

# Primjena metode ubrzanog stabilitetnog testiranja na aktivnim farmaceutskim supstancama

---

Sindičić, Valnea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:149:520398>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valnea Sindičić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valnea Sindičić

PRIMJENA METODE UBRZANOG STABILITETNOG  
TESTIRANJA NA AKTIVNIM FARMACEUTSKIM  
SUPSTANCAMA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Šime Ukić

izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

izv. prof. dr. sc. Marijana Kraljić Roković

Zagreb, rujan 2017.

*Ovaj završni rad izrađen je u Pliva Hrvatska d.o.o., pod vodstvom mag. appl. chem Marija Lovrića te na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc Šime Ukića.*

*Htjela bih se zahvaliti svojem mentoru doc. dr. sc. Šimi Ukiću, na pomoći oko završnog rada, razumijevanju i prihvaćanju mojih želja istraživanja, stručnim savjetima i brzim odgovorima na sva moja pitanja.*

*Hvala mojem neposrednom voditelju mag. appl. chem. Mariju Lovriću, na iznimnoj pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog rada. Također hvala na pruženoj prilici i svakom dobronamjernom prijedlogu. Boljeg voditelja nisam mogla poželjeti.*

*Hvala gospodinu prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću i mag. chem. ing. Mislavu Runji na pruženoj prilici da ovaj završni rad izradim u Plivi.*

*Hvala Korneliji, Aniti, Ivi, Valentini i cijelom timu Analitike na pruženoj podršci i motivaciji za daljnji rad.*

*Hvala mojim roditeljima, Mami i Tati, što ste bili uvijek uz mene i prihvaćali moje odluke. Vjerovali ste u mene uvijek, čak i kada sama nisam.*

*Hvala svim mojim prijateljima, na podršci, slušanju i razumijevanju. Također veliko hvala mome dečku koji je uvijek bio uz mene.*

## SAŽETAK

Ovaj rad izrađen je u PLIVA d.o.o., Hrvatska te zbog poslovne tajnosti nije moguće iznositi točna imena uzoraka i aktivnih farmaceutskih supstanci kao ni njihove karakteristike.

Tijekom razvoja aktivnih farmaceutskih supstanci (API-ja) potrebno je provesti nekoliko dugoročnih stabilitetnih testiranja. Rok trajanja, koji se treba odrediti, temelji se na vremenu u kojem API ostaje unutar svojih granica specifikacije tijekom nastanka produkata razgradnje. Osiguravanje stabilnog proizvoda od iznimne je važnosti za zdravlje bolesnika. Primjena programa ubrzane procjene stabilnosti (ASAP) omogućuje predviđanje roka trajanja API-ja u svega dva tjedna koristeći kontrolirane komore za stabilnost u minijaturi i statističke protokole. ASAP se znanstveno bazira na korigiranoj Arrheniusovoj jednadžbi koja se koristi za procjenu učinaka temperature i vlage na stupanj degradacije API-ja. U ovom radu primijenjena je ova kratkotrajna metoda ispitivanja na dvokomponentnom API-ju za testiranje međusobnih utjecaja kemijske stabilnosti. Produkti degradacije određeni su pomoću UHPLC-a s DAD detektorom i C18 separacijskom kolonom. Razvijena je kromatografska metoda za odvajanje svih produkata razgradnje i dva API-ja. Rezultati su pokazali aditivni učinak u stabilnosti dvokomponentnog sustava u dvotjednom razdoblju testiranja.

**Ključne riječi:** ASAP, API, stabilitetna testiranja, UHPLC, korigirana Arrheniusova jednadžba

## SUMMARY

This bachelor thesis was made in PLIVA d.o.o., Croatia and due to the company confidentiality policy it's not possible to disclose exact names of samples and active pharmaceutical ingredients as well as their characteristics.

During the development of an active pharmaceutical ingredients (APIs), certain number of the long-term stability testings are required. Shelf-life, which has to be determined, is based on the period in which API stays within the limits of its specification during the formation of the degradation products. Ensuring the stability of product is of exceptional importance for patients' health. The application of The Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) enables APIs shelf-life prediction in just two weeks by using controlled miniature stability chambers and the statistical protocols. ASAP is scientifically based on corrected Arrhenius equation which is used for estimation of the effects of temperature and humidity on the degradation rate of APIs. In this thesis, explained short-term testing method was applied on a two-component API for testing of mutual effects in chemical stability. Degradation products were determined by UHPLC with a DAD detector and C18 separation column. Chromatographic method was developed for separation of all degradation products and two APIs. Results have shown additive effect in stability of two-component system during the two-week testing period.

**Keywords:** ASAP, API, stability testing, UHPLC, humidity-corrected Arrhenius equation

# SADRŽAJ

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | UVOD .....   | 1  |
| 2     | TEORIJSKI DIO .....                                  | 2  |
| 2.1   | Stabilnost farmaceutskih pripravaka.....             | 2  |
| 2.2   | Testiranje stabiliteta.....                          | 2  |
| 2.2.1 | Standardni pristup testiranja stabiliteta .....      | 3  |
| 2.2.2 | Ubrzano testiranje stabiliteta .....                 | 4  |
| 2.3   | Onečišćenja .....                                    | 6  |
| 2.3.1 | Klasifikacija onečišćenja.....                       | 6  |
| 2.4   | DryLab metoda.....                                   | 7  |
| 2.5   | Tekućinska kromatografija.....                       | 8  |
| 2.5.1 | Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti..... | 10 |
| 3     | EKSPERIMENTALNI DIO.....                             | 12 |
| 3.1   | Materijali.....                                      | 12 |
| 3.1.1 | Kemikalije .....                                     | 12 |
| 3.2   | Instrumenti .....                                    | 12 |
| 3.2.1 | Stabilitetne komore .....                            | 13 |
| 3.2.2 | HPLC/UHPLC sustav .....                              | 14 |
| 3.3   | Računalni alati.....                                 | 14 |
| 3.4   | Eksperimentalni postupak.....                        | 15 |
| 3.4.1 | Razvoj UHPLC metode.....                             | 15 |
| 3.4.2 | DryLab metoda .....                                  | 16 |
| 3.4.3 | Stabilitetno testiranje.....                         | 16 |
| 3.4.4 | Priprava otopina za UHPLC analizu .....              | 18 |
| 3.4.5 | Uvjeti mjerenja.....                                 | 18 |
| 4     | REZULTATI I RASPRAVA .....                           | 20 |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.1   | Rezultati UHPLC analize .....          | 20 |
| 4.1.1 | Analiza Uzorka 1 .....                 | 20 |
| 4.1.2 | Rezultati UHPLC analize Uzorka 2 ..... | 24 |
| 4.2   | Rezultati modeliranja .....            | 27 |
| 5     | ZAKLJUČAK.....                         | 29 |
| 6     | LITERATURA.....                        | 30 |
| 7     | ŽIVOTOPIS .....                        | 32 |

# 1 UVOD

Promjene stabilnosti lijeka mogu utjecati na sigurnost pacijenata formiranjem toksičnih produkata ili mogu uzrokovati smanjenu učinkovitost samog lijeka. Zato je potrebno poznavati čistoću lijeka i njegovo ponašanje pri različitim uvjetima.

Cilj ovog rada je odrediti stabilnost aktivne farmaceutske supstance, API 2, kao samostalne komponente u Uzorku 1, te stabilnost iste kada se uz nju nalazi stabilna aktivna farmaceutska supstanca, API 1 (Uzorak 2). Stabilnost API-ja 1 poznata je od ranije.

Stabilitetna testiranja provedena su ubrzanim programom procjene stabilnosti, u daljnjem tekstu ASAP (engl. *Accelerated Stability Assessment Program*), koji pruža brže stabilitetne rezultate i bolja predviđanja stabilnosti odnosno roka trajanja (engl. *shelf-life*) nego što je to donedavno bilo moguće. Rezultati su pokazali da je model dobar za stabilitetne eksperimente jednokomponentnih i dvokomponentnih sustava.

## **2 TEORIJSKI DIO**

### **2.1 Stabilnost farmaceutskih pripravaka**

Stabilnost farmaceutskih proizvoda može se definirati kao sposobnost određene formulacije da ostane unutar svojih fizičkih, kemijskih, mikrobioloških, toksikoloških i informativnih specifikacija. Drugim riječima, stabilnost je podatak u kojoj mjeri farmaceutski proizvod zadržava, unutar specifikacijskog limita, tijekom cijelog razdoblja skladištenja i upotrebe, ista svojstva kao i u trenutku pakiranja.

Testiranje stabilnosti farmaceutskih proizvoda je složeni proces koji uključuje znatne troškove, utrošak vremena i znanstveni pristup kako bi se dobila kvalitetna, učinkovita i sigurna formulacija lijeka. Najvažniji koraci tijekom razvojnih faza uključuju farmaceutske analize i studije o stabilnosti koje su potrebne za određivanje i osiguranje identiteta, sadržaja i čistoće sastojaka, kao i formuliranih proizvoda.

Testiranje stabilnosti procjenjuje utjecaj okoliša na kakvoću ljekovite tvari ili formuliranog proizvoda te predviđa njihov rok trajanja, utvrđuje odgovarajuće uvjete skladištenja i predlaže upute za označavanje. Podaci dobiveni tijekom ispitivanja stabilnosti važan su zahtjev za odobrenje bilo kojeg lijeka ili formulacije.

Na stabilnost farmaceutskih pripravaka utječe niz različitih čimbenika kao što su: interakcija između aktivnih sastojaka i pomoćnih tvari, proizvodni proces, doziranje, vrsta skladištenja i pakiranja te uvjeti topline i vlažnosti tijekom prenošenja, skladištenja i rukovanja. Također važnu ulogu imaju reakcije degradacije kao što su oksidacija, redukcija, hidroliza ili racemizacija, koje ovise o nizu uvjeta kao što su koncentracija reaktanata, pH, zračenje i katalizatori. [1]

### **2.2 Testiranje stabiliteta**

Promjene stabilnosti lijeka mogu utjecati na sigurnost pacijenata formiranjem toksičnih produkata ili mogu uzrokovati smanjenu učinkovitost samog lijeka. Zato je potrebno poznavati čistoću lijeka i njegovo ponašanje pri različitim uvjetima.[2]

Farmaceutska stabilnost može se promatrati kroz nekoliko aspekata: stabilnost same aktivne supstance (skraćeno API), formulacija (API + ekscipijensi) ili sam pakirani proizvod.[3]

Prije nego što se formulira lijek, potrebno je odrediti karakteristike API-ja (aktivna farmaceutska supstanca). Potrebno je utvrditi njegovu čistoću i definirati dopuštene doze određenih onečišćenja (specifikacijski limit). Porast udjela nečistoća tijekom skladištenja mora se utvrditi podvrgavanjem API-ja različitim stresnim uvjetima skladištenja kako bi se utvrdili uvjeti koji uzrokuju razgradnju. Rane studije stabilnosti mogu odrediti da se API treba pohraniti u uvjetima kao što su niska temperatura, niska vlažnost zraka te ne-oksidirajuća i slabo osvijetljena okolina. Testiranje stabilnosti API-ja pružit će podatke za uspostavljanje vremena ponovnog testiranja za sirovine koje se koriste u procesu. Potrebno je razviti metode koje mogu pratiti čistoću API-ja kao i mogućnost identifikacije i kvantifikacije onečišćenja.[4]

### **2.2.1 Standardni pristup testiranja stabiliteta**

Smjernice o protokolima za ispitivanje stabilnosti, uključujući temperaturu, vlažnost i trajanje pokusa za određenu klimatsku zonu, kako bi se smanjili različiti uvjeti skladištenja na globalnoj razini, opisane su u priručnicima međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *The International Council for Harmonisation - ICH*)

Podaci formalnih stabilitetnih testiranja trebali bi se bazirati na najmanje tri primarne šarže farmaceutskog proizvoda. Šarže bi trebale biti proizvedene na razini pilot postrojenja istim sintetskim putem i metodom kao što će biti proizvedene konačne šarže.

Testiranja stabilnosti moraju se provoditi u ambalažama koje simuliraju konačno pakiranje lijekova za pohranu i distribuciju. Također ispitivanja se provode na temelju komponenti lijeka koje su podložne promjenama tijekom skladištenja i koje bi mogle utjecati na kvalitetu, sigurnost i/ili djelotvornost. Potrebno je obuhvatiti fizikalne, kemijske, biološke i mikrobiološke promjene.

Za dugoročno stabilitetno testiranje učestalost ispitivanja trebala bi biti dovoljna za uspostavljanje profila stabilnosti određenog lijeka. Predloženo vrijeme provođenja ispitivanja je minimalno 12 mjeseci. Ako se ispitivanja provode na duži period potrebno je kontrolirati

stabilnost na svakih 3 mjeseca tijekom prve godine, svakih 6 mjeseci za drugu godinu te svakih godinu dana u razdobljima duljim od 2 godine.

Uvjeti temperature i relativne vlažnosti postižu se unutar tzv. *walk in* komora u kojima se skladište ispitivani uzorci tijekom stabilitetnog testiranja.[4]

Tablica 1. *Uvjeti temperature i relativne vlažnosti dugoročnih stabilitetnih testiranja*

| T/ °C  | RH/ %  |
|--------|--------|
| 25 ± 2 | 60 ± 5 |
| 30 ± 2 | 65 ± 5 |
| 40 ± 2 | 75 ± 5 |

### 2.2.2 Ubrzano testiranje stabiliteta

Ubrzano testiranje stabiliteta pruža daleko brže stabilitetne rezultate i daleko bolja predviđanja stabilnosti odnosno roka trajanja lijeka nego što je to donedavno bilo moguće. Precizne procjene stabilnosti mogu se odrediti u roku od 2 tjedna. Štoviše, ASAP omogućuje povezivanje parametara (primjerice sadržaj vlage, temperatura, pakiranje) kako bi se optimirali troškovi, brzina i drugih čimbenici uz održavanje odgovarajuće stabilnosti.

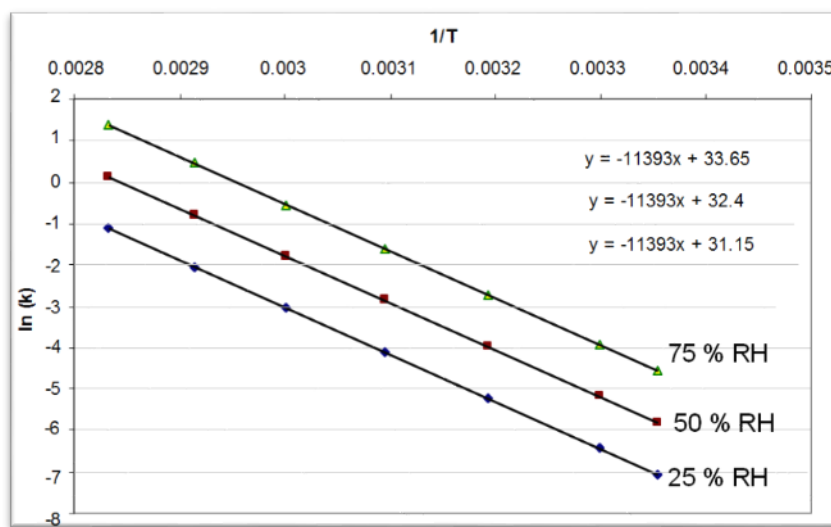
ASAP se sastoji od 5 koncepta[5]:

1. Koncept izokonverzije radi kompenzacije složenosti kinetike čvrstog stanja
2. Korigirana Arrheniusova jednadžba koja eksplicitno uzima u obzir učinak relativne vlažnosti (*RH*) na brzinu reakcije krute tvari
3. Statistički dizajn i analiza koji pružaju procjenu parametara i određuju pogreške za ekstrapolirani rok trajanja
4. Kombinirajući učinak relativne vlažnosti na stabilnost sa zaštitom koju pruža ambalaža pri različitim uvjetima skladištenja
5. Sposobnost određivanja kritičnih parametara koji utječu na stabilnost

Izokonverzija podrazumijeva da se promatra kinetika smjese, a ne sustava višestrukih komponenti, primjerice API 1 i API 2. Korigirana Arrheniusova jednadžba[6] (jed. 1) opisuje stabilnost lijeka kao funkciju temperature i vlage (slika 1):

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} + B(RH) \quad (1)$$

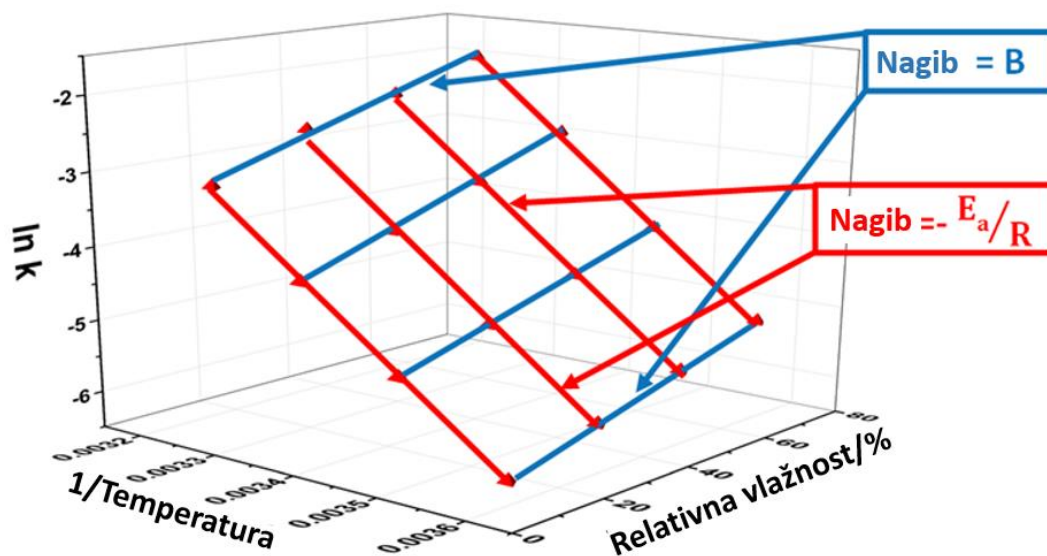
- $k$  – konstanta reakcije (porast degradacijskog onečišćenja)
- $A$  – Arrheniusova kolizijska frekvencija
- $E_a$  – energija aktivacije (J/mol)
- $R$  – opća plinska konstanta (8,314 J/(mol K))
- $T$  – apsolutna temperatura (K)
- $B$  – konstanta osjetljivosti vlage
- $RH$  – relativna vlažnost (%)



Slika 1. *Primjer kinetičkih modela kao funkcije temperature.*

*Tri pravca pokazuju različit utjecaj vlage na kinetiku.[7]*

Iz provedenih eksperimenata u stabilitetnim komorama dobije se niz točaka (kinetika, temperatura i relativna vlažnost) u trodimenzionalnom prostoru, što rezultira Arrheniusovom jednažbom za promatranu izokonverziju. Na slici 2 vidi se mreža koja je sačinjena od podataka iz potencijalnog eksperimenta. Mreža daje dva nagiba:  $B$  i  $E_a/R$ . Ta dva nagiba čine Arrheniusovu jednadžbu u koju je samo još potrebno uvrstiti podatke temperature i vlažnosti za koju se radi procjena.



Slika 2. Prikaz trodimenzionalnog parametarskog prostora. Planiranim eksperimentima se dobiju to\u010dke za odre\u0111enu temperaturu i vlagu. Ostatak prostora popunjava se statisti\u010dkim metodama unutar programskog paketa[7]

## 2.3 One\u010di\u0161ćenja

One\u010di\u0161ćenja (engl. *impurities*) u lijekovima su ne\u017eeljani spojevi koji zaostaju zajedno s API-jem ili se razvijaju tijekom formulacije te prilikom starenja API-ja i formulacije. Prisutnost tih ne\u017eeljenih one\u010di\u0161ćenja \u010dak i u tragovima mo\u017ee utjecati na u\u010dinkovitost i sigurnost farmaceutskog proizvoda, a neka od njih mogu biti i genotoksi\u010dna. Kontrola one\u010di\u0161ćenja je trenutno kriti\u010dna tema farmaceutske industrije. Me\u0111unarodna konferencija o harmonizaciji (ICH) formulirala je smjernice vezane uz kontrolu one\u010di\u0161ćenja.[8]

### 2.3.1 Klasifikacija one\u010di\u0161ćenja

One\u010di\u0161ćenja se mogu klasificirati kao:

- Organska one\u010di\u0161ćenja
- Anorganska one\u010di\u0161ćenja
- Ostatna otapala

Organska one\u010di\u0161ćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa i/ili skladi\u0161tenja nove ljekovite tvari. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva i uklju\u010duju:

- Polazne materijale
- Nusproizvode
- Intermedijere
- Produkte degradacije
- Reagense, ligande i katalizatore

Anorganska onečišćenja mogu nastati iz proizvodnog procesa. Pretežito su identificirana i sadrže:

- Reagense, ligande i katalizatore
- Teške metale ili rezidualne metale
- Anorganske soli
- Ostale materijale

Ostatna otapala su anorganske ili organske tekućine koje se koriste kao sredstva za pripremu otopine ili suspenzije u sintezi nove supstance.[9]

## 2.4 DryLab metoda

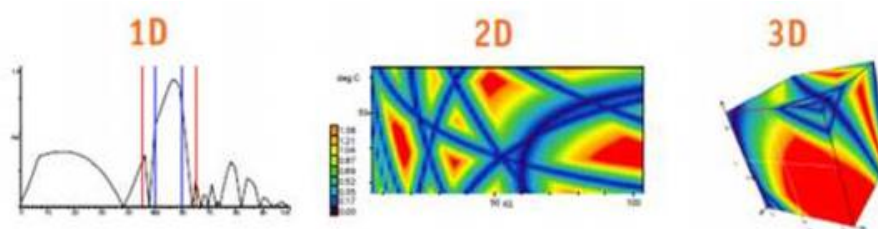
Prilikom razvoja HPLC ili UHPLC metode koriste se različite kolone, vrste otapala te dodaci pufera u pokretne faze. Potrebno je podešavati pH-vrijednost mobilne faze, što produžava vrijeme razvijanja efikasne metode. Kako bi se ubrzale analize, poboljšale efikasnosti te dobilo više specifičnih podataka o metodama, razvili su se brojni prediktivni kromatografski programski paketi.[10] Jedan od njih je *DryLab* (Molnar Institute, Berlin, Njemačka)[11] koji se koristi od 1986. godine. Svrha *DryLaba* je predikcija retencijskih vremena analita na osnovi eksperimentalnih podataka. Ulazni parametri su podaci poput pH-vrijednosti i protoka pokretne faze, temperature, trajanja eluiranja i rezolucije pikova na kromatogramu. Ovaj program smanjuje vrijeme potrebno za optimizaciju kromatografske metode u nekim rutinskim primjenama i pruža informacije o promjenama faktora (temperatura, vremenski gradijent, pH-vrijednost) prilikom kromatografskih analiza.



*DryLab* omogućuje praćenje faktora koji utječu na kvalitetu metode tako što se jasno mogu razlikovati utjecaji parametara (temperature, pH-vrijednosti, vremenskog gradijenta).[12,13]

U program se unesu prethodno dobivena retencijska vremena i površine signala komponenti uzorka iz početnih eksperimenata UHPLC analize. Na osnovi prepoznavanja površine signala komponenti, softver automatski prepoznaje i prati pikove. Prepoznavanje pikova je dobro ukoliko je početni volumen uzorka bio konstantan tijekom analize. Ukoliko se primijeti promjena površine moguće je da u sustavu imamo preklapanje pikova. Na pogreške u programu mogu utjecati signali slične površine, veliki broj komponenti, te neke promjene u retencijskom vremenu.

Parametri koji se najčešće ugađaju u softveru su temperatura, vrijeme i pH-vrijednost pokretne faze. Rezultat mijenjanja navedenih parametara je trodimenzijski prikaz ovisnosti jednog parametra o druga dva. S obzirom na broj parametara koji se želi modificirati dobiju se grafički prikazi u funkciji jednog parametra, 1D (kritična vrijednost parametra na y-osi), dva parametra, 2D (kritična vrijednost parametra predstavljena površinom odgovarajuće boje na dvodimenzionalnom grafu) ili tri parametra, 3D, gdje se dobije kocka čija površina predstavlja kritičnu vrijednost parametara (slika 3.)



Slika 3. Grafički prikaz 1D, 2D i 3D kritičnih rezolucija[13]

Crvena boja predstavlja mjesta gdje je došlo do zadovoljavajućeg odvajanja, dok su plavom bojom označena mjesta gdje postoje neka preklapanja ili gdje se pojavljuju neki drugi problemi tijekom analize.[13,14]

## 2.5 Tekućinska kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika koja se zasniva na odjeljivanju sastojaka ispitivanih uzoraka na temelju različitih brzina putovanja pojedinih sastojaka kroz sustav koji se sastoji od pokretne i nepokretne faze. Kako bi došlo do odjeljivanja njihovih sastojaka,

molekule moraju imati različiti afinitet prema nepokretnoj fazi. One molekule čiji je afinitet veći prema nepokretnoj fazi gibaju se sporije u odnosu na one koje imaju manji afinitet.

Kromatografske tehnike služe za odjeljivanje, kvantitativno određivanje i identifikaciju kemijskih sastojaka složenih smjesa.

Prema obliku kromatografske podloge, kromatografija se može podijeliti na kromatografiju na stupcu i plošnu kromatografiju.

Prema fizičkom stanju pokretne faze, kromatografija se može podijeliti na tekućinsku kromatografiju (pokretna faza je tekućina), plinsku kromatografiju (pokretna faza je plin) i kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (pokretna faza je superkritični fluid).

S obzirom na prirodu između pokretne i nepokretne faze tekućinsku kromatografiju dijelimo na:

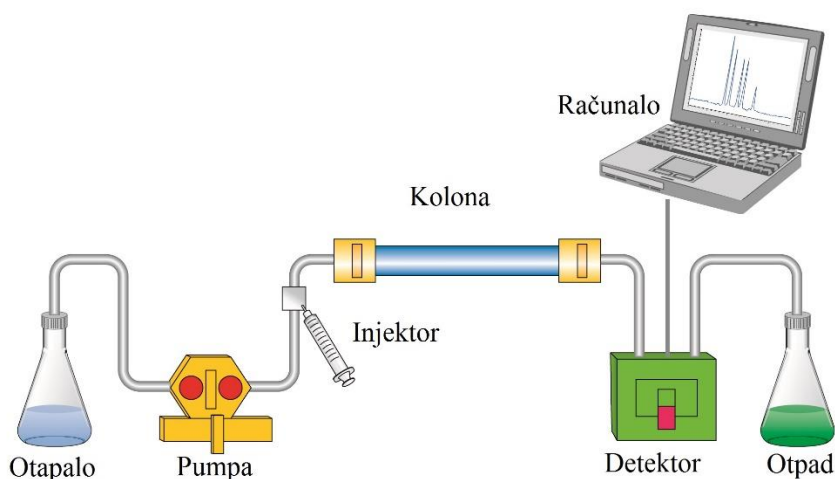
- *razdijelnu kromatografiju* u kojoj je nepokretna faza tekućina vezana na čvrsti inertni nosač,
- *adsorpcijsku kromatografiju* u kojoj je nepokretna faza čvrsti adsorbens, a pokretna faza je kapljevina ili plin,
- *afinitetnu kromatografiju* koja na površini čvrste faze posjeduje različite funkcionalne skupine,
- *kromatografiju isključenjem* pri kojoj je nepokretna faza materijal s porama i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima.

Tekućinsku kromatografiju s obzirom na pokretnu fazu možemo podijeliti na kromatografiju normalnih i kromatografiju obrnutih faza. Kod kromatografije normalnih faza nepokretna faza je polarna, dok je pokretna faza nepolarna. Odjeljivanje ovisi o interakciji polarnog analita s nepokretnom fazom koja je najčešće silikagel. Kod kromatografije obrnutih faza pokretna faza je polarna (silikagel), dok odjeljivanje ovisi o hidrofobnosti ili lipofilnosti analita.

Tekućinska kromatografija pogodna je za odjeljivanje smjesa koje se zbog niske hlapljivosti ili toplinske nestabilnosti ne mogu analizirati plinskom kromatografijom.[15,16]

## 2.5.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je vrsta kolonske tekućinske kromatografije. Razliku od obične tekućinske kromatografije čini primjena tlaka zbog kojeg pokretna faza brže prolazi kroz kolonu. Upravo zbog uporabe viših tlakova, ova metoda zahtjeva složeniju opremu (slika 4).[17,18]



Slika 4. Dijelovi HPLC kromatografa[18]

U sustavu mogu biti jedan ili više spremnika pokretne faze koji služe za skladištenje otapala iz kojega pumpa kontinuirano vuče određeni volumen određenog otapala. Pumpa sadrži filter koji sprječava mogući unos krutih onečišćenja u pumpu. Konstantan protok pokretne faze u sustavu omogućava upravo pumpa, koja radi pri jako visokim tlakovima. Postoje dvije vrste pumpi: pumpa s konstantnim tlakom i pumpa s konstantnim protokom. Pumpe s konstantnim protokom omogućavaju kontrolirano miješanje ukoliko se koristi kombinacija dva ili više otapala. Sastav pokretne faze može biti izokratan (stalan tijekom cijele analize) ili gradijentan (ukoliko se mijenja s vremenom analize).

Automatski uzorkivač služi za automatizirano unošenje uzorka u struju pokretne faze prije njenog ulaska u kolonu. Iz viala za uzorke unosi se točno određeni volumen zadan programom.

Kromatografska kolona je najčešće uska metalna cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza. Dimenzije kolone, duljina i unutarnji promjer, mogu se razlikovati od kolone do kolone. Duljina kolone u HPLC-u najčešće je od 100 do 250 mm, a promjer od 2 do 4,6 mm. [16,19] U koloni se nalazi nepokretna faza u vidu aktivne tvari nanosene na sitne krute čestice, čime

se dobiva veća mehanička otpornost nepokretne faze, a i povećava njena površina. Analizirani uzorak prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom. U pokretnu fazu unosi se mali volumen uzorka, a zbog različitih kemijskih interakcija s nepokretnom fazom i same prirode analizirane tvari, one se različito dugo zadržavaju vezane na nepokretnu fazu te u konačnici u različitim vremenima eluiraju iz kolone.

Kao HPLC detektori najčešće se koriste UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski detektor, maseni spektrometar ili detektor sa raspršivanjem svjetlosti. Svaki detektor je specifičan i razlikuje se u radu, ali svi daju signal koji je proporcionalan nekoj koncentraciji analita.

HPLC sustavom se upravlja pomoću računala, mogu se mijenjati i kontrolirati različiti izvedbeni parametri (protok, temperatura, sastav pokretne faze), a prikupljeni podaci mogu se dodatno obrađivati.[16,19,20]

### 3 EKSPERIMENTALNI DIO

Ovaj rad izrađen je u PLIVA d.o.o., Hrvatska te zbog poslovne tajne nije moguće iznositi točna imena uzoraka i aktivnih farmaceutskih supstanci kao ni njihove karakteristike. Uzorci su u daljnjem tekstu nazvani Uzorak 1 i Uzorak 2, a aktivne farmaceutske supstance API 1 i API 2.

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1 Kemikalije

Tijekom cijelog eksperimentalnog rada korištena je ultračista voda (0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , Mili-Q, Millipore, Merck, SAD). Ostale kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu rada navedene su u tablici 2.

Tablica 2. *Popis korištenih kemikalija*

| Naziv  | Proizvođač  | Čistoća |
|--|-------------|---------|
| $\text{H}_3\text{PO}_4$                            | J. T. Baker | p.a.    |
| acetonitril  | J. T. Baker | HPLC    |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | J. T. Baker | p.a.    |

#### 3.2 Instrumenti

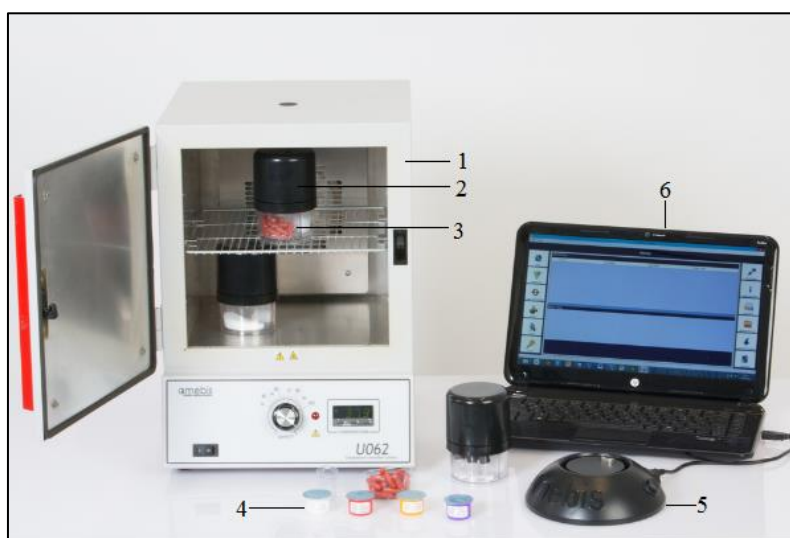
U ovom radu korišteni su sljedeći analitički instrumenti:

- analitička vaga (Mettler Toledo, XPE 205)
- analitička mikrovaga (Mettler Toledo, XP2U)
- pH metar (Mettler Toledo, SevenExcellence Multiparametar)
- stabilitetne komore (Amebis, Dublin, Irska)
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- ultrazvučna kupelj (Elmasonic P, Elma, Njemačka)
- tresilica (IKA VORTEX Genius 3, Sigma-Aldrich, Merck, Njemačka)

### 3.2.1 Stabilitetne komore

Stabilitetna ispitivanja provedena su u Amebis termostatisanim komorama koje su vidljive na slici 5. Dijelovi potrebni za provođenje ASAP testiranja su:

1. Stabilitetna komora (Amebis, Dublin, Irska)
2. Sensor Cap (Amebis, Dublin, Irska)
3. Logger Cap (Amebis, Dublin, Irska)
4. Kapsule za reguliranje relativne vlažnosti u sustavu (Amebis, Dublin, Irska)
5. Stanica za povezivanje Sensor Cap-a sa računalom (Amebis, Dublin, Irska)
6. Računalo



Slika 5. Sustav za provedbu ASAP testiranja



Slika 6. Prikaz pripremljenog sustava za ASAP testiranje; logger cap s unešenim uzorcima i kapsulom za reguliranje vlage u sustavu

### 3.2.2 HPLC/UHPLC sustav

Za analizu svih uzoraka korišten je HPLC/UHPLC kromatograf Agilent Technologies 1290 Infinity II (slika 7) koji se sastoji od kvaterne pumpe, automatskog uzorkivača, termostatisirane komore za kolonu i DAD detektor (svi model 1290 Infinity).



Slika 7. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti 1290 Infinity II, Agilent Technologies

Pri svim analizama korištena je brzina protoka pokretne faze od 0,5 mL/min i volumen injektiranja 2  $\mu$ L, dok je valna duljina detekcije iznosila 241 nm.

### 3.3 Računalni alati

U ovom radu korišteni su sljedeći programski paketi:

- Empower V2 (Waters, Velika Britanija)
- Amebis ASAP Prime V5.0.1 (Dublin, Irska)
- DryLab V4
- MS Excel 2010

### 3.4 Eksperimentalni postupak

#### 3.4.1 Razvoj UHPLC metode

Kako bi se odredili točni uvjeti UHPLC analize uzoraka, bilo je potrebno provesti nekoliko preliminarnih testiranja. Testiranja su provedena na rezolucijskoj<sup>1</sup> otopini pri različitim uvjetima temperature, pH i trajanja analize uz primjenu 3 različite kromatografske kolone (tablica 3). Uvjeti testiranja prikazani su također u tablici 3. Kombinacijom navedenih uvjeta, na svakoj od triju ispitanih nepokretnih faza (kromatografskih kolona) provedeno je 12 različitih analiza.

Tablica 3. Uvjeti testiranja za razvoj UHPLC metode

|                      |   |
|----------------------|---|
| Kolona               | Acquity CSH C18, 2,1×100 mm, 1,7 μm           |
|                      | Acquity Phenyl Hexyl, 2,1×100 mm, 1,7 μm      |
|                      | Acquity CSH Fluoro Phenyl, 2,1×100 mm, 1,7 μm |
| 10 mM fosfatni pufer | pH = 2,0                                      |
|                      | pH = 3,0                                      |
|                      | pH = 4,0                                      |
| Temperatura kolone   | 30 °C   |
|                      | 60 °C   |
| Trajanje analize     | 10 min  |
|                      | 30 min  |

Za pokretnu fazu A korišten je 10 mM fosfatni pufer različitih pH vrijednosti, za pokretnu fazu B koristio se čisti acetonitril. Za pripremu pufera odvagano je 2,74 mg

<sup>1</sup> Rezolucijska otopina – otopina koja se injektira za identifikaciju onečišćenja i provjeru prikladnosti sustava.



Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O u čašu volumena 2 L te se menzutom dodalo 2 L ultračiste vode. Fosfatnom kiselinom korigiran je pH do željene vrijednosti.

### 3.4.2 DryLab metoda

Za DryLab metodu koristili su se uvjeti postavljeni na UHPLC-u. Temperatura kolone 30 °C i 60 °C, a vrijeme trajanja iznosilo je 10 i 30 minuta. Protok pokretne faze iznosio je 0,5 mL/min. Analizom rezultata DryLab metode dobiveni su parametri s kojima se ponovilo snimanje UHPLC-a. Temperatura kolone iznosila je 30 °C s vremenom trajanja analize od 17 min.

### 3.4.3 Stabilitetno testiranje

Za dizajniranje stabilitetnih uvjeta korišten je programski softver ASAP Prime. Softver na temelju unesenih parametara, kao što su temperatura i relativna vlažnost (RH %), izračunava uvjete stabilitetnog testiranja. Kada se u program ne unesu podaci o pakiranju uzorka program uzima u obzir da se radi o otvorenoj posudi što je u ovom testiranju i bio slučaj.

Testiranje se provodilo uz praćenje degradacije uzorka uz konstantnu relativnu vlagu. Parametri koje je bilo potrebno unijeti su uvjeti temperature pri kojima će se testiranja provoditi. U ovom slučaju to su bile 3 termostatisane komore na 60, 70 i 80 °C. Sljedeći korak je unos specifikacijskog limita<sup>2</sup> (0,5 %), broja testiranja (22) i duljina testiranja (21 dan).

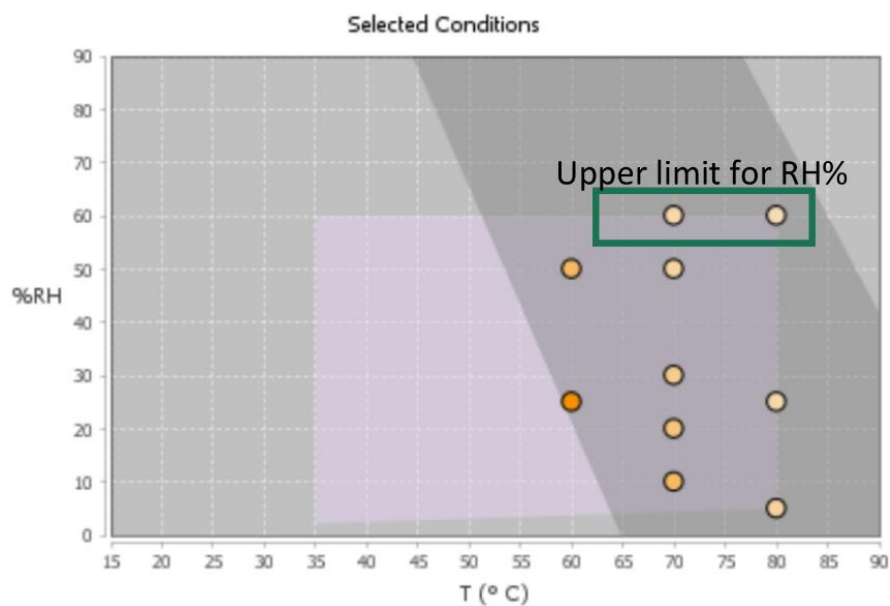
Nakon svih unesenih poznatih parametara program izračunava uvjete potrebne za stabilitetna testiranja na temelju poznatih rezultata testiranja i prema vlazi korigirane Arrhenius-ove jednadžbe (jed. 1). Parametri i uvjeti testiranja prikazani su u tablici 4 i na slici 8.

Tablica 4. *Uvjeti stabilitetnog testiranja*

| <i>T / °C</i> | <i>RH / %</i> | <i>Vrijeme / dan</i> |
|---------------|---------------|----------------------|
| 60            | 25            | 7, 9, 15             |
| 60            | 50            | 4, 8, 15             |
| 70            | 10            | 2, 4, 15             |
| 70            | 20            | 3, 15                |

<sup>2</sup> Specifikacijski limit predstavlja maksimalnu dopuštenu količinu onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj supstanci, a definiran je na temelju dnevne doze aktivne farmaceutske supstance.

|    |    |          |
|----|----|----------|
| 70 | 30 | 2, 15    |
| 70 | 50 | 1, 7, 15 |
| 70 | 60 | 1, 3, 8  |
| 80 | 5  | 1, 8, 13 |
| 80 | 25 | 1, 4, 7  |
| 80 | 60 | 1, 2     |



Slika 8. Grafički prikaz uvjeta stabilitetnog testiranja

Vagano je 25 mg Uzorka 1 u otvorenu HPLC vialu i 25 mg Uzorka 2 u drugu otvoreni HPLC vialu. Vaganje je ponavljano svaki od navedenih dana za uvijete navedene u tablici 4. Tako vagani uzorci postavljeni su u posude za održavanje konstantnosti vlage (Logger Cap). U posudi se zajedno s uzorkom nalaze kapsule čija je funkcija da održavaju konstantan sadržaj vlage u sustavu. Zatvarač komore opremljen je senzorom (Sensor Cap) koji je povezan s računalom, te mu šalje podatke o temperaturi i sadržaju vlage unutar komore Tako pripremljeni sustav stavlja se u termostatirane komore na određene uvijete temperature. Sustav je prikazan na slikama 5 i 6.

### 3.4.4 Priprava otopina za UHPLC analizu

Za UHPLC analizu pripremljene su dvije pokretne faze: A i B, čijim miješanjem je ostvarivana konačna mobilna faza za provedbu kromatografske analize. Kao pokretna faza A pripremljeno je 2 L 0,1 %-tne otopine H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: u 2 L vode dodan je 1 mL otopine H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Kao pokretna faza B koristio se čisti acetonitril (ACN).

Također pripravljeno je i otapalo za ispitivani uzorak (u daljnjem tekstu diluent). Kao diluent korištena je otopina acetonitrila i vode u omjeru 1:1.

Otopine uzoraka prije i nakon ispitivanja stabilneta pripremane su na isti način. Za uzorak 1 pripremane su otopine masene koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup>, odnosno masene koncentracije 2 mg mL<sup>-1</sup> za uzorak 2. Odvagalo bi se 10 mg prvog, odnosno 20 mg drugog uzorka na analitičkoj mikrovagi i otopilo u 10 mL diluenta. Za otapanje je bilo potrebno miješati na Vortex miješalici i koristiti ultrazvučnu kupelj. Tako pripremljene otopine uzoraka pretočene su u vijale i postavljene u automatski uzorkivač UHPLC-a.

### 3.4.5 Uvjeti mjerenja

Prethodno pripremljeni uzorci uzorkovani su na UHPLC-u. Parametri mjerenja i instrumenta navedeni su u tablici 5.

Tablica 5. *Kromatografska metoda*

| Instrument         | Agilent Technologies 1290 Infinity II                    |            |            |
|--------------------|--|------------|------------|
| Kolona i pakiranje | Waters Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl; 100·2,1 mm; 1,7 μm |            |            |
| Eluent A           | 0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                      |            |            |
| Eluent B           | Acetonitril  |            |            |
| Gradijent          | Vrijeme (min)  | % Eluent A | % Eluent B |
|                    | 0  | 65         | 35         |
|                    | 8  | 60         | 40         |
|                    | 12   | 10         | 90         |
|                    | 15   | 10         | 90         |
|                    | 15,01  | 65         | 35         |
|                    | 17   | 65         | 35         |

|                    |                                |
|--------------------|--------------------------------|
| Trajanje analize   | 17 min                         |
| Temperatura kolone | 30 °C                          |
| Diluent            | ACN : H <sub>2</sub> O = 50:50 |

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je odrediti stabilnost aktivne farmaceutске supstance, API 2, kao samostalne komponente u Uzorku 1 te stabilnost istog u Uzorku 2 gdje se uz njega nalazi stabilna aktivna farmaceutska supstanca, API 1.

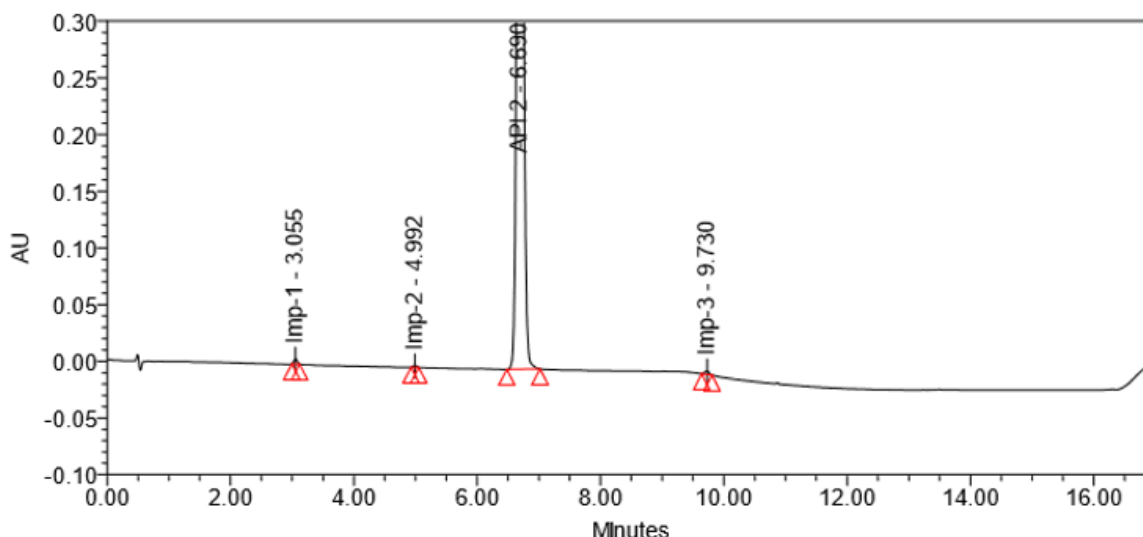
### 4.1 Rezultati UHPLC analize

Tijekom ASAP testiranja Uzorak 1 i Uzorak 2 bili su izloženi uvjetima prikazanim u tablici 4.

#### 4.1.1 Analiza Uzorka 1

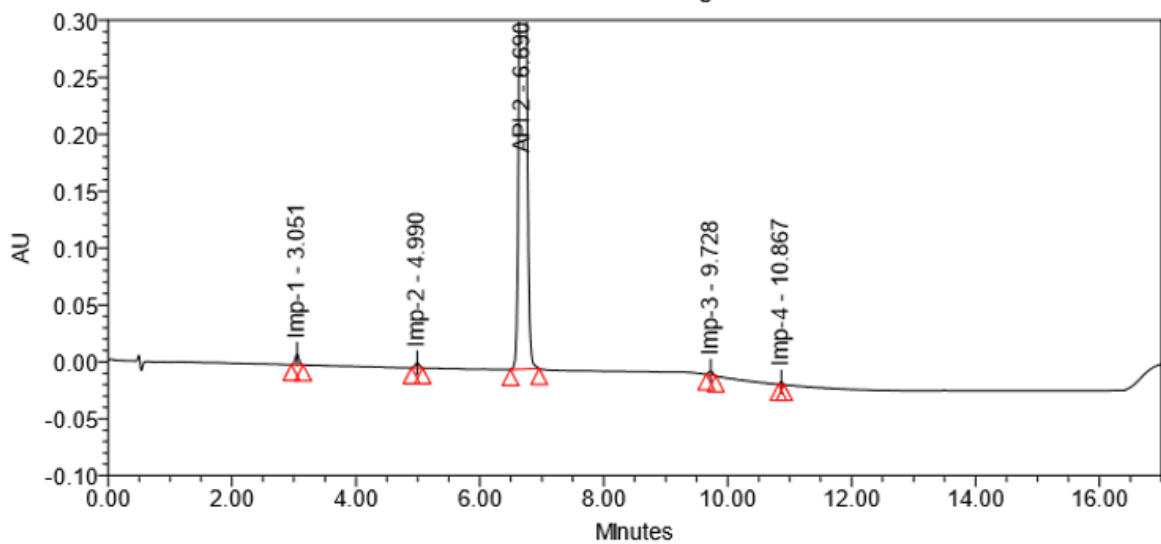
Na slikama 9-11 prikazani su kromatogrami Uzorka 1 koji je pri ASAP testiranju bio tijekom 1, 3 i 8 dana izložen temperaturi od 70 °C i 60 %-tnoj relativnoj vlažnosti.

Na slici 9 vidljivo je kako je već tijekom prvog dana došlo do raspada API-ja 2 te su pri tome nastala 3 onečišćenja: Imp-1, Imp-2 i Imp-3. Na slikama 10 i 11 vidljiv je porast nastalih onečišćenja u narednim danima kao i novonastalo onečišćenje, Imp-4, koje očito nastaje dugotrajnijim izlaganjem uzoraka testnim uvjetima.

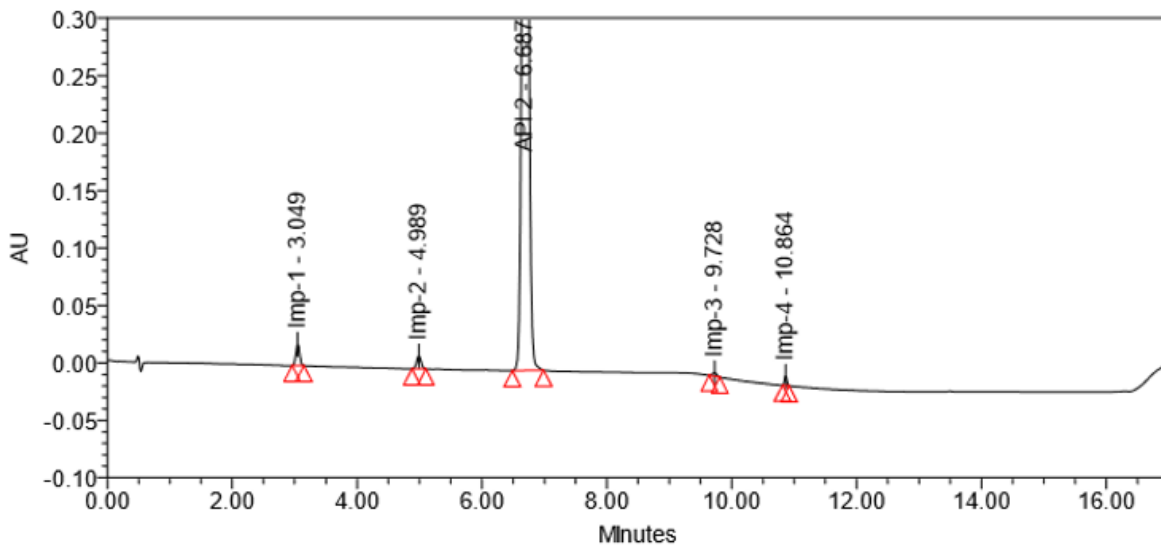


Slika 9. Kromatogram Uzorka 1 nakon 1 dana izlaganja ASAP uvjetima

$T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$

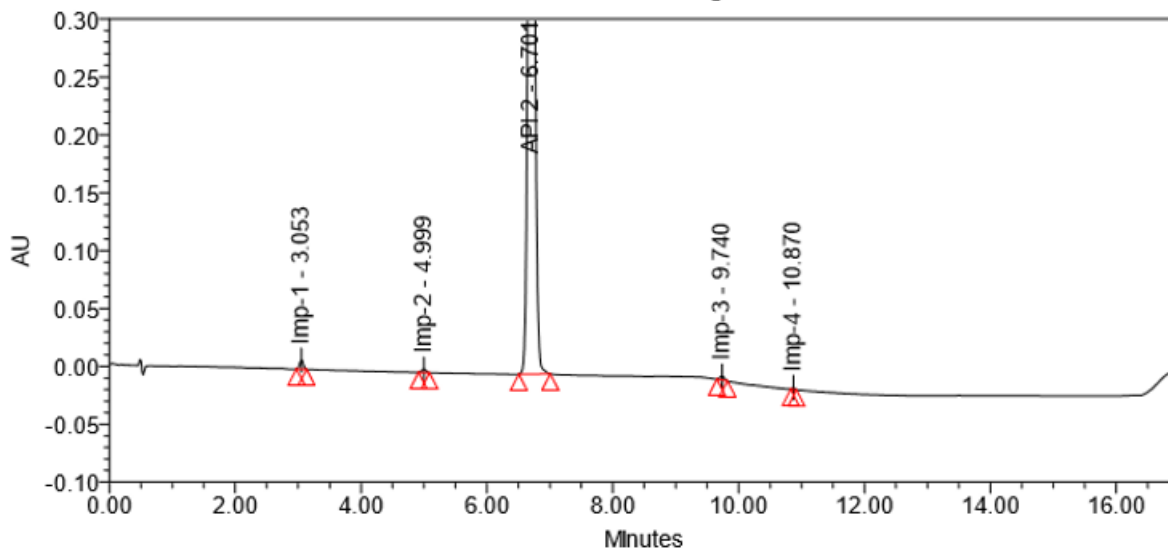


Slika 10. Kromatogram Uzorka 1 nakon 3 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$

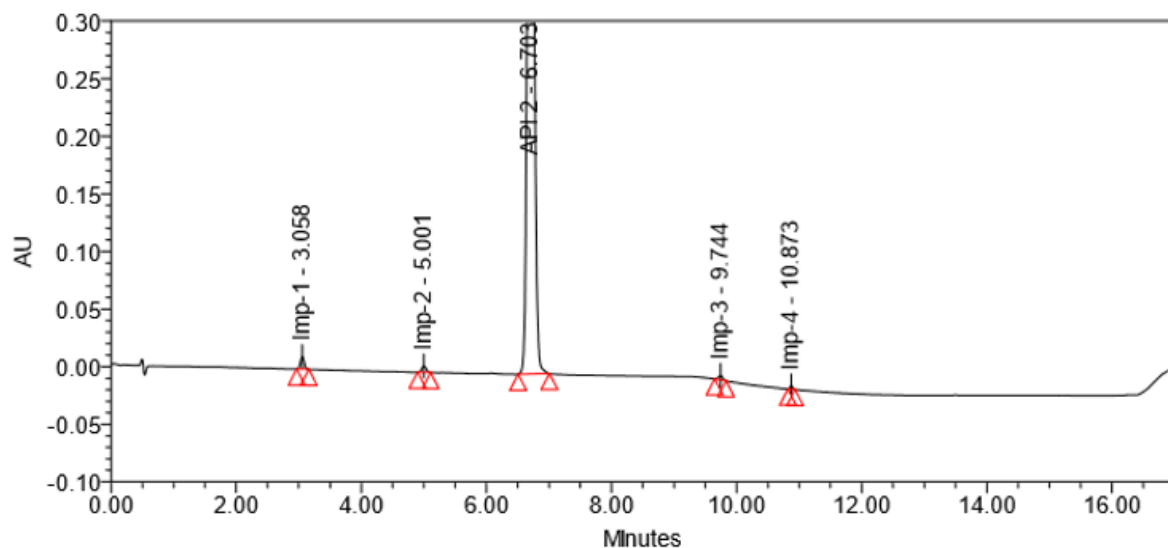


Slika 11. Kromatogram Uzorka 1 nakon 8 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$

Na slikama 12 i 13 prikazani su kromatogrami Uzorka 1 koji je pri ASAP testiranju bio izložen temperaturi  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 60 %-tnoj relativnoj vlažnosti, u vremenskom trajanju od 1 odnosno 2 dana. Na slikama je vidljiv raspada API-ja 2 uz nastanak 4 onečišćenja, Imp-1, Imp-2, Imp-3 i Imp-4.



Slika 12. Kromatogram Uzorka 1 nakon 1 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$



Slika 13. Kromatogram Uzorka 1 nakon 2 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako se povišenjem temperature, pri istim uvjetima relativne vlažnosti, raspad API-ja 2 ubrzava te je potreban manji vremenski period kako bi došlo do nastanka onečišćenja.

U tablici 6 prikazani su rezultati ASAP testiranja Uzorka 1 pri svim navedenim uvjetima temperature i relativne vlažnosti. Dobiveni rezultati pokazuju da je API 2 stabilan na uvjetima niže relativne vlažnosti te ne dolazi do pojave onečišćenja, a raspada se pri uvjetima

relativne vlažnosti od 60 % što je bila gornja granica ovog testiranja. Također s porastom vremena izloženosti API-ja raste i broj nastalih onečišćenja (pojava Imp-4).

Rezultati su obrađeni u programskom softveru Empower 2 metodom Area%. Površine pikova onečišćenja određivale su se na temelju glavnog pika (u ovom slučaju glavni pik je API 2).

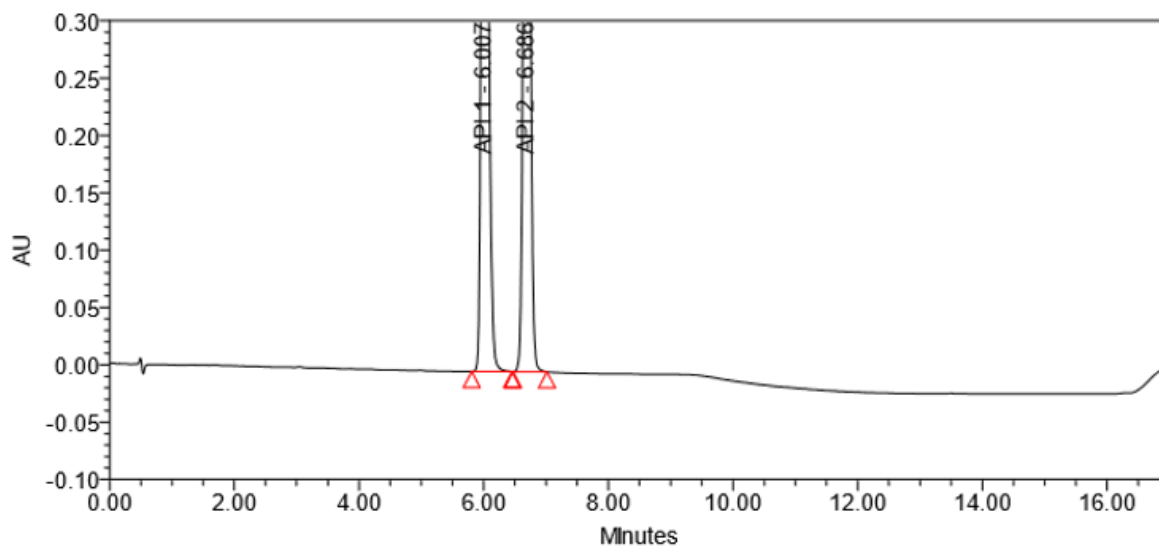
Tablica 6. Prikaz rezultata UHPLC analize za Uzorak 1

| Uvjeti mjerenja |      |             | Degradacija uzorka |       |       |       |       |
|-----------------|------|-------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| T/°C            | RH/% | Vrijeme/dan | API 2              | Imp-1 | Imp-2 | Imp-3 | Imp-4 |
| 60              | 25   | 7           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60              | 25   | 9           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60              | 25   | 15          | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60              | 50   | 4           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60              | 50   | 8           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60              | 50   | 15          | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 10   | 2           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 10   | 4           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 10   | 15          | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 20   | 3           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 20   | 15          | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 30   | 2           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 30   | 15          | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 50   | 1           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 50   | 7           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 50   | 11          | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70              | 60   | 1           | 99,44              | 0,25  | 0,09  | 0,22  | 0,00  |
| 70              | 60   | 3           | 98,66              | 0,63  | 0,35  | 0,25  | 0,11  |
| 70              | 60   | 8           | 97,16              | 1,27  | 0,92  | 0,27  | 0,38  |
| 80              | 5    | 1           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 80              | 5    | 8           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 80              | 5    | 13          | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 80              | 25   | 1           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 80              | 25   | 4           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 80              | 25   | 7           | 100,00             | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 80              | 60   | 1           | 98,40              | 0,51  | 0,22  | 0,27  | 0,07  |
| 80              | 60   | 2           | 98,93              | 0,73  | 0,44  | 0,29  | 0,14  |

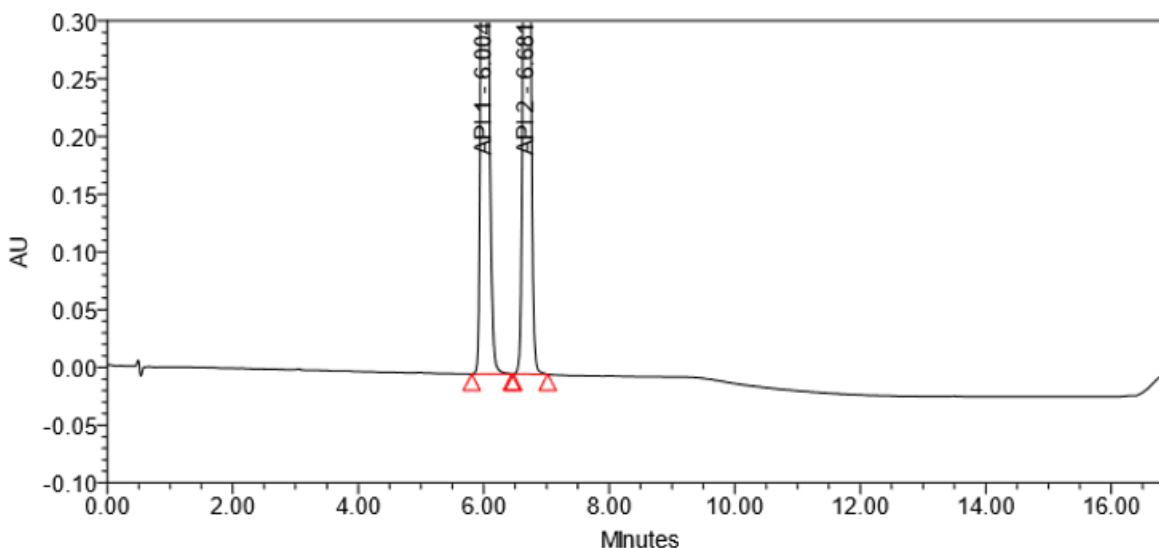


#### 4.1.2 Rezultati UHPLC analize Uzorka 2

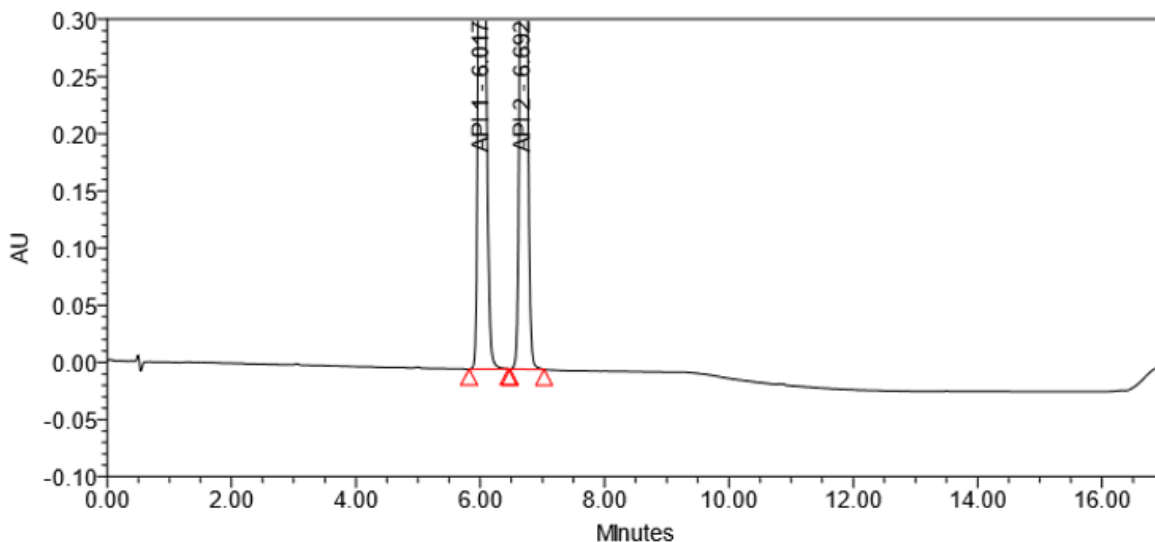
Na slikama 14-16 prikazani su kromatogrami Uzorka 2 koji je pri ASAP testiranju podvrgnut temperaturi 70 °C i relativnoj vlažnosti 60 %, tijekom 1, 3 i 8 dana. Vidljivo je postizanje stabilizacije API-ja 2 jer, u usporedbi s Uzorkom 1 pri istim uvjetima, nema nastalih onečišćenja.



Slika 14. Kromatogram Uzorka 2 nakon 1 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\text{ }%$



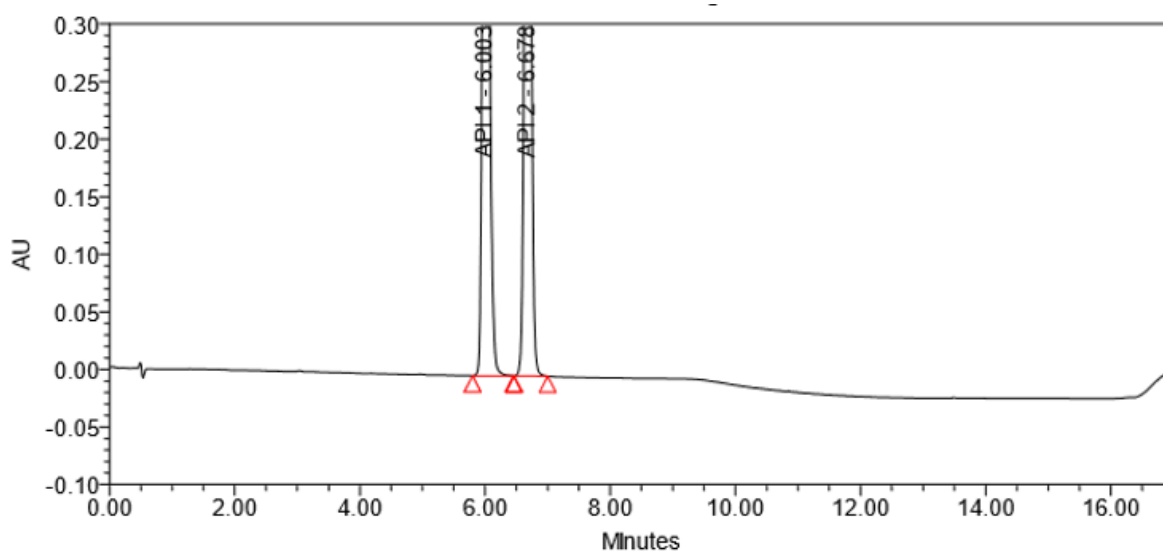
Slika 15. Kromatogram Uzorka 2 nakon 3 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\text{ }%$



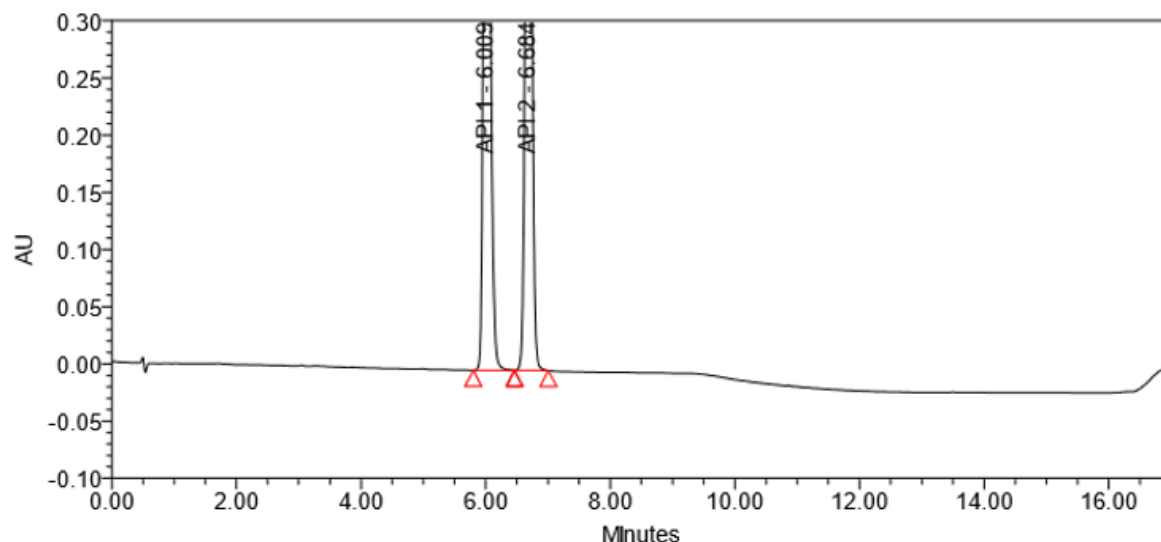
Slika 16. Kromatogram Uzorka 2 nakon 8 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$

Na slikama 17 i 18 prikazani su kromatogrami Uzorka 2 koji je pri ASAP testiranju podvrgnut temperaturi  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i relativnoj vlažnosti  $60\%$ , tijekom 1 odnosno 2 dana. Vidljivo je kako ni pri višoj temperaturi nije došlo do raspada Uzorka 2.

Uzorak 2 sastojao se od ispitivanog API-ja 2 i stabilne API 1 komponente, a bio je izložen istim uvjetima temperature i relativne vlažnosti kao i Uzorak 1. Ovime je dokazan stabilizacijski utjecaj API 1 komponente na komponentu API 2, odnosno potvrđeno je da stabilna aktivna farmaceutska supstanca može stabilizirati manje stabilnu.



Slika 17. Kromatogram Uzorka 2 nakon 1 dana izlaganja ASAP uvjetima  
 $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$



Slika 18. Kromatogram Uzorka 2 nakon 2 dana izlaganja ASAP uvjetima

$T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $RH = 60\%$

U tablici 7 prikazani su rezultati ASAP testiranja Uzorka 2 pri svim navedenim uvjetima temperature i relativne vlažnosti. Dobiveni rezultati pokazuju da je API 2 stabilan na svim testiranim uvjetima uz prisutnost stabilnog API-ja 1 te ne dolazi do nastanka onečišćenja.

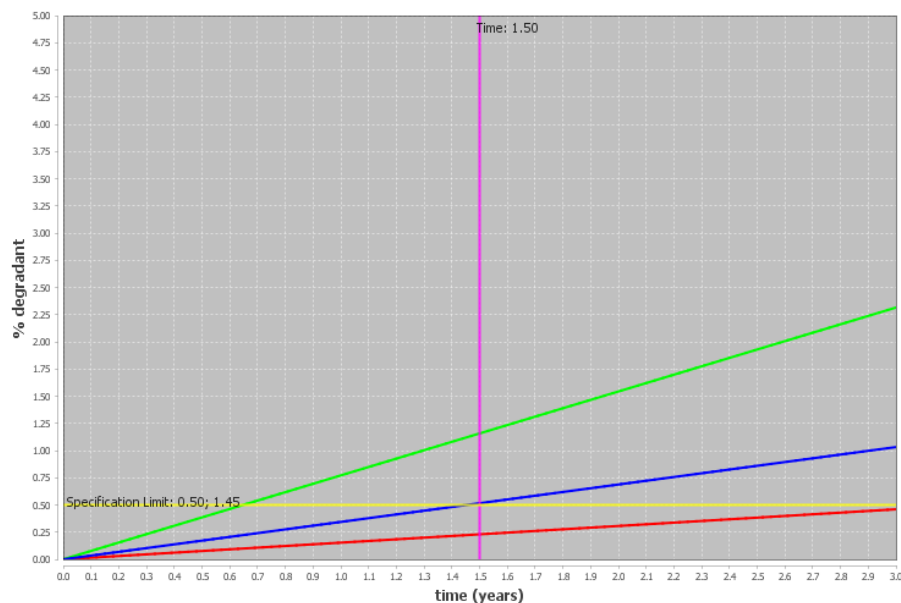
Tablica 7. Prikaz rezultata UHPLC analize za Uzorak 2

| Uvjeti mjerenja      |         |             | Degradacija uzorka |       |       |       |       |       |
|----------------------|---------|-------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $T/^{\circ}\text{C}$ | $RH/\%$ | Vrijeme/dan | API 1              | API 2 | Imp-1 | Imp-2 | Imp-3 | Imp-4 |
| 60                   | 25      | 7           | 50,55              | 49,45 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60                   | 25      | 9           | 50,51              | 49,49 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60                   | 25      | 15          | 50,50              | 49,50 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60                   | 50      | 4           | 50,51              | 49,49 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60                   | 50      | 8           | 50,47              | 49,53 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 60                   | 50      | 15          | 50,47              | 49,53 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 10      | 2           | 50,51              | 49,49 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 10      | 4           | 50,49              | 49,51 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 10      | 15          | 50,51              | 49,49 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 20      | 3           | 50,53              | 49,47 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 20      | 15          | 50,54              | 49,46 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 30      | 2           | 50,49              | 49,51 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 30      | 15          | 50,50              | 49,50 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 50      | 1           | 50,51              | 49,49 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |
| 70                   | 50      | 7           | 50,49              | 59,51 | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |

|    |    |    |       |       |      |      |      |      |
|----|----|----|-------|-------|------|------|------|------|
| 70 | 50 | 11 | 50,52 | 49,48 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 70 | 60 | 1  | 50,55 | 49,45 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 70 | 60 | 3  | 50,53 | 49,47 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 70 | 60 | 8  | 50,55 | 49,45 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 5  | 1  | 50,52 | 49,48 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 5  | 8  | 50,51 | 49,49 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 5  | 13 | 50,52 | 49,48 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 25 | 1  | 50,51 | 49,49 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 25 | 4  | 50,52 | 49,48 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 25 | 7  | 50,51 | 49,49 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 60 | 1  | 50,53 | 49,47 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 80 | 60 | 2  | 50,57 | 49,43 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

## 4.2 Rezultati modeliranja

Na slici 19 vidi se primjer izlaznih podataka iz ASAP programskog paketa za Imp-1. Primijenjeni programski paket predviđa vijek trajanja uzorka na temelju Arrheniusove jednadžbe i doseganje degradacijskog onečišćenja prema specifikaciji (0,5%). Tri linije na slici 19 daju prostor vjerojatnosti vijeka trajanja. Zelena linija predstavlja najgori slučaj, a to je 80% vjerojatnosti da će uzorak prijeći vijek trajanja od svega 0,6 godina. Plava linija predstavlja 48% vjerojatnosti da će vijek trajanja biti veći od 1,5 godine, a crvena linija granicu 20% vjerojatnosti da će uzorak potrajati dulje od tri godine. Žuta linija je oznaka za specifikacijski limit.



Slika 19. Grafički prikaz rezultata predviđanja doseganja specifikacijskog limita Imp-1

ASAP programski paket na isti način predviđa vijek trajanja i za ostala onečišćenja (Imp-1, Imp-2, Imp-3 i Imp-4). Ostvareni rezultati su prikazani u tablici 9. Rezultati su temeljeni na vrijednostima temperature od 45 °C i relativne vlažnosti od 60 %.

Tablica 8. Rezultati ostvareni putem ASAP programskog paketa za svako od 4 zamijećena onečišćenja

| Specifikacijski limit | Imp | Vrijeme/god | Vjerojatnost/% |
|-----------------------|-----|-------------|----------------|
| 0,5                   | 1   | 1,5         | 48,44          |
|                       | 2   |             | 80,23          |
|                       | 3   |             | 70,84          |
|                       | 4   |             | 69,90          |

## 5 ZAKLJUČAK

Eksperimentom je potvrđeno kako je ASAP dobar model za ispitivanje stabilnosti dvokomponentnih uzoraka.

Uzorak 1 stabilan je pri nižim vrijednostima relativne vlažnosti, a do njegovog raspada dolazi pri relativnoj vlažnosti od 60%.

Povišenjem temperature dolazi do povećane degradacije Uzorka 1.

Uzorak 2 pokazao se stabilnim pri svim uvjetima relativne vlažnosti i temperature.

Ostvareni rezultati pokazali su kako se stabilnost nestabilnog API-ja može povećati uvođenjem druge, stabilne API komponente.

## 6 LITERATURA

1. Bajaj, S., Singla, D., Sakhuja, N., Stability Testing of Pharmaceutical Products, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2** (2012)
2. <http://www.sgs.es> (pristup 17. kolovoza 2017.)
3. Cartensen, J., T., *Drug Stability: principles and practices*, Marcel Dekker Inc., New York, 2000
4. ICH Harmonised tripartite guidelines for stability testing of new drug substances and products-Q1A (R2)
5. Waterman, K., C., *The Application of the Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) to Quality by Design (QbD) for Drug Product Stability*, *AAPS PharmSciTech*, **2**, 2011.
6. Waterman, K., C., Unpublished results presented at American Association of Pharmaceutical Sciences National Meeting, New Orleans, 2010.
7. Lovrić, M., Posavec, R., Sindičić, V., Mikulčić, V., Runje, M., Accelerated Stability Assessment Program in API development, *PLIVA Hrvatska d.o.o.*, Zagreb, Croatia
8. Rama Rao, N., Mani Kiran, S. S., Prasanthi, N. L., *Pharmaceutical Impurities: An Overview*, *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, **44**, 2010.
9. ICH Harmonised tripartite guidelines for stability testing of new drug substances and products-Q3A (R2)
10. Krisko, R., M., McLaughlin, K., Koenigbauer, M., J., Lunte, C., E., Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development, *Journal of Chromatography A.*, **1121**, 2006
11. <http://molnar-institute.com> (pristupljeno 18. kolovoza 2017.)
12. Molnar, I., Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: Development of DryLab software, *Journal of Chromatography A.*, **965**, 1976
13. Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *Journal of Chromatography A.*, **125**, 1976
14. DryLab 4, Next generation in HPLC Modeling.: Molnar institute
15. Kaštelan-Macan, M., *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, 2003.

16. Skoog, D., A., West, D., M., Holler, F., J., Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
17. Novakova, L., Havlikova, L., Vlčkova, H., Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC, TrAc Trend sin Anal. Chem., **63**, 2014.
18. Toppner, K., Ultrapure Water for HPLC Analysis, G.I.T. Laboratory Journal, **17**, 2014.
19. Snyder, L., R., Kirkland, J., J., Dolan, J., W., Introduction to Modern Liquid Chromatography, A John Wiley and Sons, New Jersey, 1979.
20. Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass chromatography-tandem mass chromatography (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, Talanta, **70**, 2006.



## 7 ŽIVOTOPIS

Valnea Sindičić [REDACTED] Pohađala je srednju Medicinsku školu u Rijeci od 2007. do 2011. godine. Nakon završene srednje škole odrađuje godinu dana strukovnog usavršavanja. Godine 2012. upisuje Preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija odradila je stručnu praksu u PLIVA Hrvatska d.o.o. na odjelu Analitičke kemije gdje nakon završene stručne prakse nastavlja raditi kao student suradnik.