena je na četiri najčešća tipa testova, a to su:

- Identifikacijski testovi
- Kvantitativni testovi za određivanje sadržaja onečišćenja
- Granični testovi za kontrolu onečišćenja
- Kvantitativni testovi u uzorcima aktivnog farmaceutskog sastojka ili konačnog produkta ili neke druge odabrane komponente u sastavu lijeka

Identifikacijski testovi namijenjeni su osiguranju ispravne identifikacije analita u uzorku. Najčešće se postiže usporedbom svojstava uzorka (kemijska reaktivnost, spektar, kromatografsko ponašanje i sl.) s referentnim standardom.

Testovi onečišćenja mogu biti kvantitativni testovi ili granični testovi za onečišćenje u uzorku. Oba testa precizno određuju čistoću uzoraka.

Određivanje sadržaja namijenjeno je određivanju količine analita u danom uzorku. Sadržaj predstavlja kvantitativnu mjeru glavnih komponenti uzorka [22].

Izvedbene karakteristike koje se ispituju tijekom validacije metode su:

- Specifičnost/selektivnost
- Linearnost
- Točnost
- Preciznost (ponovljivost i intermedijarna preciznost)
- Granica detekcije
- Granica kvantifikacije
- Mjerno područje

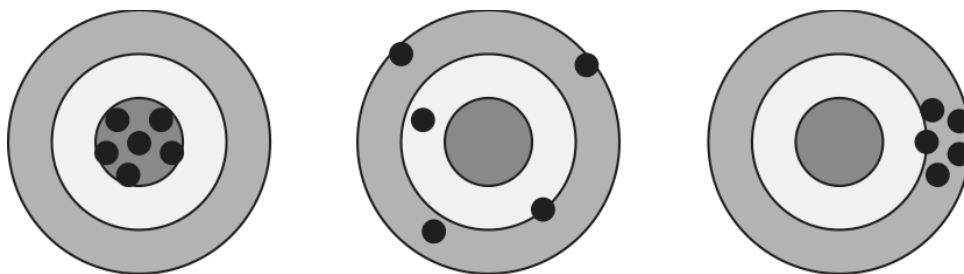
### 2.6.1. Specifičnost/selektivnost

Specifičnost je sposobnost nedvosmislene procjene analita u prisutnosti komponente za koju se može očekivati da će biti prisutna. To obično uključuje onečišćenja, degradacijske produkte, matricu itd. Specifična metoda je ona koja je odgovorna samo za supstancu koja nas zanima, tj. imamo mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u složenoj matrici uzorka, dok je selektivna metoda ona kojom identificiramo traženi analit nakon prethodnog uklanjanja interferencija [24].

### 2.6.2. Točnost i preciznost

Točnost analitičkog postupka odražava stupanj podudaranja između prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti koja je dobivena određenim analitičkim postupkom. Točnost, stoga, opisuje koliko je rezultat blizak stvarnoj vrijednosti. Preciznost analitičkog postupka izražava bliskost slaganja između niza mjerenja dobivenih analizom više homogenih uzoraka pri definiranim uvjetima. Obično se izražava kao odstupanje, standardno odstupanje ili koeficijent varijacije niza mjerenja.

Mjerni sustav može biti točan, ali ne precizan, zatim precizan, ali ne i točan te ni točan niti precizan [23] čiji prikaz vidimo na **Slici 9**.



**Slika 9.** Prikaz razlike između točnosti i preciznosti [25]

### 2.6.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije nekog analitičkog postupka predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati kao točna vrijednost. Prema IUPAC-u granica detekcije je najmanja koncentracija ili apsolutna vrijednost analita koji je značajno veća od signala koji potječe od slijepe probe.

Granica kvantifikacije je parametar kvantitativnih testova za niske koncentracije analita u uzorcima te se određuje kod metoda za određivanje onečišćenja i produkata razgradnje.

Granice detekcije i kvantifikacije računaju se prema slijedećim jednadžbama:

$$\text{granica detekcije} = \frac{3.3 * s}{a} \quad (3)$$

$$\text{granica kvantifikacije} = \frac{10 * s}{a} \quad (4)$$

Pri čemu je  $s$  standardno odstupanje kalibracijskog pravca ili slijepe vrijednosti, a  $a$  nagib pravca [10].

### 2.6.4. Linearnost

Linearnost analitičkog postupka je njegova sposobnost da se unutar danog raspona dobiju rezultati ispitivanja koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Pri određivanju linearnosti potrebno je analizirati kalibracijske standarde na najmanje pet koncentracijskih razina. Gledajući na danu definiciju s analitičkog stajališta, to znači da je analitički signal linearna funkcija količine ili koncentracije analita u uzorku. Evaluacija dobivenih rezultata može se provesti vizualno, odnosno linearnom regresijskom analizom (metodom najmanjih kvadrata). Ukoliko postoji linearna ovisnost, prilikom dokumentacije potrebno je navesti koeficijent korelacije ili koeficijent determinacije, odsječak na  $y$  osi, nagib kalibracijskog pravca te rezidualne dobivenog pravca [23].

### **2.6.5. Mjerno područje**

Mjerno područje predstavlja interval između gornje i donje koncentracije analita u uzorku u kojem metoda daje rezultate prihvatljive preciznosti i točnosti. Donja granica intervala je zapravo granica kvantifikacije, a gornja granica je koncentracija pri kojoj su opažena značajna odstupanja u analitičkoj osjetljivosti. Između tih dviju granica, tj. u navedenom rasponu, instrument kojim se izvodi metoda pokazuje određenu ovisnost koja može biti linearna, kvadratna ili logaritamska [10].

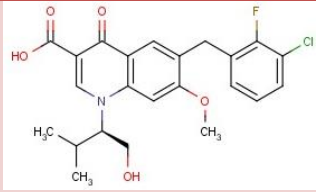
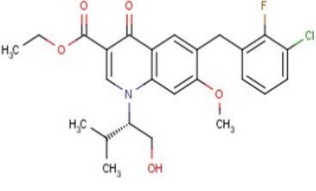
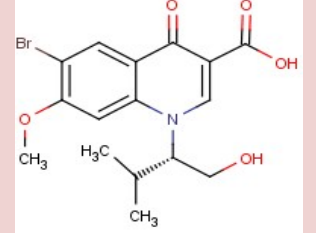
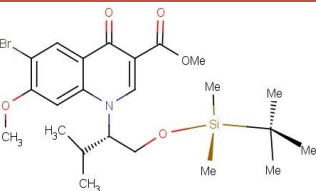
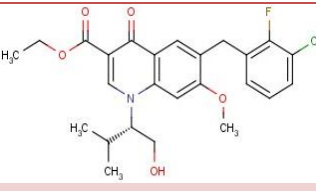
### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Elvitegravir i onečišćenja

U sljedećoj tablici (**Tablica 4.**) navedene su strukture analiziranih spojeva.

**Tablica 4.** Strukture analiziranih spojeva

Oznaka uzorka	Prikaz strukture	Molarna masa	Formula	Proizvođač
ELV		447.884	$C_{23}H_{23}ClFNO_5$	Tapi Pliva Hrvatska
ELV IMP1		461.910	$C_{24}H_{25}ClFNO_5$	Tapi Pliva Hrvatska
ELV IMP2		384.222	$C_{16}H_{18}BrNO_5$	Tapi Pliva Hrvatska
ELV IMP3		512.509	$C_{23}H_{34}BrNO_5Si$	Tapi Pliva Hrvatska
ELV IMP4		475.937	$C_{25}H_{27}ClFNO_5$	Tapi Pliva Hrvatska

### 3.1.2. Kemikalije

Popis korištenih kemikalija te njihovih specifikacija dan je u **Tablici 5**.

**Tablica 5.** Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač	Godina isteka
Mravlja kiselina	99 %	Biosolve Chimie	6/2022
Triflouroctena kiselina	>99 %	Honeywell Fluka	10/2021
Amonijev formijat	>99 %	Honeywell Fluka	10/2023
Acetonitril	>99.95 %	VWR Chemicals BDH	10/2023
Metanol	100.00 %	VWR Chemicals BDH	10/2025

### 3.1.3. Kromatografske kolone

Popis korištenih kromatografskih kolona dan je u **Tablici 6**.

**Tablica 6.** Popis korištenih kromatografskih kolona

Naziv kolone	Vrsta punjenja	Dimenzije kolone/mm	Proizvođač	Veličina čestica/ µm
Acquity UPLC BEH Shield	RP 18	2.1 x 50	Waters	1.7
RRHD	SB - Phenyl	2.1 x 100	Agilent	1.8
Kinetex	PFP	4.6 x 150	Phenomenex	2.6
Acquity CSH	Flouro-Phenyl	2.1 x 100	Waters	1.7

## 3.2. Instrumenti

U nastavku slijedi popis korištenih instrumenata te pripadajuće slike (**Slike 10-14.**)

Tehnička vaga EX 224 proizvođača Ohaus Explorer 0.1 mg -220 g x 0.01 g (Parsippany, New Jersey, SAD)



**Slika 10.** Tehnička vaga

Analitička mikrovaga XPR proizvođača Mettler Toledo (Columbus, Ohio, SAD) mjernog područja od 1 mg – 2.1 x 1 $\mu$ g



**Slika 11.** Analitička mikrovaga

pH-metar 780 proizvođača Metrohm (Herisau, Švicarska)





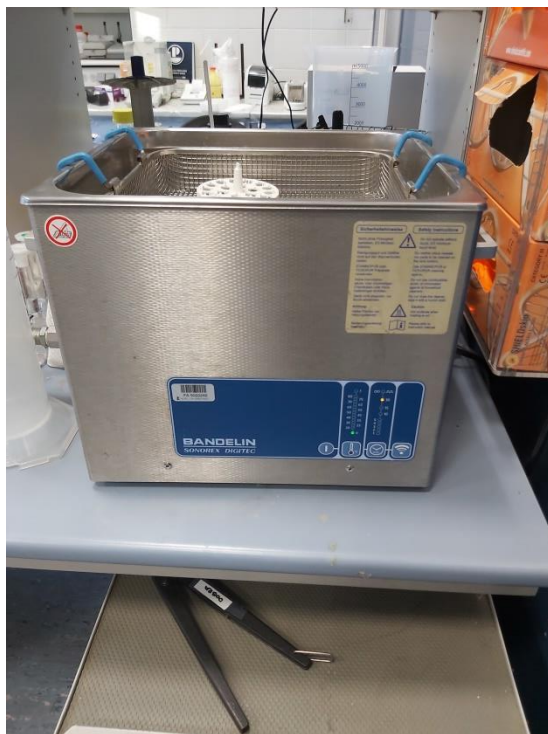
**Slika 12.** pH-metar

Uređaj za visokopročišćenu vodu Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System, Merck (Kenilworth, New Jersey, SAD)



**Slika 13.** Uređaj za visokopročišćenu vodu

Ultrazvučna kupelj Sonorex Digitec proizvođača Bandelin (Berlin, Njemačka)



**Slika 14.** Ultrazvučna kupelj

### **3.2.1. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti**

UHPLC Agilent Technologies (Santa Clara, California, SAD) Infinity 1290 II s binarnom pumpom (**Slika 15.**)



**Slika 15.** UHPLC uređaj

Kod provedbe analize korišten je UHPLC uređaj proizvođača Agilent Technologies. Na slici je vidljivo kako se na vrhu uređaja nalaze spremnici pokretnih faza. Pumpa se nalazi ispod spremnika pokretnih faza te stvara pritisak na otapalo kako bi moglo proći kroz kolonu. Najveći radni tlak ovog uređaja je oko 1200 bara. Zatim slijedi injektor koji ubrizgava analit u tok pokretne faze, nakon čega dolazi kromatografska kolona na kojoj se odvija separacija analita primjenom različitih kemijskih i fizikalnih parametara te UV detektor kojim se otkrivaju spojevi koji mogu apsorbirati UV zračenje.

### **3.3. Metode rada**

#### **3.3.1. Priprema standardnih otopina elvitegravira i onečišćenja**

Za optimizaciju metode korištena je otopina smjese svih ispitivanih analita pripremljena tako da je izvagan 1 mg elvitegravira te njegova četiri poznata onečišćenja na analitičkoj mikrovagi proizvođača Mettler Toledo. Tikvica volumena 50 mL dopunjena je do oznake diluentom (acetonitrilom) čime je dobivena koncentracija elvitegravira te njegovih onečišćenja iznosila 0.02 mg/mL. Tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj kroz pet minuta.

Za validaciju optimirane metode pripremljeno je pet otopina, elvitegravira te njegova četiri onečišćenja, koncentracije 0.02 mg/mL. Na analitičkoj mikrovagi vagi Mettler Toledo UMX2 izvagano je po 1 mg elvitegravira. onečišćenja 1, 2, 3 i 4 u tikvice od 50 mL. Tikvice su nadopunjene s diluentom (acetonitril) te stavljene u ultrazvučnu kupelj Bandelin Sonorex na pet minuta. Također, pripremljena je smjesa elvitegravira i njegova četiri onečišćenja koncentracije 0.03 mg/mL. U tikvicu od 100 mL izvagano je po 3 mg elvitegravira te njegovih poznatih onečišćenja. Tikvica je nadopunjena diluentom do oznake te stavljena pet minuta u ultrazvučnu kupelj. Iz otopine smjese svih analita koncentracije 0.03 mg/mL pripremljene su otopine koncentracija 0.025 mg/mL, 0.02 mg/mL, 0.015 mg/mL te 0.01 mg/mL razrjeđenjem s diluentom. Iz inicijalne tikvice od 100 mL u kojoj je pripremljena otopina svih analita uzeto je 25 mL te dodano u tikvicu od 30 mL i dopunjeno do oznake s diluentom čime je dobivena otopina koncentracije 0.25 mg/mL. Na isti način pripravljene su slijedeće otopine dodatkom 20 mL, 15 mL i 10 mL (iz prethodno pripravljene otopine) u tikvice od 25 mL, 20 mL te 15 mL. Dobivene otopine korištene su u validaciji metode za određivanje linearnosti i ponovljivosti. U svrhu ispitivanja ponovljivosti sustava te ponovljivosti metode pripremljeno je šest otopina elvitegravira koncentracije 0.02 mg/mL.

### 3.3.2. Priprema pokretne faze

Pripremljena je 1 L otopine koncentracije 10 mmol/L amonijevog formijata. U odmjernu tikvicu odvagano je 0.63 g amonijevog formijata ( $\text{NH}_4\text{HCO}_2$ ) na tehničkoj vagi Ohaus Explorer te nadopunjeno do oznake visokopročišćenom MilliQ vodom proizvođača Merck. Pripremljena otopina stavljena je u ultrazvučnu kupelj Sonorex Digitec na pet minuta nakon čega je uslijedilo podešavanje pH-vrijednosti razrijeđenom mravljom kiselinom. pH pufera podešen je na pH-metru na vrijednost 4.0.

Također, pripremljene su 0.1 % mravlja kiselina te 0.1 % trifluorocetna kiselina. 0.1 % mravlja kiselina pripremljena je dodatkom 1 mL mravlje kiseline, pomoću staklene pipete, čistoće 99 % u odmjernu tikvicu od 1000 mL te dopunjeno do oznake viskopročišćenom MilliQ vodom. 0.1 % trifluorocetna kiselina dobivena je jednakim postupkom, koristeći 1 mL trifluorocetne kiseline čistoće > 99 %. Organske pokretne faze koje smo izabrali za provedbu eksperimenta su metanol i acetonitril.

### 3.3.3. Razvoj i optimizacija metode

Za razvoj i optimizaciju metode korištena je otopina smjese svih analita (opisana u poglavlju 2.3.1.) Eksperimenti su provedeni prema planu danom u **Tablici 7**.

**Tablica 7.** Plan provedbe eksperimenta

-----	Protok pumpe/(mL/mi n)	Vremenski gradijent/(mi n)	AC N (%)	Temperatu ra kolone/ (°C)	p H /(*) )	Vrsta kolone/ (*)
Kondicioniran je kolone - 1	0.30	0.2	25.0	40.0	2.0	SB-Phenyl
Kondicioniran je kolone - 2	0.30	0.2	25.0	40.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
Kondicioniran je kolone - 3	0.30	0.2	25.0	40.0	2.0	BEH Shield RP 18

<b>Kondicioniran je kolone - 4</b>	0.30	0.2	25.0	40.0	2.0	HSS PFP
<b>1</b>	0.20	6.3	25.0	40.0	2.0	BEH Shield RP 18
<b>2</b>	0.20	10.0	100. 0	40.0	2.0	SB-Phenyl
<b>3</b>	0.20	10.0	0.0	40.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>4</b>	0.20	5.0	50.0	40.0	2.0	HSS PFP
<b>5</b>	0.30	10.0	100. 0	40.0	2.0	BEH Shield RP 18
<b>6</b>	0.30	7.5	0.0	40.0	2.0	SB-Phenyl
<b>7</b>	0.40	5.0	100. 0	40.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>8</b>	0.40	5.0	0.0	40.0	2.0	BEH Shield RP 18
<b>9</b>	0.40	10.0	0.0	40.0	2.0	HSS PFP
<b>10</b>	0.20	10.0	0.0	40.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone - 5</b>	0.30	0.2	50.0	40.0	2.7	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone - 6</b>	0.30	0.2	50.0	40.0	2.7	BEH Shield RP 18
<b>11</b>	0.40	5.0	50.0	40.0	2.7	SB-Phenyl
<b>12</b>	0.20	10.0	50.0	40.0	2.7	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone - 7</b>	0.30	0.2	25.0	40.0	4.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone - 8</b>	0.30	0.2	25.0	40.0	4.0	CSH Fluoro- Phenyl

<b>Kondicioniran je kolone - 9</b>	0.30	0.2	25.0	40.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone-10</b>	0.30	0.2	25.0	40.0	4.0	HSS PFP
<b>13</b>	0.40	6.3	25.0	40.0	4.0	HSS PFP
<b>14</b>	0.20	8.8	25.0	40.0	4.0	SB-Phenyl
<b>15</b>	0.20	5.0	100. 0	40.0	4.0	SB-Phenyl
<b>16</b>	0.20	10.0	100. 0	40.0	4.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>17</b>	0.20	5.0	0.0	40.0	4.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>18</b>	0.20	5.0	0.0	40.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>19</b>	0.20	10.0	0.0	40.0	4.0	HSS PFP
<b>20</b>	0.40	10.0	100. 0	40.0	4.0	SB-Phenyl
<b>21</b>	0.40	5.0	0.0	40.0	4.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>22</b>	0.40	5.0	100. 0	40.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>23</b>	0.40	10.0	0.0	40.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>24</b>	0.40	7.5	100. 0	40.0	4.0	HSS PFP
<b>25</b>	0.40	8.8	25.0	40.0	4.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>26</b>	0.20	10.0	100. 0	40.0	4.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>Kondicioniran</b>	0.30	0.2	0.0	45.0	2.0	SB-Phenyl

<b>je kolone-11</b>						
<b>27</b>	0.20	5.0	0.0	45.0	2.0	SB-Phenyl
<b>28</b>	0.40	10.0	0.0	45.0	2.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-12</b>	0.30	0.2	50.0	45.0	2.7	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-13</b>	0.30	0.2	50.0	45.0	2.7	CSH Fluoro- Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-14</b>	0.30	0.2	50.0	45.0	2.7	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone-15</b>	0.30	0.2	50.0	45.0	2.7	HSS PFP
<b>29</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	BEH Shield RP 18
<b>30</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	HSS PFP
<b>31</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	CSH Fluoro- Phenyl
<b>32</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	SB-Phenyl
<b>33</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	CSH Fluoro- Phenyl
<b>34</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	BEH Shield RP 18
<b>35</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	HSS PFP
<b>36</b>	0.20	10.0	100. 0	45.0	2.7	HSS PFP
<b>37</b>	0.30	7.5	50.0	45.0	2.7	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-16</b>	0.30	0.2	0.0	45.0	4.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-17</b>	0.30	0.2	0.0	45.0	4.0	HSS PFP
<b>38</b>	0.40	5.0	0.0	45.0	4.0	HSS PFP

<b>39</b>	0.20	7.5	50.0	45.0	4.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-18</b>	0.30	0.2	100. 0	50.0	2.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-19</b>	0.30	0.2	100. 0	50.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-20</b>	0.30	0.2	100. 0	50.0	2.0	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone-21</b>	0.30	0.2	100. 0	50.0	2.0	HSS PFP
<b>40</b>	0.20	5.0	100. 0	50.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>41</b>	0.20	5.0	100. 0	50.0	2.0	BEH Shield RP 18
<b>42</b>	0.20	5.0	50.0	50.0	2.0	SB-Phenyl
<b>43</b>	0.20	10.0	50.0	50.0	2.0	HSS PFP
<b>44</b>	0.30	5.0	0.0	50.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>45</b>	0.30	10.0	0.0	50.0	2.0	BEH Shield RP 18
<b>46</b>	0.40	10.0	100. 0	50.0	2.0	CSH Fluoro- Phenyl
<b>47</b>	0.40	5.0	100. 0	50.0	2.0	HSS PFP
<b>48</b>	0.40	7.5	100. 0	50.0	2.0	SB-Phenyl
<b>49</b>	0.40	6.3	25.0	50.0	2.0	HSS PFP
<b>50</b>	0.40	6.3	25.0	50.0	2.0	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone-22</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	2.7	SB-Phenyl



<b>Kondicioniran je kolone-23</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	2.7	CSH Fluoro-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-24</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	2.7	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone-25</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	2.7	HSS PFP
<b>51</b>	0.20	7.5	0.0	50.0	2.7	HSS PFP
<b>52</b>	0.40	10.0	0.0	50.0	2.7	CSH Fluoro-Phenyl
<b>53</b>	0.40	10.0	100.0	50.0	2.7	BEH Shield RP 18
<b>54</b>	0.20	10.0	0.0	50.0	2.7	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-26</b>	0.30	0.2	50.0	50.0	4.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-27</b>	0.30	0.2	50.0	50.0	4.0	CSH Fluoro-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-28</b>	0.30	0.2	50.0	50.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone-29</b>	0.30	0.2	50.0	50.0	4.0	HSS PFP
<b>55</b>	0.30	5.0	50.0	50.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>56</b>	0.40	5.0	0.0	50.0	4.0	SB-Phenyl
<b>57</b>	0.40	5.0	100.0	50.0	4.0	CSH Fluoro-Phenyl
<b>58</b>	0.40	10.0	100.0	50.0	4.0	HSS PFP
<b>59</b>	0.40	10.0	0.0	50.0	4.0	HSS PFP
<b>60</b>	0.40	8.8	25.0	50.0	4.0	BEH Shield RP 18

<b>61</b>	0.20	6.3	25.0	50.0	4.0	CSH Fluoro-Phenyl
<b>62</b>	0.20	10.0	0.0	50.0	4.0	CSH Fluoro-Phenyl
<b>63</b>	0.20	10.0	100.0	50.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>64</b>	0.20	5.0	0.0	50.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>65</b>	0.20	5.0	100.0	50.0	4.0	HSS PFP
<b>66</b>	0.30	10.0	100.0	50.0	4.0	SB-Phenyl
<b>67</b>	0.40	5.0	0.0	50.0	4.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-30</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	4.0	SB-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-31</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	4.0	CSH Fluoro-Phenyl
<b>Kondicioniran je kolone-32</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	4.0	BEH Shield RP 18
<b>Kondicioniran je kolone-33</b>	0.30	0.2	0.0	50.0	4.0	HSS PFP

Nakon provedbe prvog pokusa uslijedilo je ponavljanje eksperimenta prema najboljoj metodi predloženoj prema softwaru Fusion AE™ danoj u Tablici 7.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Odabir pH-vrijednosti pokretne faze

Kod odabira pH vrijednosti pokretne faze korišten je programski dodatak Marvin Sketch pomoću kojeg je moguće nacrtati kemijske spojeve, reakcije, Markusheve strukture te molekule. U navedenom alatu nacrtane su analizirane strukture te grafički prikazane ovisnosti pH-vrijednosti o vrijednostima  $pK_a$  i  $\log D$  (Slike P1-10). Iz priloženih grafičkih prikaza odabrana je optimalna pH-vrijednost pokretne faze za dane strukture. Prikazane grafičke ovisnosti pH- $pK_a$  te pH- $\log D$  poslužile su kako bismo uspješno odredili optimalnu pH-vrijednost danu u **Tablici 8**.

**Tablica 8.** Prikaz optimalnog opsega pH-vrijednosti za dane strukture

Oznaka uzorka	Opseg pH-vrijednosti optimalnog djelovanja
ELV	2.00-3.50
	8.50-12.50
ELV IMP1	2.00-12.50
ELV IMP2	1.50-2.50
	8.00-12.50
ELV IMP3	1.50-14.00
ELV IMP4	2.50-12.50

Uloga pH-vrijednosti pokretne faze je ključna, ponajviše u slučaju različitih vrijednosti  $pK_a$  za analizirane spojeve, stoga je nužno pronaći onu pH-vrijednost koja će odgovarati svim analiziranim strukturama, kako tijekom analize ne bi došlo do "cijepanja" pikova ili različitih vremena zadržavanja. Nepravilnim odabirom pH-vrijednosti pokretne faze mjenjamo stupanj ionizacije analita, a posljedično i njihovu relativnu hidrofobnost te stupanj interakcije s nepokretnom fazom. pH-vrijednost pokretne faze direktno ovisi o  $pK_a$  vrijednosti analita. Za ionizirane analite, povećanjem stupnja ionizacije, vrijeme zadržavanja se smanjuje. Analizom grafičkih prikaza analiziranih struktura zaključeno je kako su pH-vrijednosti u iznosu 2.00 te pH-vrijednost u iznosu od 8.00 one koje će odgovarati svim molekulama (elvitegraviru te njegovim onečišćenjima) tijekom analize. Grafičkom analizom odabrane su pH-vrijednosti pojedinih

analita čija pH-vrijednost odgovara 100-postotnoj ionizaciji. Ionizirani analit je polarniji te će ranije eluirati, dok će se neionizirani zadržati i uzrokovati asimetričnost pika. Budući da će rad pri pH-vrijednostima u bazičnom području dugoročno rezultirati smanjenim životnim vijekom kromatografske kolone, odlučeno je kako će pH-vrijednost pokretne faze biti 2.00 te su uzete vrijednosti +2 pH-jedinice. Stoga su u eksperimentu pripremljene pokretne faze pH-vrijednosti 2.00, 2.70 te 4.00.

## 4.2. Razvoj metode u Fusion Ae™

Za razvoj metode korištena je programska platforma Fusion Ae™. Izabrani su parametri važni za uspješnu HPLC separaciju: protok pokretne faze, volumen injektiranja uzorka, temperatura kolone, valna duljina detekcije te pH-vrijednost pokretne faze. Postavke u programu Fusion Ae™ prikazane su na **Slikama 16. i 17.** Volumen injektiranja bio je konstantan u svim eksperimentima te je iznosio 1 µL kao i valna duljina od 240 nm. Ispitivani protoci pokretne faze iznosili su 0.2, 0.3 te 0.4 mL/min. Kao organsko otapalo u pokretnoj fazi korišteni su acetonitril i metanol u kanalima A i B. Za vodenu fazu korišteni su: 0.1 % trifluoroctena kiselina, 0.1 % mravlja kiselina te 10 mM amonijev formijat u kanalima C, D5 te D6. Ispitane su sljedeće temperature kromatografske kolone: 40 °C, 45 °C te 50 °C (**Slika 17.**).

**Experiment Setup** | Sampling Plan

Method Type: Gradient

Available Variables: Gradient Curve, Gradient Slope, Sample Concentration, Buffer Strength, Buffer Type

Included Variables: Pump Flow Rate, Injection Volume, Oven Temperature, Wavelength, pH

Unavailable Variables:

Name	Units	Type	Level Settings
Pump Flow Rate	mL/min	Discrete Numeric	Level 1: 0.20 Level 2: 0.30 Level 3: 0.40

State:  Variable,  Constant

Name	Units	Type	Amount
Injection Volume	µL	Discrete Numeric	1.0

State:  Variable,  Constant

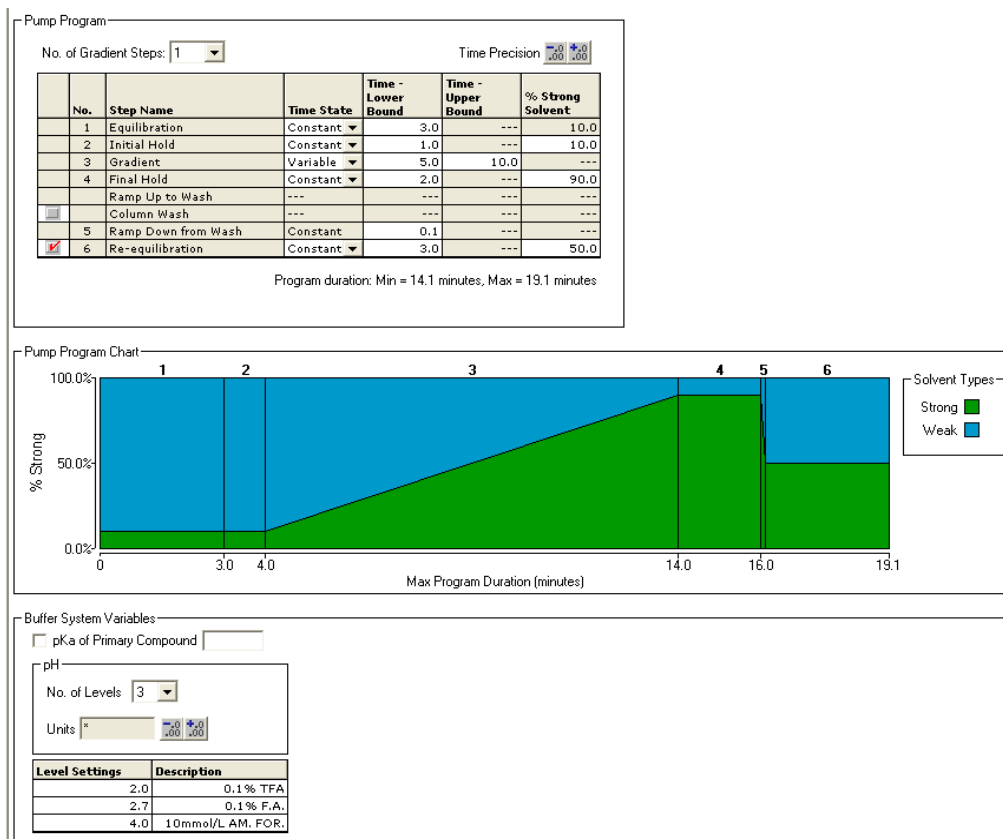
Solvent Settings: No. of Strong Solvents: 2, No. of Weak Solvents: 1

OK to Blend Strong Solvents,  OK to Blend Weak Solvents

Mobile Phase Name	Solvent Type	State	Lower	Upper	Reservoir
ACN	Strong (Organic)	Variable	0.0	100.0	B
MeOH	Strong (Organic)	Variable	20.0	80.0	A
Weak Solvent 1	Weak (Aqueous)	---	---	---	---

Available Reservoirs: A, B, C, D, D-1, D-2, D-3, D-4, D-5, D-6

**Slika 16.** Prikaz Fusion Ae™ sučelja



Slika 17. Prikaz izabranih parametara u Fusion Ae™

Odabrani su puferi temeljem željene pH-vrijednosti te opsega djelotvornosti istih. Pokusi su provedeni korištenjem 4 različite kolone dane u prikazu sučelja na Slici 18.

Name: Oven Temperature Units: °C Type: Discrete Numeric Level Settings:

Level 1	40.0
Level 2	45.0
Level 3	50.0

State:  Variable  Constant No. of Levels: 3

---

Name: Wavelength Units: nm Type: Discrete Numeric Amount: 240

State:  Variable  Constant

---

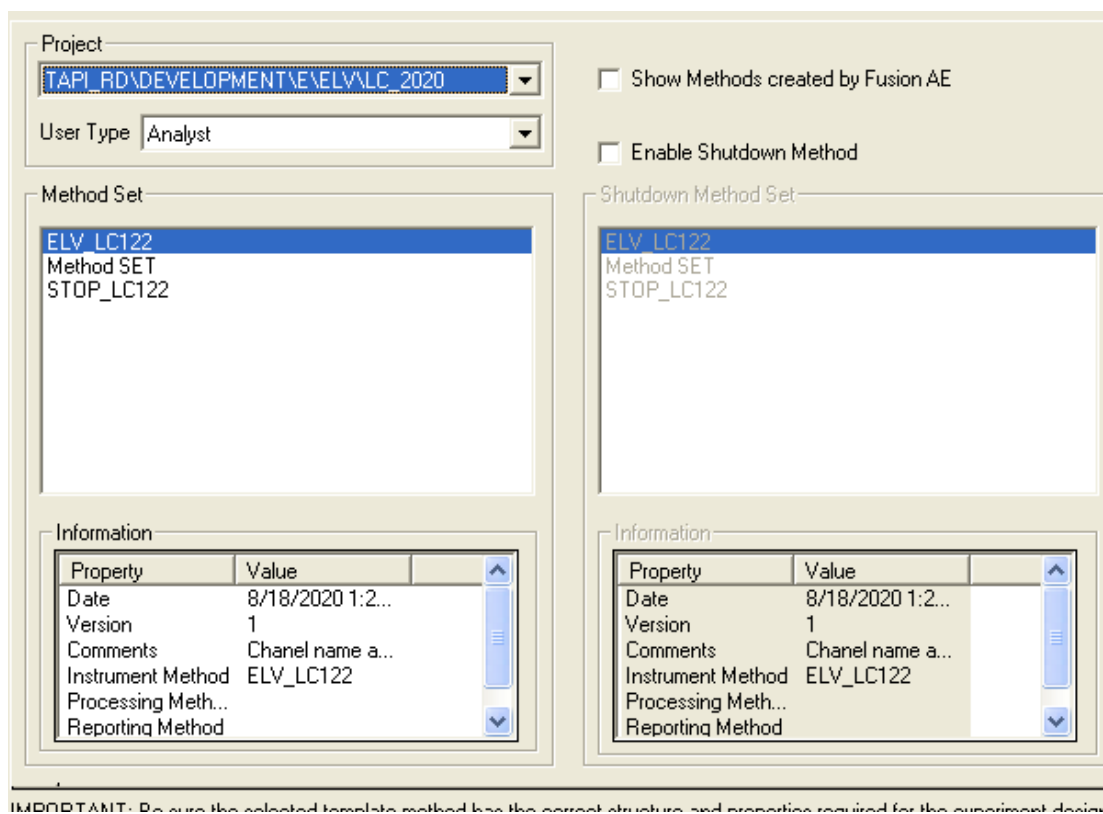
Name: Column Type No. of Columns: 4

Name	Valve Position	Flow Rate	pH Upper Bound
1 SB-Phenyl	Position 1	---	8.00
2 CSH Fluoro-Phenyl	Position 2	---	8.00
3 BEH Shield RP18	Position 3	---	8.00
4 HSS PFP	Position 4	---	8.00

State:  Variable  Constant

Slika 18. Prikaz izabranih kolona za provođenje eksperimenta

Prije početka rada u Fusion Ae™ izabran je instrument na kojem će se provoditi eksperimenti te je unutar navedenog instrumenta kreirana instrumentalna metoda te 'stop' metoda vidljiva na **Slici 19**. Fusion Ae™ stvara kopiju napravljene instrumentalne metode te podešava njene parametre.



**Slika 19.** Prikaz kreirane instrumentalne i 'stop' metode

Prvi korak u razvoju metode je odabir važnih faktora koji uvelike utječu na uspješnost analize. To su pH pokretne faze, vrsta kolone, protok pokretne faze i temperatura kolone. Navedene varijable i parametri dani su u **Tablicama 9. i 10.**

**Tablica 9.** Prikaz raspodjela pokretnih faza

<b>Kanal A</b>	Metanol (MeOH)
<b>Kanal B</b>	Acetonitril (ACN)
<b>Kanal C</b>	10 mM amonijev formijat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> ) pH = 4.00
<b>Kanal D5</b>	0.1 % trifluorocetna kiselina pH = 2.00
<b>Kanal D6</b>	0.1 % formijatna kiselina pH = 2.70

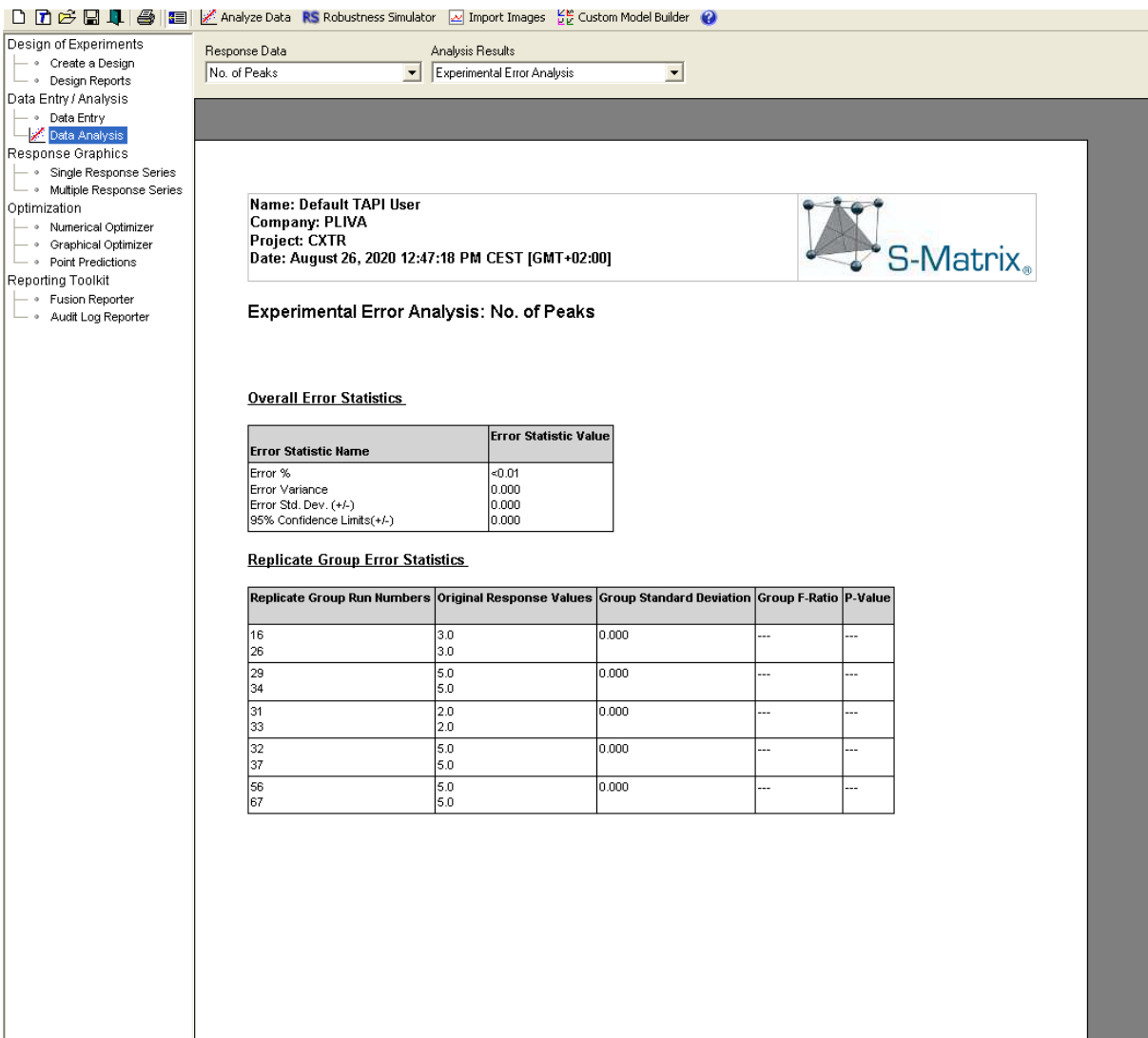
**Tablica 10.** Prikaz položaja odabranih kolona

<b>Položaj kolone</b>	<b>Vrsta kolone</b>
<b>1</b>	SB-Phenyl
<b>2</b>	CSH - Fluoro-Phenyl
<b>3</b>	BEH-Shield RP18
<b>4</b>	HSS PFP

Sljedeći korak je odabir projekta koji sadrži prethodno kreiranu metodu koju će Fusion Ae™ koristiti prilikom koraka „Export Design-a“. Ona obuhvaća setove uzoraka i metoda. Slijedi imenovanje metode te završni izvoz podataka. Fusion Ae™ u nekoliko minuta postavlja 67 instrumentalnih metoda za parametre koje smo definirali.

#### **4.3. Obrada rezultata u Fusion Ae™**

Nakon provedbe eksperimenata u trajanju od 40 sati dobivene kromatografske krivulje unose se u Fusion Ae™, nakon čega slijedi analiza istih (**Slika 20**). Kromatografske krivulje analiziramo na temelju nekoliko parametara važnih za kvalitetu kromatografske separacije. U našem slučaju to su broj pikova, razlučivanje, broj teorijskih odsječaka te faktor asimetričnosti.



**Slika 20.** Prikaz analize uvezenih podataka

Potom, iz dobivenih izvješća slijedi optimizacija koja uključuje pronalazak najpovoljnije metode. Numerički optimizator temeljem danih uvjeta pronalazi najbolju metodu. Uvjeti koje smo zadali u ovome eksperimentu su sljedeći:

1. Broj pikova ne smije biti manji od 5
2. Razlučivanje mora biti veća ili jednaka 2
3. Faktor asimetričnosti mora biti manji ili jednak 1.2
4. Broj teorijskih odsječaka ne smije biti manji od 100 000.



Slijedeći navedene kriterije optimizacijom dolazimo do najpovoljnije metode (**Tablica 11.**), tj. skupa metoda rangiranih od najbolje prema lošijima.

**Tablica 11.** Prikaz najbolje metode prema prijedlogu software Fusion AE <sup>TM</sup>

Naziv varijable	Prijedlog optimizatora	Provedena metoda
<b>Protok / mL/min</b>	0.400	1.200
<b>Vremenski gradijent / min</b>	6.16	1.54
<b>MeOH / %</b>	100	100
<b>Temperatura kolone / °C</b>	43	60
<b>pH pokretne faze</b>	2.000 (0,1 % TFA)	2.000 (0,1 % TFA)
<b>Vrsta kolone</b>	SB-Phenyl	SB-Phenyl

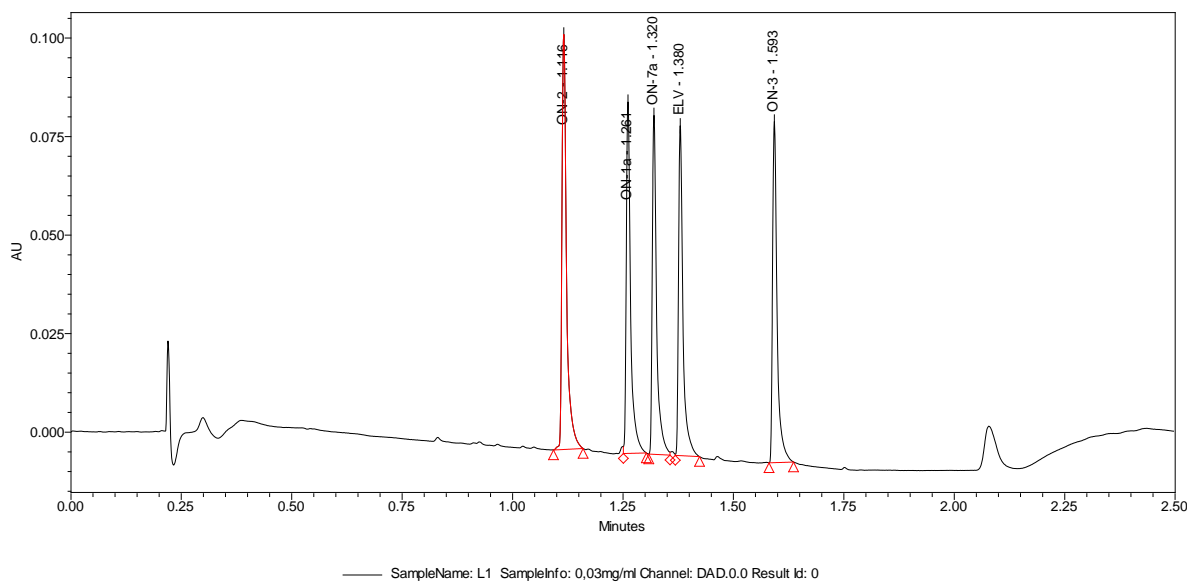
#### 4.4. Provedba eksperimenta prema predloženoj metodi

Slijedeći najbolju metodu predloženu od strane software Fusion Ae <sup>TM</sup> (**Tablica 11.**) proveden je eksperiment. Navedena metoda dodatno je optimirana pri čemu je temperatura kromatografske kolone povišena sa 40 ° C na 60 ° C. Protok pokretne faze povišen je na 1.2 mL/min, a vremenski gradijent je smanjen na 1.54 minute. Povećanjem protoka pokretne faze uočeno je kako analit ima dovoljno vremena za interakciju sa nepokretnom fazom, tj. uspješno je smanjeno vrijeme zadržavanja i uslijed toga, skraćeno je trajanje analize. Također, povećanje temperature utjecalo je na bržu kromatografsku separaciju i doprinijelo kraćem trajanju analize te je bilo nužno njegovo povećanje zbog uvećanog radnog tlaka slijedom povišenog protoka pokretne faze. U **Tablici 12.** dan je prikaz predviđenih rezultata za izabranu najbolju metodu koju smo definirali u prethodnom koraku te je vidljivo kako predviđeni rezultati odgovaraju danim kriterijima.

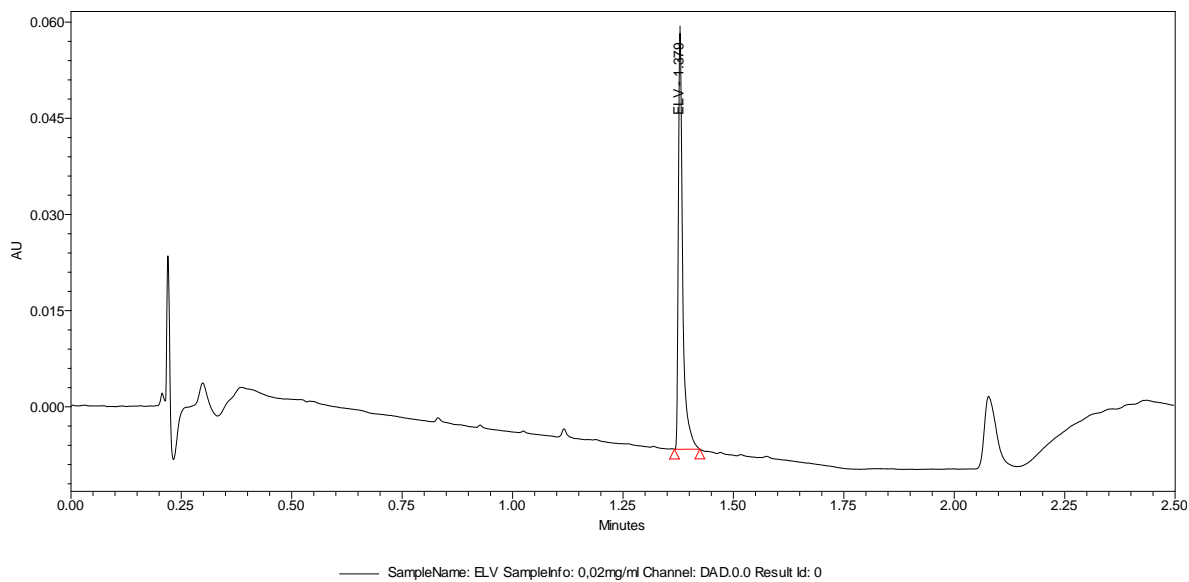
**Tablica 12.** Prikaz predviđenih rezultata

Naziv varijable	Cilj	Predviđeni rezultat	-2σ sigurnosni limit	+2σ sigurnosni limit
<b>Broj pikova</b>	4.5	4.612	4.198	5.027
<b>Razlučivanje &gt; 2.00</b>	4.5	4.497	4.386	4.607
<b>Faktor asimetričnosti &lt; 1.2</b>	4.5	4.486	3.269	5.703
<b>Broj teorijskih odsječaka &gt; 100000</b>	4.5	4.493	4.292	4.694

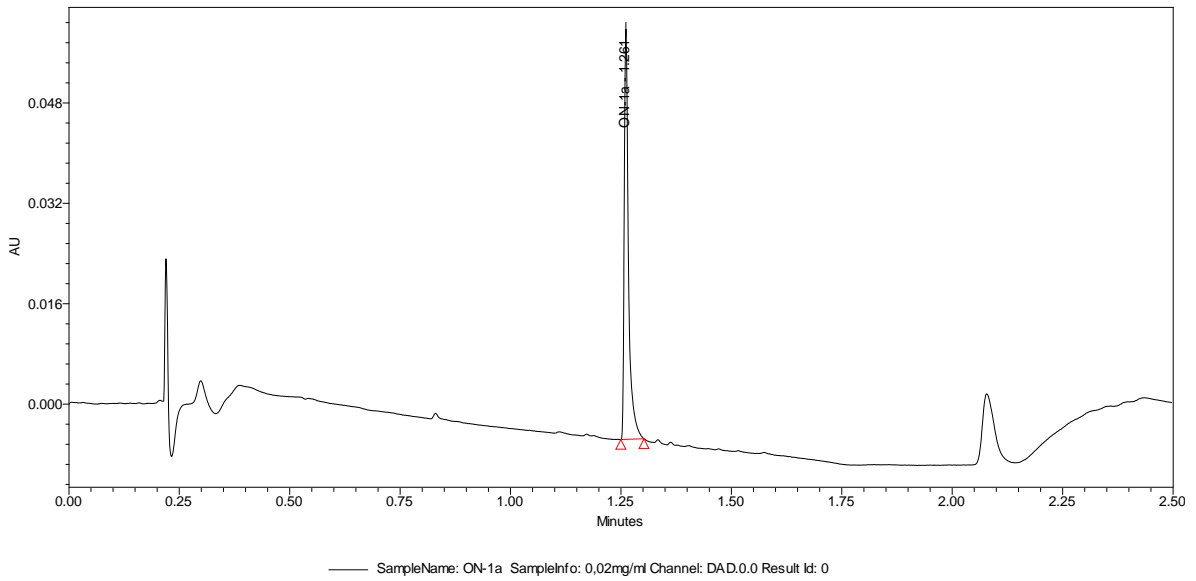
U nastavku slijedi prikaz kromatografskih krivulja dobivenih prema najoptimalnijoj metodi prema Fusion AE™ (Slike 21-26).



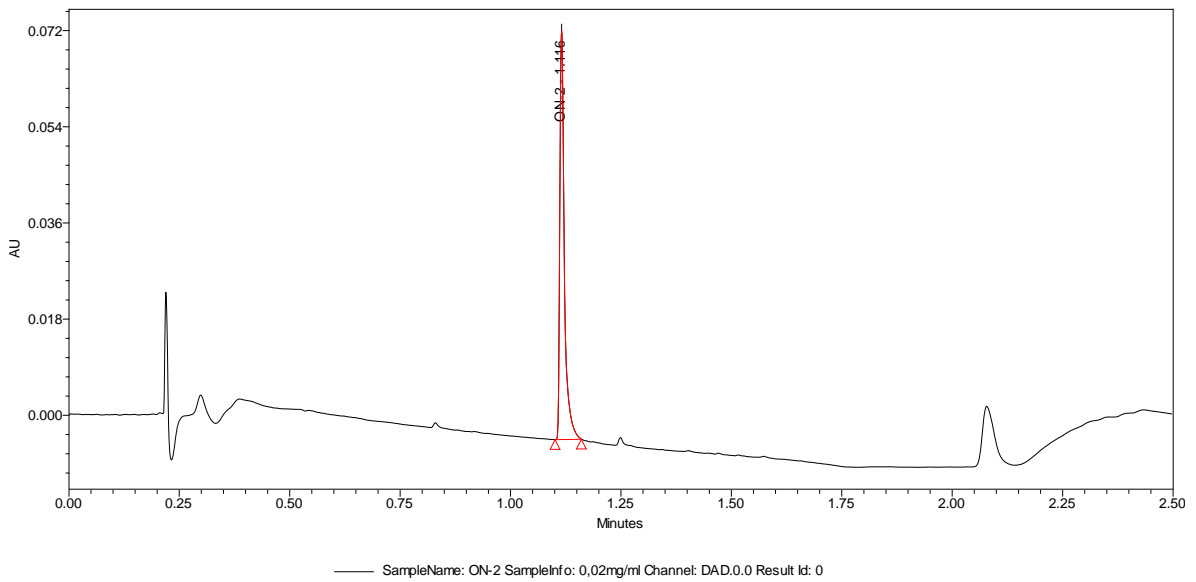
**Slika 21.** Kromatografska krivulja smjese analita (elvitegravira te onečišćenja 1, 2, 3 i 4)



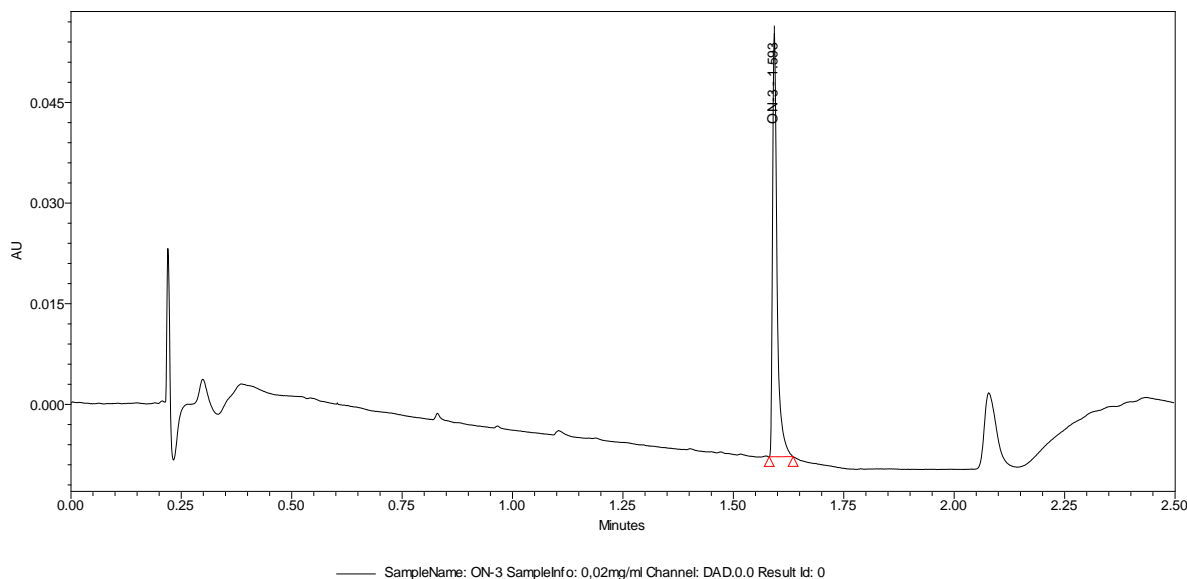
**Slika 22.** Kromatografska krivulja elvitegravira



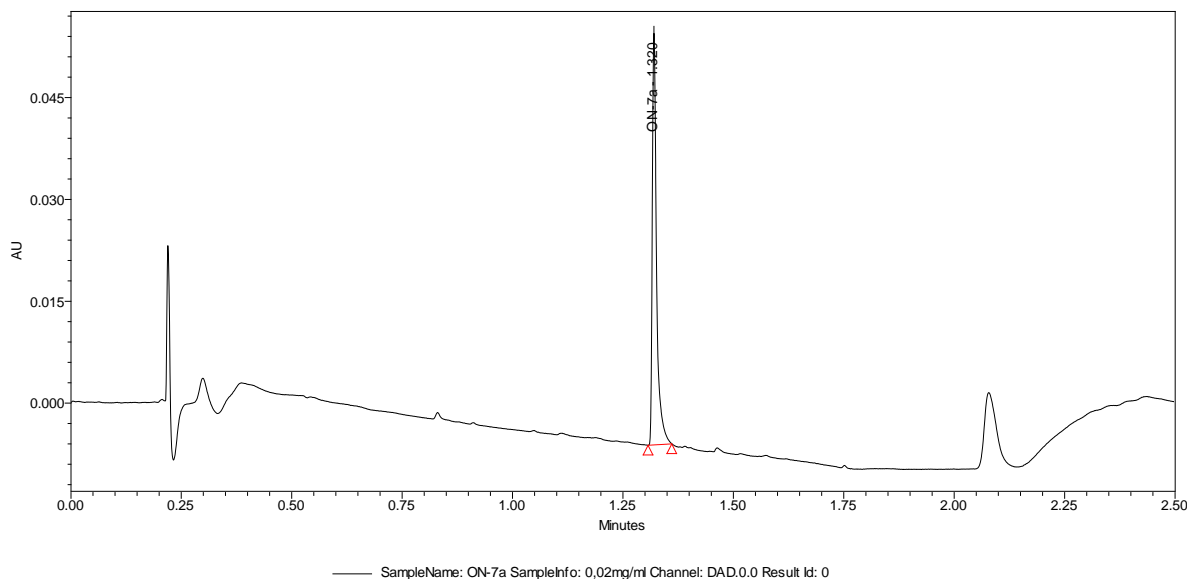
**Slika 23.** Kromatografska krivulja onečišćenja 1



**Slika 24.** Kromatografska krivulja onečišćenja 2



**Slika 25.** Kromatografska krivulja onečišćenja 3



**Slika 26.** Kromatografska krivulja onečišćenja 4

U **Tablici 13.** dani su izračunati parametri za kromatografsku krivulju smjese analita. Iz kromatografske krivulje (**Slika 21.**) vidljivo je uspješno odjeljivanje analita. Broj teorijskih odsječaka je zadovoljavajući te odgovara postavljenom kriteriju ( $>100\ 000$ ), osim u slučaju onečišćenja 2 gdje je manji od navedenog iznosa. Kriterij za  $R_S$ -vrijednost veći je od 2.00 što ukazuje na dobru djelotvornost izabrane kromatografske kolone. Faktor asimetričnosti ( $A_S$ ) znatno je veći od očekivane vrijednosti što možemo uočiti vizualnim pregledom kromatografske

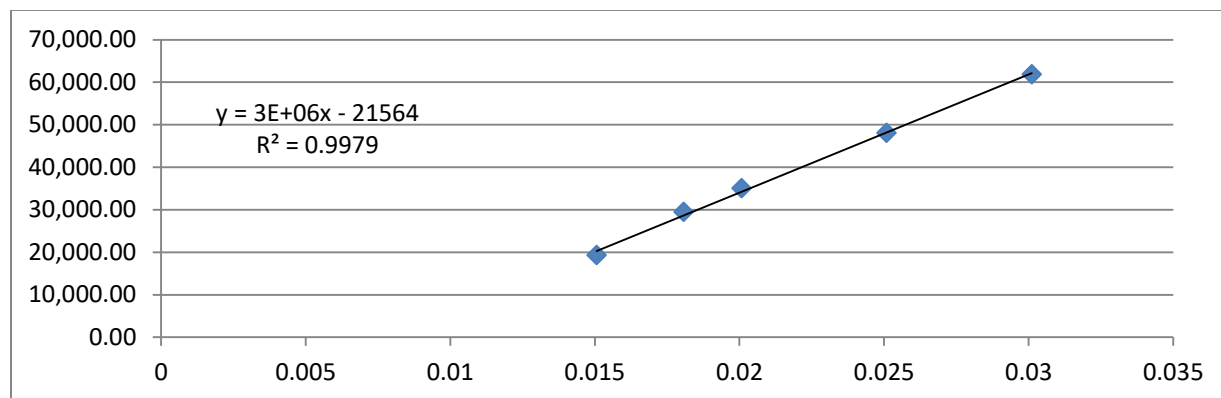
krivulje. Veći iznos faktora asimetričnosti može biti posljedica više faktora kao što su razgradnja uzorka, adsorpcije analita na aktivna mjesta nepokretne faze ili pak loše "uhvaćenog" analita.

**Tablica 13.** Prikaz izračunatih parametara za kromatografsku krivulju smjese analita

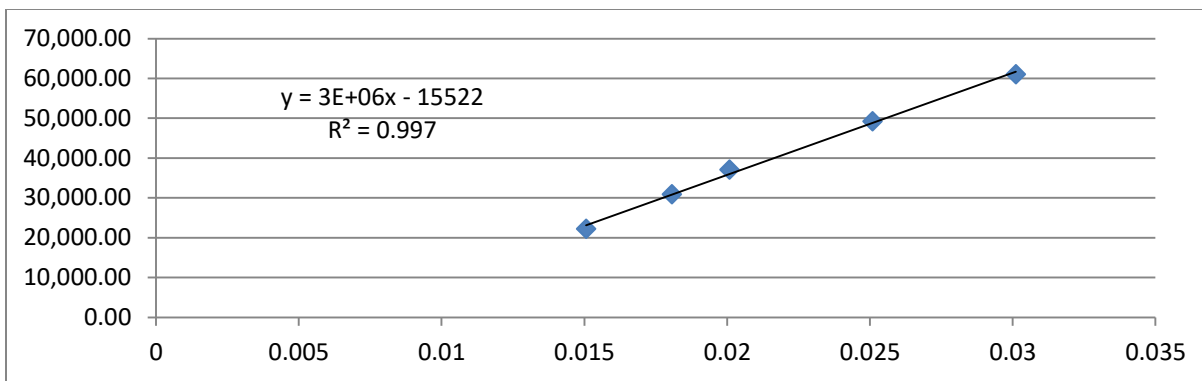
	Naziv analizirane strukture	Vrijeme zadržavanja	Površina pika	Visina pika	EP s/n	USP Faktor asimetričnosti	USP Razlučivanje	USP Broj teorijskih odsječaka
1	IMP 2	1.116	76648	105335	828	1.8		72060
2	IMP 1	1.261	60998	89162	700	1.9	9.0	102189
3	IMP 4	1.320	58892	86033	676	1.9	3.7	111329
4	ELV	1.380	58431	83696	657	1.9	3.7	116753
5	IMP 3	1.593	62086	86549	680	1.8	12.9	142484

#### 4.5. Validacija

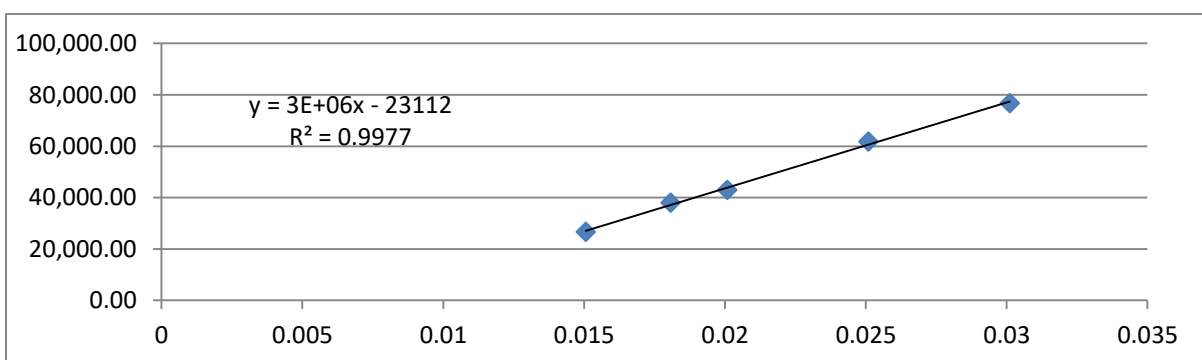
Rezultati ispitivanja linearnosti (**Slike 27-31.**) te ponovljivosti (**Tablica 14.**) dani su na sljedećim grafičkim i tabličnim prikazima.



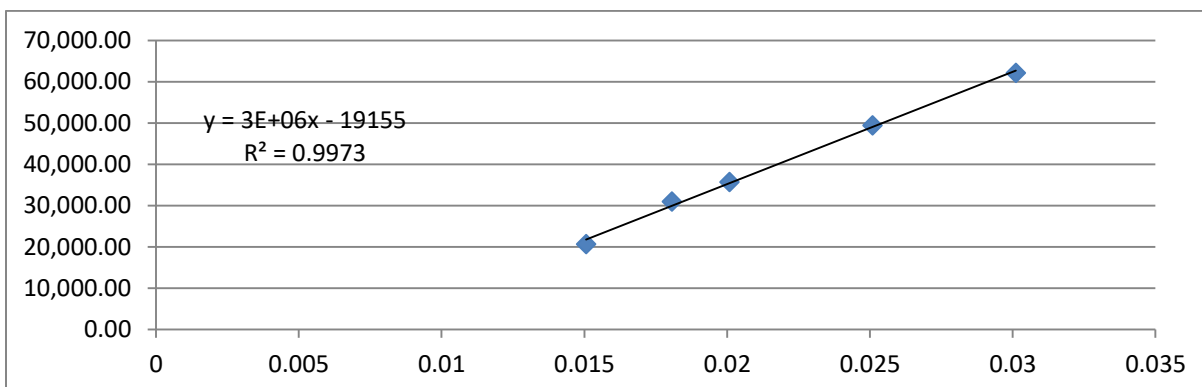
**Slika 27.** Kalibracijski pravac elvitegravira



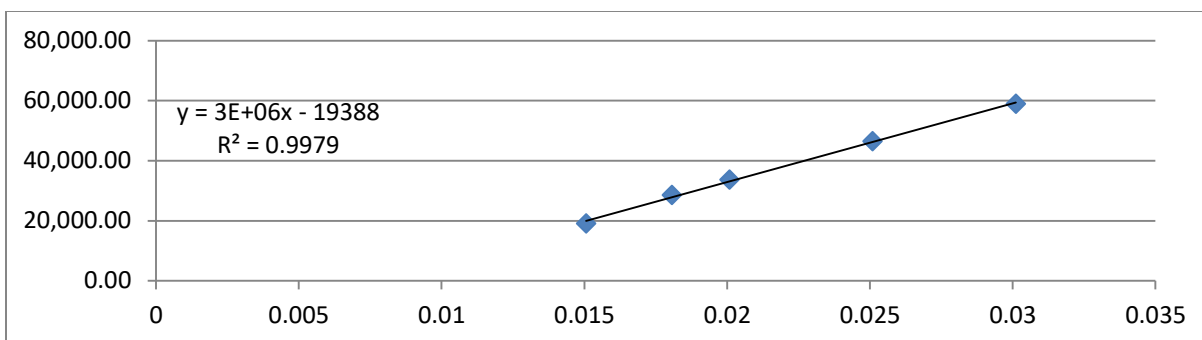
**Slika 28.** Kalibracijski pravac onečišćenja 1



**Slika 29.** Kalibracijski pravac onečišćenja 2



**Slika 30.** Kalibracijski pravac onečišćenja 3



**Slika 31.** Kalibracijski pravac onečišćenja 4

Mjerenjem odziva metode za nekoliko poznatih različitih koncentracija analita dobivene su kalibracijske krivulje. Linearnost je određena matematički, tj. linearnom regresijom u obliku jednadžbe pravca  $y = ax + b$  čime je dobiven koeficijent determinacije ( $R^2$ ). Iznos koeficijenta determinacije koji se najčešće prihvaća je  $>0.99$  dok za niske koncentracije, kao u ovom slučaju, kriterij je stroži te iznosi  $>0.997$ . Koeficijenti determinacije veći su od 0.997 čime je potvrđena linearna ovisnost površine pika o koncentraciji za sve ispitivane analite.

Rezultati ispitivanja ponovljivosti mjerenja vremena zadržavanja i površine ispod kromatografskog pika iskazani su standardnim odstupanjem te relativnim standardnim odstupanjem te kao raspon pouzdanosti srednje vrijednosti te su dani u **Tablici 14.** vidljivo je da sva standardna odstupanja zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti prema FDA. Tipični RSD za lijekove i ljekovite supstance iznosi 1 % dok za aktivne farmaceutske sastojke te gotove lijekove iznosi  $\pm 2$  %.

**Tablica 14.** Rezultati ispitivanja ponovljivosti mjerenja na primjeru elvitegravira

#	Vrijeme zadržavanja (min)	Površina pika
1	1.379	44771
2	1.379	44027
3	1.379	44432
4	1.379	44602
5	1.379	44773
6	1.379	44776
<b>Prosjek:</b>	<b>1.38</b>	<b>44563.50</b>
<b>SD:</b>	<b>0.00</b>	<b>296.21</b>
<b>RSD, %:</b>	<b>0.0</b>	<b>0.66</b>

## 5. Zaključak

1. Uspiješno je razvijena brza UHPLC-DAD metoda za određivanje elvitegravira i njegovih onečišćenja.
2. Validacijom metode ispitane su izvedbene karakteristike: linearnost i preciznost.
3. Linearno područje za elvitegravir te njegova četiri poznata onečišćenja je u rasponu koncentracija od 0.015 mg/mL do 0.03 mg/mL.
4. Preciznost je ispitana kao ponovljivost u vremenu zadržavanja i površini ispod kromatografskog pika i prikazan kao relativno standardno odstupanje. Sve RSD vrijednosti nalaze se unutar kriterija prihvatljivosti.
5. Princip kvalitete ugrađene u dizajn je dokazano uspješan u procesu razvijanja kvalitetne, selektivne i robusne metode kojom znatno skraćujemo vrijeme razvijanja i optimiranja kromatografske metode u odnosu na tradicionalan pristup razvoju analitičkih metoda.

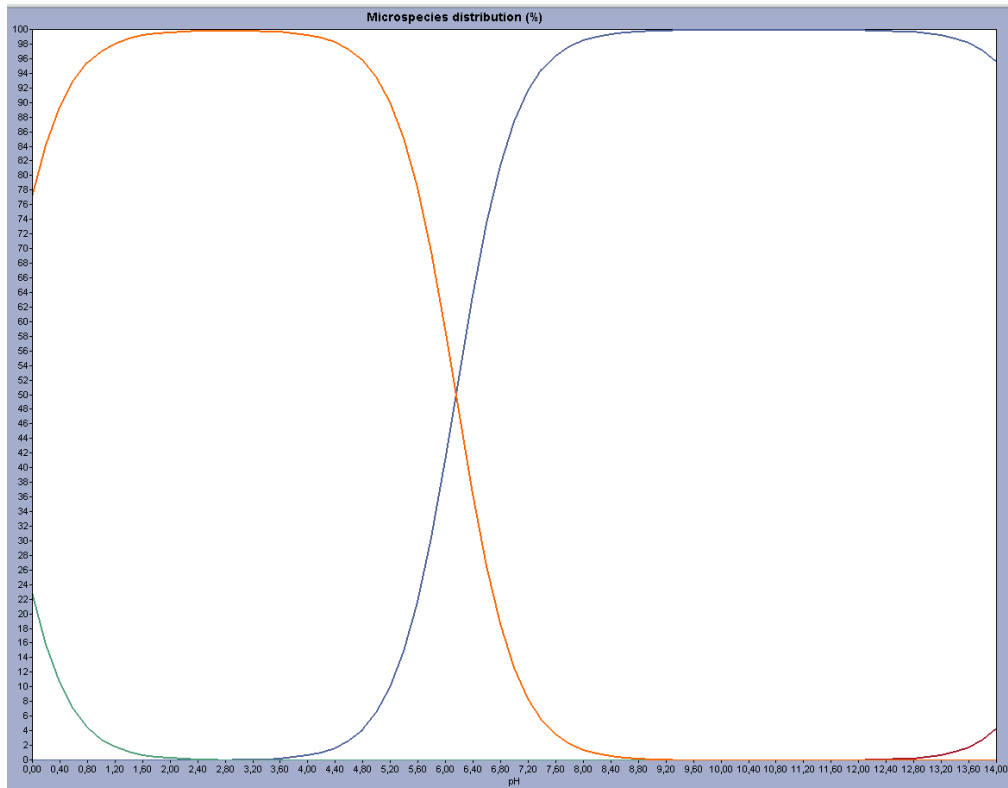


## 6. Literatura

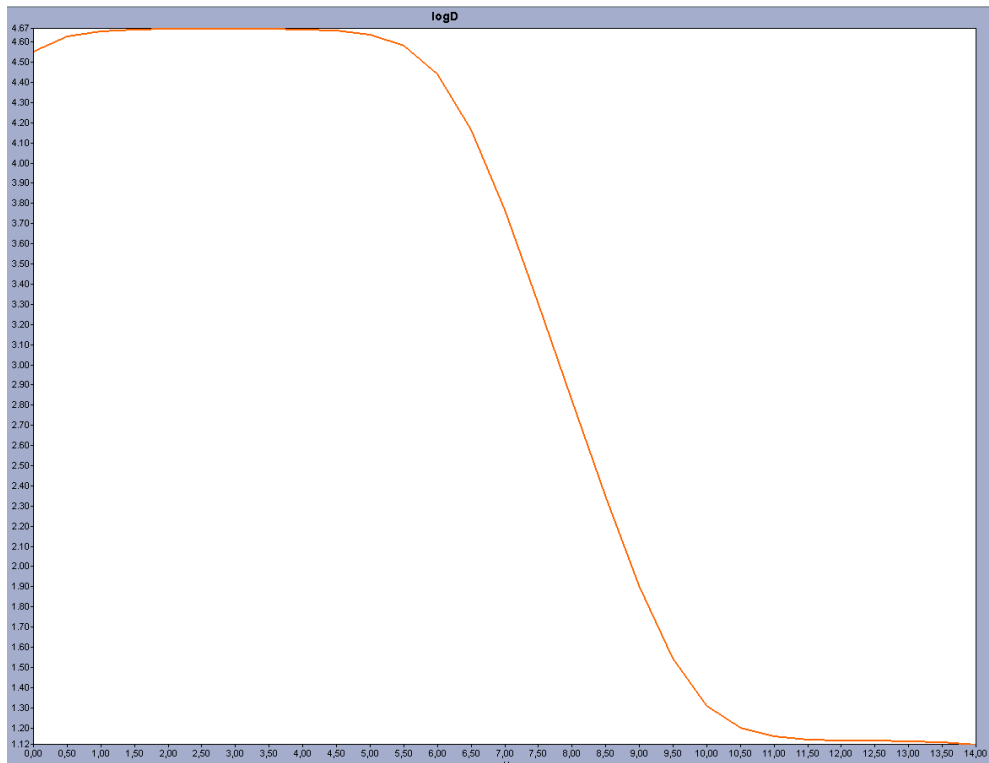
1. T. Tome, N. Žigart, Z. Časar, A. Obreza, Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances, *Organic process research & development*, 23 (2019) 1784-1788.
2. Elvitegravir, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Elvitegravir> (pristup: studeni 2020.)
3. Elvitegravir, <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/drugs/elvitegravir-cobicistat-emtricitabine-tenofovir-alafenamide/patient> (pristup: studeni 2020.)
4. K. Shimura, N.E. Kodama, Elvitegravir: A new HIV integrase inhibitor, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 20 (2009) 79–85.
5. A. Planinić, Mutacije povezane s rezistencijom virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove, Prirodoslovno-matematički fakultet, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, (2014) 13.
6. M.O. Klibanov, Elvitegravir, an oral HIV integrase inhibitor, for the potential treatment of HIV infection, *Current opinion in investigational drugs*, 10 (2009) 190-200.
7. Kaštelan Macan, M., Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, 2003. 218-240.
8. HPLC, <https://www.chromatographytoday.com/news/autosamplers/36/breaking-news/what-is-peak-tailing/31253> (pristup: studeni 2020.)
9. S. Ahuja, M.W. Dong, *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC: Volume 6 of separation science and technology*, Elsevier Academic Press; 2005. str. 26-30
10. European Medicines Agency, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, (1995) 14-15.
11. Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, 2006., 3-4.
12. S. Lutetteroti, Temelji kromatografskih odjeljivanja-opći pojmovi : Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet , (2011) 204-209.
13. HPLC detectors, <https://www.slideshare.net/arghasen90/detectors-used-in-hplc>, (pristup: listopad 2020.)
14. F.G. Vogt, S.A. Kord, Development of quality-by-design analytical methods, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(3) (2011) 797–812.
15. L.X. Yu, G. Amidon, M.A. Khan, S.W. Hoag, J. Polli, G.K. Raju, J. Woodcock, Understanding pharmaceutical quality by design, *AAPS Journal* 16 (4) (2014) 771-783.
16. K. Smith, M. Pohl, M. Schweitzer, J. Larew, H.M. Brown, G. Hansen, P. Nethercote, P. Borman, Implications and opportunities of applying QbD principles to analytical measurement, *Pharmaceutical Technology Europe*, 22 (2010) 52-59.
17. J.N. Sangshetti, M. Deshpande, M. Zaheer, D.B. Shinde, R. Arote, Quality by design approach: Regulatory need, *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (2014) 3412-3425.
18. AqbD, <https://www.pharmaexcipients.com/gelatin/diclofenac-sodium-microspheres/> (pristup: studeni 2020.)

19. L.X. Yu, Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control, *Pharmaceutical Research*, 25(4) (2008) 781-791.
20. AQbD, <https://www.a3p.org/es/analytical-quality-by-design-the-required-integration-for-quality-by-design-la-vague-52/>, (pristup: lipanj 2021.)
21. S. Chatterjee: QbD Considerations for Analytical Methods - FDA Perspective, FDA, IFPAC Annual Meeting, Baltimore, 2013.
22. Fusion AE - Method Development Users Guide, 3-5.
23. M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single - laboratory validation of methods of analysis, *Pure Appl. Chem*, 74 (2002) 835-855.
24. J. Vessman, Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14 (1996) 867-869.
25. Precision, <https://sites.chem.utoronto.ca/chemistry/coursenotes/analsci/stats/AimStats.html>, (pristup: studeni 2020.)

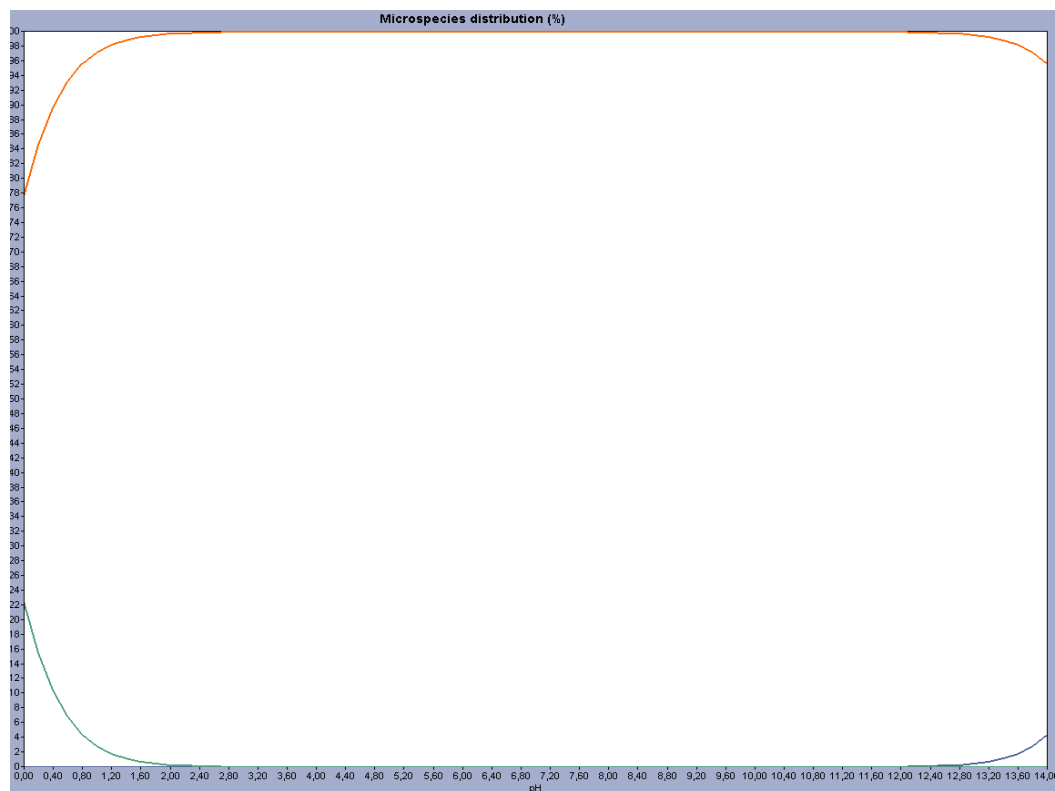
## 7. Prilozi



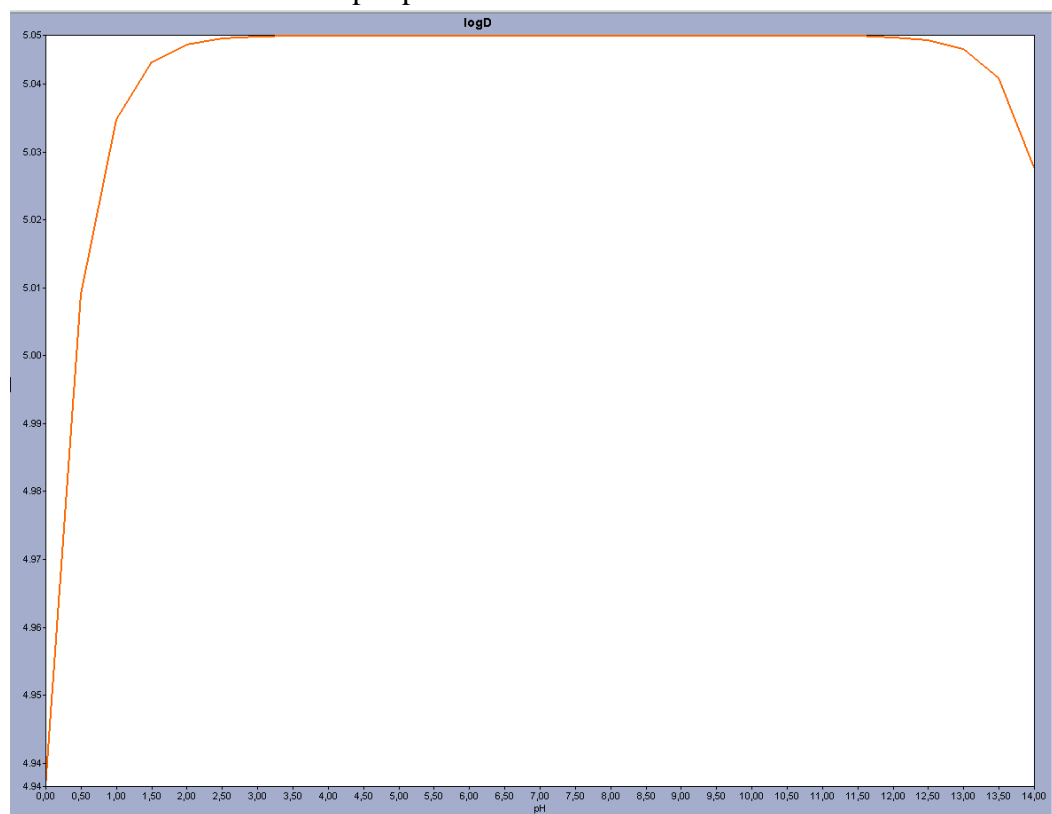
Slika P1. Prikaz ovisnosti pH - pKa za strukturu ELV-a



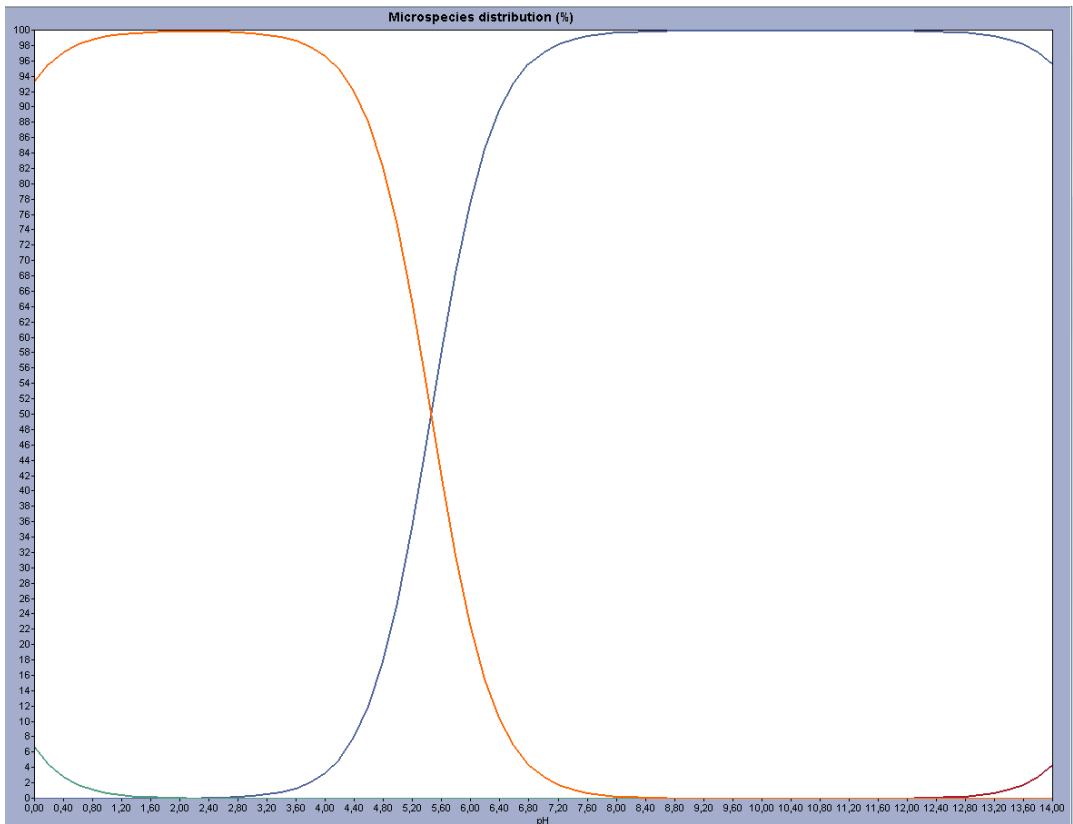
Slika P2. Prikaz ovisnosti pH – log D za strukturu ELV-a



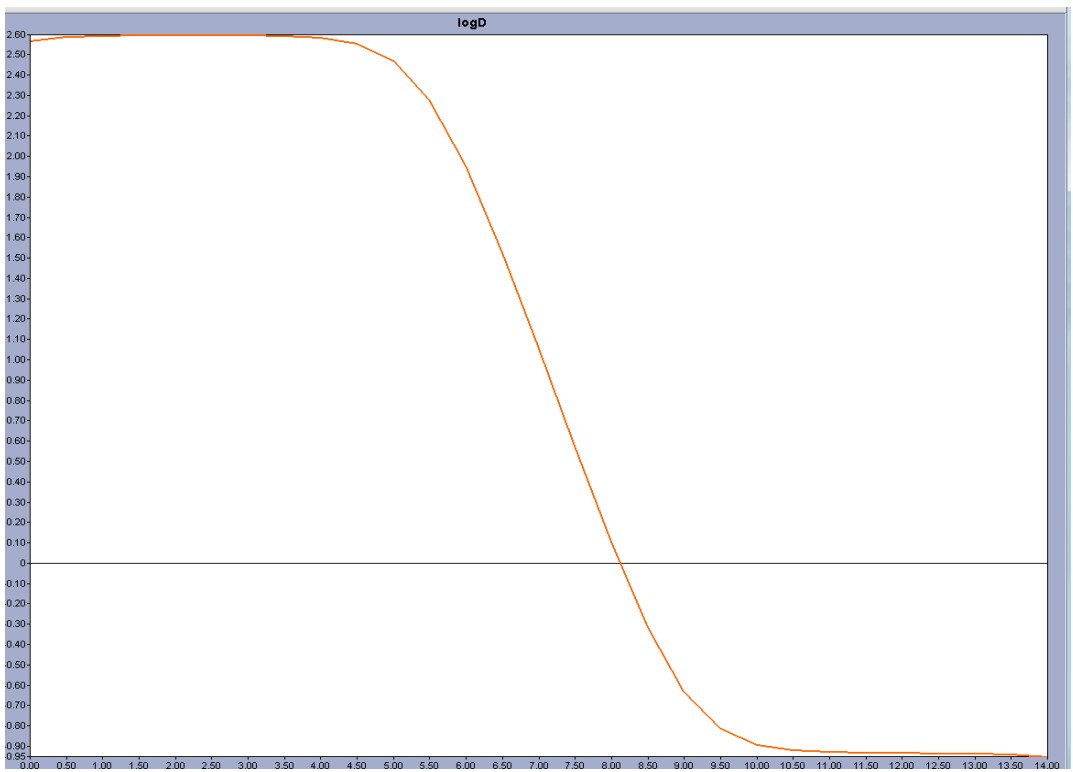
**Slika P3.** Prikaz ovisnosti pH-pKa za strukturu ELV IMP1



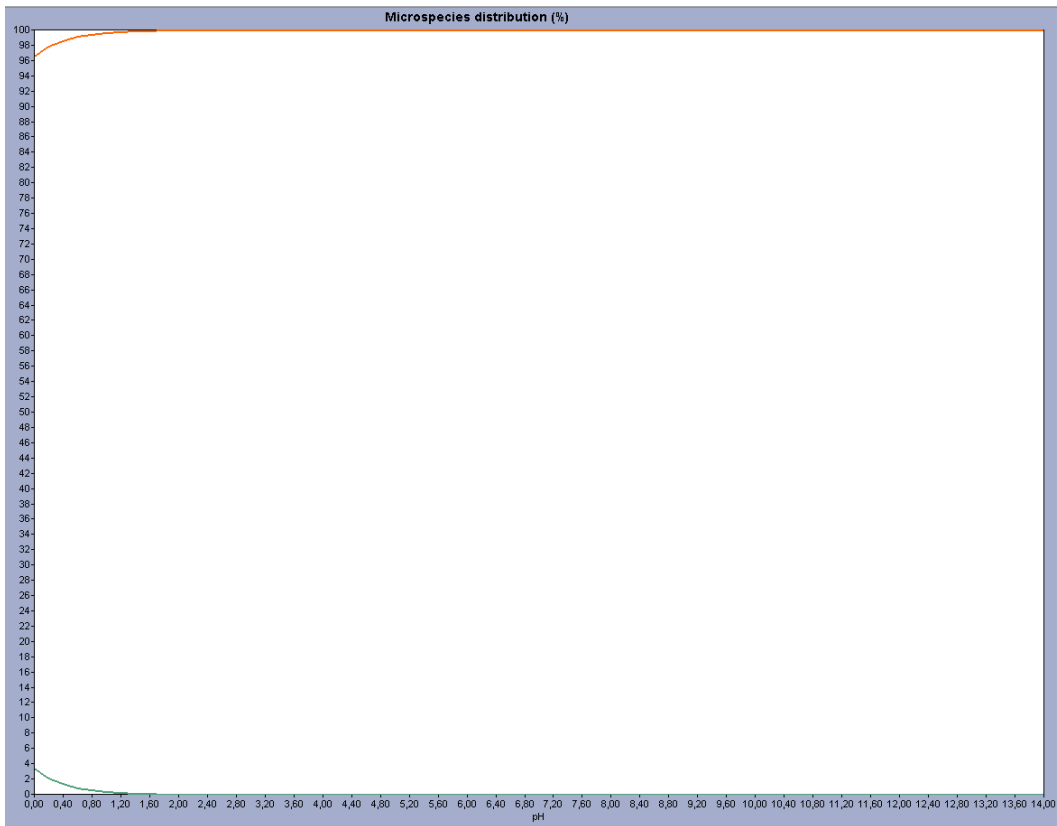
**Slika P4.** Prikaz ovisnosti pH – log D za strukturu ELV IMP1



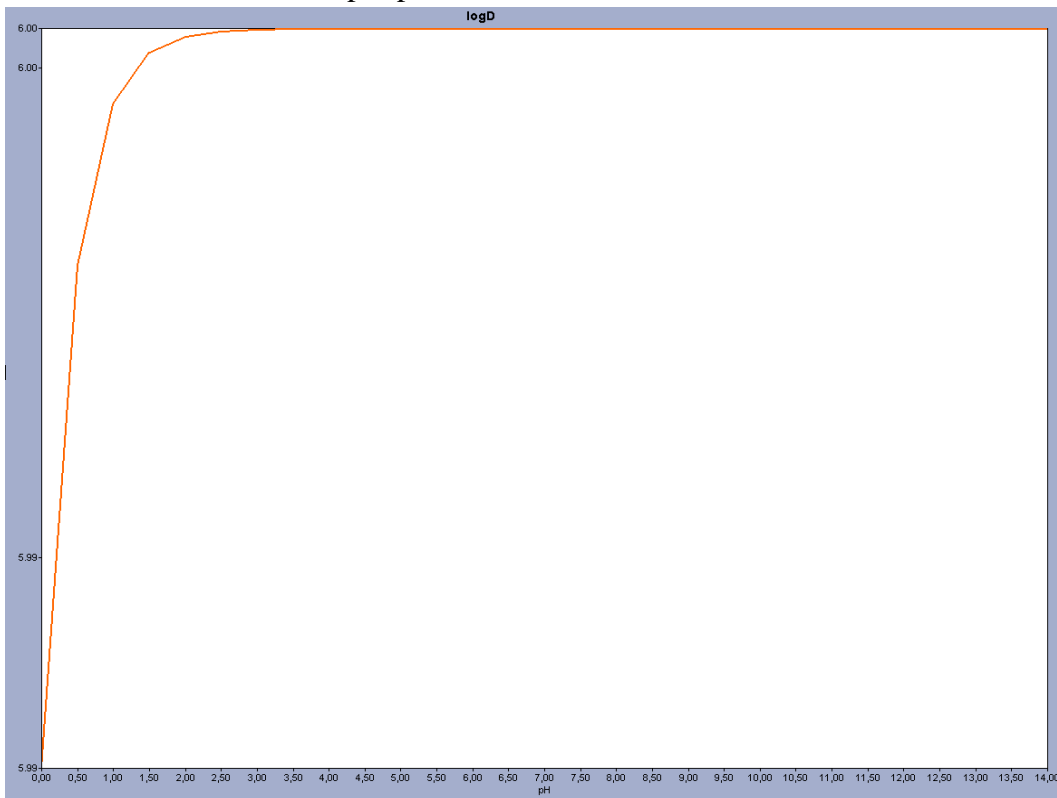
Slika P5. Prikaz ovisnosti pH-pKa za strukturu ELV IMP2



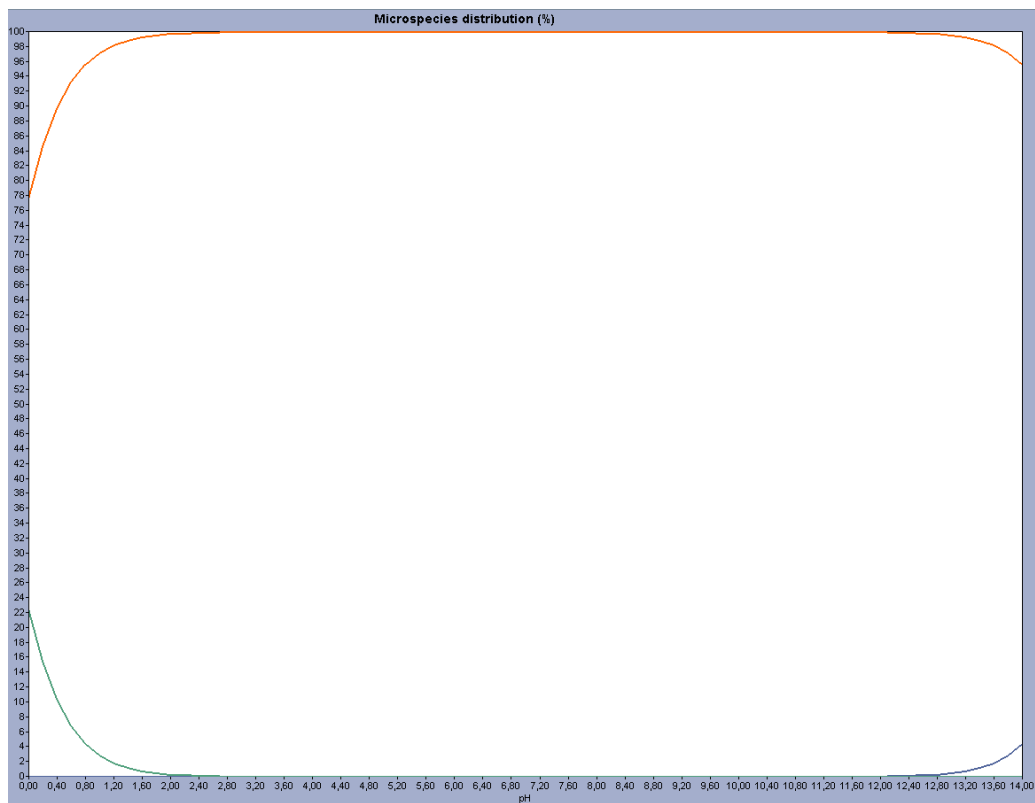
Slika P6. Prikaz ovisnosti pH – log D za strukturu ELV IMP2



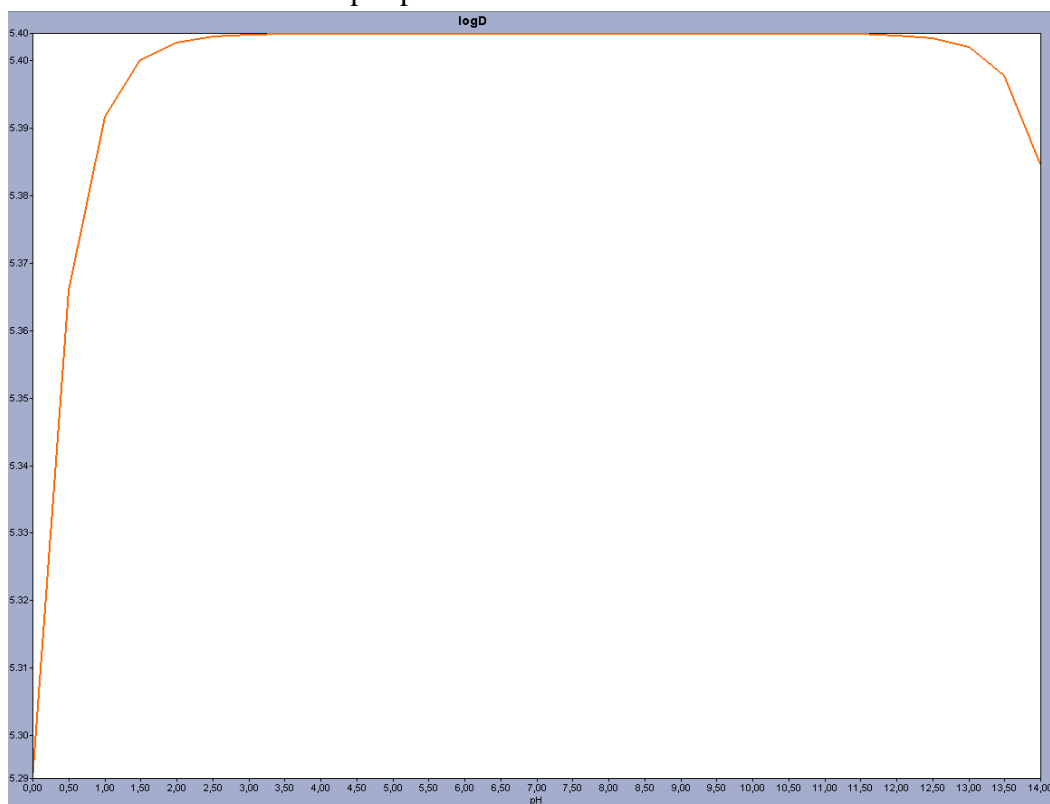
**Slika P7.** Prikaz ovisnosti pH-pKa za strukturu ELV IMP3



**Slika P8.** Prikaz ovisnosti pH – log D za strukturu ELV IMP3



**Slika P9.** Prikaz ovisnosti pH-pKa za strukturu ELV IMP4



**Slika P10.** Prikaz ovisnosti pH – log D za strukturu ELV IMP4

## ŽIVOTOPIS

Viktorija Gorički [REDACTED] Srednjoškolsko obrazovanje završila je u Prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija. Godine 2015. upisuje preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu odradila je u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja 'Ivan Vučetić'. Završila je preddiplomski sveučilišni studij u rujnu 2019. obranom završnog rada na temu „Kako sintetizirati biodizel iz otpadnog taloga kave“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Aleksandre Sander. U rujnu 2019. upisuje diplomski sveučilišni studij Kemijskog inženjerstva, modul Kemijsko inženjerstvo u zaštiti okoliša. Od veljače 2020. radi na odjelu TAPI R&D – Analitika. Aktivno se služi engleskim jezikom, te poznaje osnove talijanskog i njemačkog jezika.