Primjena koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn u životnome ciklusu metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Beti Blašković, Nives

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:300450

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nives Beti Blašković

PRIMJENA KONCEPTA KAKVOĆE UTEMELJENE KROZ DIZAJN U ŽIVOTNOME CIKLUSU METODA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: Izv. prof. dr.sc. Jadranka Vuković Rodríguez

Specijalistički rad obranjen je dana 11.srpnja 2016. godine na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Anita Hafner
   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. izv. prof. dr. sc. Jadranka Vuković Rodríguez
   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek, znanstv. savj.
   PLIVA Hrvatska d.o.o., Zagreb

Rad ima 94 lista.

Ovaj specijalistički rad izrađen je u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jadranke Vuković Rodríguez.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Jadranki Vuković Rodríguez na energiji, entuzijazmu, potpori i savjetima koje mi je pružila tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se tvrtki Pliva koja mi je omogućila poslijediplomski specijalistički studij, te rukovoditeljicama i kolegama na potpori i razumijevanju.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na velikoj podršci i strpljenju.

SAŽETAK

Cilj ovog specijalističkog rada je razjasniti i pregledno prikazati bitne značajke koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn (engl. *Quality by design*, QbD) i opisati način njegove primjene u razvoju analitičkih metoda s naglaskom na primjenu u razvoju, optimiranju i validaciji metoda HPLC te prikazati kako se načela životnog ciklusa mogu primijeniti za analitičke metode. U radu je također oblikovana baza podataka o metodama HPLC u čijem su razvoju i optimiranju primijenjeni elementi QbD koncepta.

Istraživanja u okviru ovoga specijalističkog rada su teorijskog karaktera i uključuju detaljan pregled dostupne literature iz područja QbD koncepta, primjene QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda te specifičnu primjenu QbD koncepta u razvoju i optimiranju metoda HPLC. U pretraživanju su korištene dostupne bibliografske baze podataka i servisi: Medline/PubMed, Scopus, ScienceDirect i ResearchGate, te baze podataka dostupne na web stranicama FDA, EMA – e i ICH.

Prikaz općih smjernica za primjenu QbD koncepta u farmaceutskom razvoju i opis kako se one mogu primijeniti u razvoju, optimiranju i validaciji analitičkih metoda s naglaskom na primjenu za metode HPLC, služit će kao praktičan obrazac koji će pomoći u planiranju razvoja i validacije analitičkih metoda. Oblikovana baza podataka o metodama HPLC u čijem su razvoju i optimiranju primijenjeni elementi QbD koncepta može poslužiti kao model prilikom razvoja i optimiranja metoda HPLC.

Primjena QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda osigurava razvoj pouzdanih, izdržljivih i otpornih metoda koje omogućuju pouzdano testiranje i potvrdu kakvoće lijekova kroz njihov cijeli životni ciklus. Korištenjem QbD pristupa u razvoju metode omogućena je regulatorna fleksibilnost jer osnovu regulatorne prijave čini prijava prostora dizajna odnosno raspona odgovarajućih značajki metode. Primjenom računalnih programa omogućen je brz i učinkovit QbD razvoj metoda HPLC.

SUMMARY

The objective of this work is to clarify and demonstrate the fundamental characteristics of Quality by design concept and describe how concept can be applied to the development of analytical methods with emphasis on its application in development, optimization and validation of HPLC methods and show how the principles of the lifecycle can be used for analytical methods. The work also represents a database of HPLC methods that were developed and optimised with some elements of QbD concept.

Research of this work is theoretical and includes a detailed review of available literature about QbD concept, applying of QbD concept in the development of analytical methods and specific application of QbD concept in the development and optimization of HPLC methods. The following bibliographic databases and services were researched: Medline/PubMed, Scopus, ScienceDirect and ResearchGate and databases available on the website of the FDA, EMA and ICH. Overview of general guidelines for the implementation of QbD concepts in pharmaceutical development and explanation how they can be applied in the development, optimization and validation of analytical methods with emphasis on the application for HPLC methods will serve as a practical form for planning of development and validation program for analytical methods. Database of HPLC methods that were developed and optimized with elements of QbD concept can serve as a model for the development and optimization of HPLC methods. Application of QbD concept in the development of analytical methods ensures development of reliable, robust and rugged methods that enable reliable testing and confirmation of the quality of drug products throughout their entire lifecycle. Using of QbD approach in development of analytical methods enables the regulatory flexibility since the basis for regulatory application is design space with acceptable range of relevant parameters. Using of softwares for development of HPLC methods allows fast and efficient QbD development of HPLC methods.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1.1. KAKVOĆA UTEMELJENA KROZ DIZAJN 1

1.1.1. Povijest QbD koncepta 1

1.1.2. ICH smjernice za primjenu QbD koncepta 2

1.1.3. Farmaceutski razvoj primjenom QbD koncepta 6

1.1.4. Regulatorne agencije i QbD 11

1.1.5. Prednosti primjene QbD koncepta u farmaceutskom razvoju 13

1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI 14

1.2.1 Kromatografske značajke 16

1.2.2 Pristup razvoju metoda HPLC 18

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 20

3. MATERIJAL I METODE 21

4. RASPRAVA 22

4.1. PRIMJENA QBD KONCEPTA U RAZVOJU ANALITIČKIH METODA 22

4.2. ANALITIČKA KAKVOĆA UTEMELJENA KROZ DIZAJN 23

4.3. AQBD I REGULATORNE AGENCIJE 27

4.4. RAZVOJ METODA PRIMJENOM AQBD KONCEPTA 28

4.4.1. Definiranje namjene i cilja metode 29

4.4.2. Procjena rizika i definiranje kritičnih svojstva kakvoće metode i kritičnih značajki metode 34

4.4.3. Razvoj metode 37

4.4.4. Procjena izdržljivosti i odabir radnih uvjeta metode 46

4.4.5. Validacija metode 48

4.4.6. Strategija kontrole analitičke metode 50

4.4.7. Kontinuirano praćenje i poboljšanje metode 51

4.5. UPRAVLJANJE ŽIVOTNIM CIKLUSOM ANALITIČKIH METODA 51

4.6. UPRAVLJANJE ZNANJEM 55

4.7. PRIMJENA ELEMENATA QBD KONCEPTA U RAZVOJU I OPTIMIRANJU METODA HPLC 57

5. ZAKLJUČAK 74

6. LITERATURA 76

7. ŽIVOTOPIS 87

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Kakvoća utemeljena kroz dizajn

Koncept kakvoće utemeljene kroz dizajn (1) (engl. *Quality by design*, QbD) podrazumijeva sustavni pristup razvoju koji započinje s unaprijed definiranim ciljevima i stavlja naglasak na razumijevanje procesa i proizvoda te kontrolu procesa, a temelji se na znanstvenim dokazima i upravljanju rizicima u kakvoći (2). Kakvoća predstavlja prikladnost djelatne tvari ili gotovog proizvoda za odgovarajuću namjenu. Pojam uključuje obilježja kao što su identitet, jačina i čistoća (iz ICH Q6A, 3). ICH Q9 smjernica definira kakvoću kao stupanj do kojeg skup svojstvenih značajki proizvoda, sustava ili procesa udovoljava zahtjevima (4).

Gotovi proizvod (lijek) visoke kakvoće je proizvod koji nije kontaminiran i kontinuirano osigurava terapijsku korist za pacijenta kako je navedeno u uputi o lijeku (5).

1.1.1. Povijest QbD koncepta

Kakvoća utemeljena kroz dizajn kao koncept se prvi puta navodi u literaturi Josepha M. Jurana, američkog znanstvenika i eksperta za kakvoću te autora brojnih publikacija o kakvoći (6). Planiranje kakvoće jedan je od tri osnovna procesa Juranove Trilogije, uz kontrolu i unapređenje kakvoće. Juran smatra da su svi nedostaci u kakvoći posljedica loše planiranog sustava kakvoće (7). QbD koncept Juran prvi puta spominje u svojoj publikaciji *Juran o kakvoći utemeljenoj kroz dizajn* iz travnja 1985. godine (8). Knjiga prikazuje razloge i metode za planiranje kakvoće u proizvodnom postupku. Juran nije koristio pojmove lijek ili medicinski proizvod u svojoj knjizi no sva načela iz njegove knjige su preuzeta i nalaze se u ICH smjernici Q8 (R2), *Farmaceutski razvoj* (2).

Najvažniji vid koncepta za farmaceutsku industriju i industriju medicinskih proizvoda je da se problemi u kakvoći mogu spriječiti boljim razumijevanjem proizvodnog postupka i definiranjem prostora dizajna, identificiranjem kritičnih svojstava kakvoće i definiranjem

odgovarajuće strategije kontrole (6). QbD koncept je nasljednik koncepta *kakvoća nakon kontrole kakvoće* (engl. *Quality by testing*, QbT) koji su kompanije primjenjivale sve do devedesetih godina prošlog stoljeća. Premda se QbD koncept prvotno koristio za unapređenje kakvoće proizvoda i procesa u industriji, osobito automobilskoj, prednosti koncepta prepoznala je i Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) koja je pokrenula njegovu primjenu u farmaceutskoj industriji (9).

1.1.2. ICH smjernice za primjenu QbD koncepta

Godine 2003. u Brusselsu, *Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za lijekove* (engl. *International Conference on Harmonisation*, ICH) predstavila je novu viziju kakvoće u farmaceutskom sustavu a to je razviti usklađen farmaceutski sustav kakvoće primjenjiv tijekom životnog ciklusa proizvoda s naglaskom na integrirani pristup upravljanju rizicima u kakvoći i temeljen na znanstvenim saznanjima (10). Svrha ove vizije je osiguravanje kakvoće gotovog proizvoda (lijeka) i pouzdane opskrbe pacijenata lijekovima. Od tada, ICH je razvio nekoliko smjernica koje služe kao regulatorni alati i omogućuju ostvarivanje te vizije, kao što su *ICH Q8 (R2), Smjernica o farmaceutskom razvoju*, *ICH Q9, Smjernica o upravljanju rizicima u kakvoći*, *ICH Q10, Smjernica o farmaceutskom sustavu kakvoće*, te *ICH Q11, Smjernica za razvoj i proizvodnju djelatnih tvari (kemijskih tvari i biotehnoloških/bioloških tvari*) (2, 4, 11, 12). Navedene smjernice zajednički predlažu kako farmaceutska industrija QbD koncept može primijeniti u svom poslovanju.

Primjena navedenih smjernica predstavlja novu paradigmu kakvoće koja omogućuje znanstveni pristup i procjenu rizika kakvoće u razvoju lijekova, predaji registracijskih dosjea, pregledu, inspekciji i upravljanju promjenama nakon odobrenja regulatornih agencija, potiče proizvođače na kontinuirano poboljšanje i tehničke inovacije kroz životni ciklus lijeka i omogućuje djelotvoran i dosljedan nadzor regulatornih tijela u sve tri regije (Europa, SAD i Japan).

Smjernica *ICH Q8(R2)* predlaže sadržaj dokumenta registracijskog dosjea u kojem se opisuje farmaceutski razvoj lijeka (2). Farmaceutski razvoj omogućuje prikazivanje znanja stečenog primjenom znanstvenog pristupa i upravljanjem rizicima u kakvoći u razvoju proizvoda i proizvodnog procesa. Smjernica ukazuje na područja gdje prikaz boljeg razumijevanja farmaceutskih i proizvodnih vještina može biti osnova za fleksibilnije regulatorne pristupe. Stupanj regulatorne fleksibilnosti zasniva se na razini prikazanih relevantnih znanstvenih spoznaja. Svrha farmaceutskog razvoja je osmisliti kvalitetan proizvod i proizvodni postupak kojim će se dosljedno proizvoditi lijek odgovarajuće kakvoće. Informacije i znanje stečeni tijekom farmaceutskog razvoja i iskustvo stečeno iz proizvodnih postupaka pružaju znanstveno razumijevanje koje podržava kreiranje prostora dizajna, specifikaciju i kontrolu proizvodnje. Smjernica naglašava da se kakvoća ne može ispitati u proizvodu tj. da kakvoća mora biti ugrađena u proizvod dizajnom. Dodatak sadržan u *ICH Q8 (R2)* opisuje načela QbD koncepta. Koncept je definiran kao sustavni pristup razvoju koji uključuje primjenu prethodno stečenog znanja, rezultate studija dobivenih eksperimentalnim dizajnom, primjenu sustava upravljanja rizicima u kakvoći i sustava za upravljanje znanjem kroz cijeli životni ciklus lijeka (2).

Smjernica *ICH Q9* prikazuje upravljanje rizicima u kakvoći. Upravljanje rizicima u kakvoći je sustavni proces procjene, kontrole, komunikacije i pregleda rizika za kakvoću gotovog lijeka tijekom cijelog životnog ciklusa lijeka (4). Procjena rizika je sustavni proces organiziranja informacija koji podržava odluku o riziku tijekom procesa upravljanja rizicima. Sastoji se od identifikacije opasnosti te analize i procjene rizika povezanih s izlaganjem tim opasnostima.

Ova smjernica opisuje načela i primjere alata za upravljanje rizicima u kakvoći koji se mogu primijeniti na različite aspekte farmaceutske kakvoće. Ti aspekti uključuju razvoj, proizvodnju, distribuciju, inspekciju, te procese podnošenja dokumentacije/pregleda dokumentacije tijekom životnog ciklusa djelatnih tvari, gotovih proizvoda, bioloških i

biotehnoloških proizvoda. Dva su primarna načela upravljanja rizicima u kakvoći: (1) Procjenu rizika u kakvoći treba temeljiti na znanstvenim spoznajama i obavezno povezati sa zaštitom pacijenata, (2) Razina uloženog rada, formalnosti i dokumentiranja procesa upravljanja rizikom u kakvoći treba biti proporcionalna razini rizika.

Smjernica *ICH Q10* opisuje model učinkovitog sustava upravljanja kakvoćom u farmaceutskoj industriji nazivajući ga farmaceutski sustav kakvoće (11). *ICH Q10* je model farmaceutskog sustava kakvoće koji se može primijeniti u različitim fazama životnog ciklusa proizvoda, a temelji se na konceptima kakvoće *Međunarodne organizacije za standarde* (engl. *International Organization for Standardization*, ISO), uključuje primjenjive propise dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) i nadopunjuje smjernice *ICH Q8 (R2)* i *ICH Q9*. *ICH Q10* predstavlja potporu industriji i regulatornim tijelima za uspostavu učinkovitog sustava farmaceutske kavoće kojim bi se poboljšala kakvoća i dostupnost lijekova diljem svijeta što je od interesa za javno zdravstvo. Smjernica definira pojmove strategija kontrole i upravljanje znanjem, bitne korake u QbD razvoju i životnom ciklusu lijekova. Strategija kontrole je planirani set kontrola postavljen na temelju aktualnog razumijevanja proizvoda i procesa koji osigurava učinkovitost procesa i kakvoću proizvoda. Kontrole mogu uključiti značajke materijala koji ulaze u sastav djelatnih tvari i gotovih proizvoda, postrojenja i radnih uvjeta, opreme, procesne kontrole, specifikacije gotovog proizvoda i pripadajuće metode, te učestalost praćenja i kontrole. Upravljanje znanjem je sustavni pristup stjecanja, analize, pohranjivanja i širenja informacija vezanih za proizvode, proizvodne procese i komponente. Implementacija ove smjernice kroz životni ciklus proizvoda trebala bi olakšati inovativnost i kontinuirano poboljšanje, te ojačati vezu između farmaceutskog razvoja i proizvodnih aktivnosti (11).

Smjernica *ICH Q11* opisuje pristupe razvoju i razumijevanju procesa proizvodnje djelatnih tvari, uključujući korake namijenjene smanjenju onečišćenja (12). Osim toga, *ICH Q11* pruža

dodatna pojašnjenja o načelima i konceptima koji su opisani u *ICH Q8 (R2)*, *ICH Q9* i *ICH Q10*, a koji se odnose na razvoj i proizvodnju djelatnih tvari. Premda je glavni naglasak načela opisanih u ICH smjernicama Q8-Q11 bio na njihovoj primjeni u razvojnoj fazi farmaceutskog proizvoda, pokazala se potreba za primjenom načela QbD koncepta u komercijalnoj proizvodnji, kao fazi životnog ciklusa lijeka (13). Smjernica *ICH Q12*, *Upravljanje životnim ciklusom*, nova je smjernica u nastajanju koja bi trebala prikazati očekivanja o upravljanju promjenama u kemiji, proizvodnji i kontroli nakon dobivanja odobrenja za stavljanje gotovog lijeka u promet, te omogućiti regulatornim agencijama bolje razumijevanje farmaceutskog sustava kakvoće za upravljanje promjenama nakon dobivanja odobrenja.

Smjernica bi trebala potaknuti proizvođače da usvoje potencijalne pristupe kontinuiranog unapređenja i inovacija, kao što su poboljšanje kontrole proizvoda i analitičkih postupaka i korištenje protokola za upravljanje promjenama (engl. *comparability protocols*).

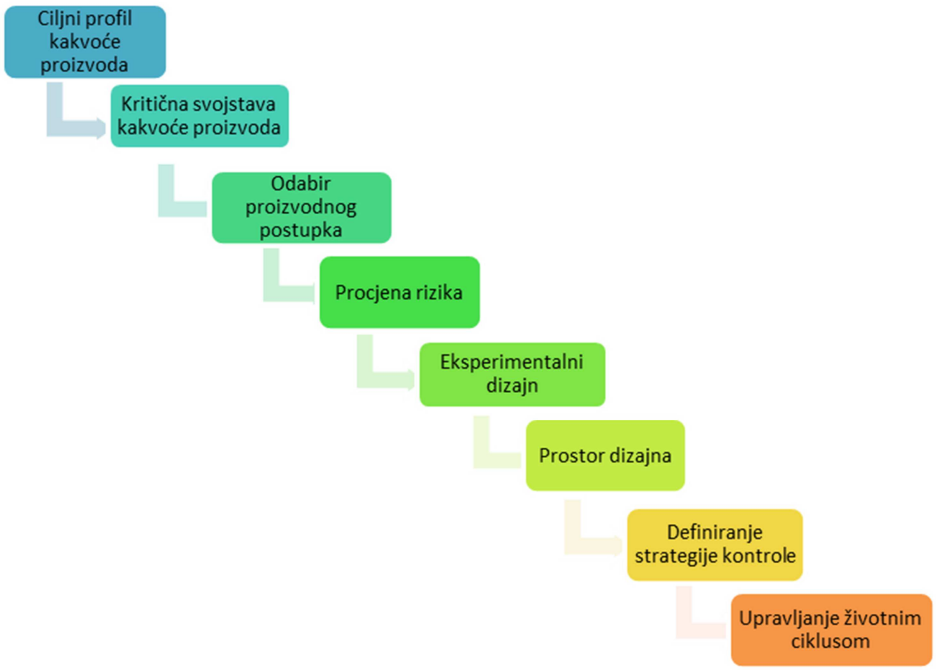
Smjernica će također podržati primjenu inovativnih tehnologija kao što su procesna analitička tehnologija (engl. *Process Analytical Technology*, PAT) i tehnologija kontinuirane proizvodnje. Procesna analitička tehnologija je sustav za projektiranje, analizu i kontrolu proizvodnje kroz pravovremeno mjerenje (tijekom proizvodnog postupka) kritičnih svojstava kakvoće sirovina i procesnih materijala i izvedbenih značajki procesa s ciljem osiguravanja kakvoće gotovog proizvoda (2).

1.1.3. Farmaceutski razvoj primjenom QbD koncepta

Pristup razvoju proizvoda ovisi o proizvodu i o proizvođaču, a može biti empirijski, sustavni ili kombinacija ova dva pristupa (2). Oba pristupa imaju zajednički cilj, a to je razvoj proizvoda koji zadovoljava potrebe pacijenata i koji ima odgovorajuće izvedbene značajke.

Primjenom QbD koncepta se značajno skraćuje vrijeme razvoja i smanjuju potrebni resursi, može se ubrzati postizanje željene kakvoće proizvoda i pomoći regulatornim tijelima bolje razumijevanje strategije farmaceutske tvrtke. Bolje razumijevanje proizvoda i njegovog proizvodnog procesa stvara osnove za fleksibilniji regulatorni pristup. Stupanj regulatorne fleksibilnosti temelji se na razini relevantnih znanstvenih spoznaja koje su prikazane u regulatornoj prijavi. Znanje i informacije koji su dobiveni tijekom razvoja čine osnovu regulatornih prijava temeljenih na znanju i procjeni rizika, a ne količina priloženih podataka. QbD konceptom identificiraju se svojstva koja su kritična za kakvoću proizvoda iz perspektive pacijenta, iz njih se definiraju svojstva koje proizvod mora posjedovati, te se postavlja osnova za kritične procesne značajke koje se mogu mijenjati kako bi se dosljedno proizvodio lijek željenih svojstava (5).

Farmaceutski razvoj primjenom QbD koncepta započinje razumijevanjem i definiranjem **ciljnog profila kakvoće proizvoda** (engl. *Quality Target Product Profile*, QTPP), (Slika 1.). Ciljni profil kakvoće proizvoda je skup značajki koje treba postići da bi se osigurala željena kakvoća, sigurnost i učinkovitost lijeka, uzimajući u obzir način primjene lijeka, farmaceutski oblik lijeka, bioraspoloživost, jačinu, stabilnost i pakiranje. Nakon što je ciljni profil kakvoće proizvoda definiran, potrebno je definirati **kritična svojstva kakvoće** proizvoda (engl. *Critical Quality Attributes*, CQAs).



Slika 1. Prikaz farmaceutskog razvoja primjenom QbD koncepta.

Kritično svojstvo kakvoće je fizičko, kemijsko, biološko i mikrobiološko svojstvo ili značajka koje treba biti unutar odgovarajuće granice, raspona ili distribucije kako bi se osigurala željena kakvoća proizvoda. Identificiranje potencijalnih kritičnih svojstava kakvoće je potrebno kako bi se značajke proizvoda koje imaju utjecaj na kakvoću proizvoda mogle istražiti i kontrolirati. Potencijalna kritična svojstva kakvoće definirana iz ciljnog profila kakvoće proizvoda i/ili na temelju prethodnog iskustva koriste se u usmjeravanju razvoja proizvoda i proizvodnog postupka. Popis potencijalnih kritičnih svojstava kakvoće može se mijenjati nakon izbora formulacije i proizvodnog postupka, te kasnije stjecanjem znanja o proizvodu i razumijevanjem postupka. Upravljanje rizicima u kakvoći može poslužiti za postavljanje liste prioriteta potencijalnih kritičnih svojstava kakvoće. Nakon što su definirana kritična svojstva kakvoće, 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 kakvoće te ih stoga treba pratiti i nadzirati kako bi se osiguralo da proces daje proizvod željene kakvoće.

Sljedeći element u razvoju prema QbD konceptu je **procjena rizika**, odnosno povezivanje svojstava polaznih materijala i procesnih značajki s kritičnim svojstvima kakvoće gotovog lijeka. Procjena rizika je dragocjen, znanstveno utemeljen, sustavni postupak koji se koristi za upravljanje rizicima u kakvoći, a pomaže u identificiranju svojstava materijala i procesnih značajki koji potencijalno utječu na kritična svojstva kakvoće 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 kakvoću 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 **formalni eksperimentalni dizajn** (engl. *Formal Experimental Design*) 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 kakvoće 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 kakvoću 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 kakvoće. 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.** Tvrtke imaju mogućnost primjenjivati inovativne pristupe za poboljšanje kakvoće proizvoda tijekom životnog ciklusa proizvoda u skladu sa smjernicom *ICH Q10*. 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. U Tablici 1 nalazi se usporedba empirijskog (tradicionalnog) i sustavnog (QbD) pristupa razvoju lijekova.

Tablica 1. Usporedba minimalnog, empirijskog (tradicionalnog) pristupa i sustavnog (QbD) pristupa razvoju lijekova.

Vidovi	**Tradicionalni pristup**	**QbD pristup**
Ukupni farmaceutski razvoj	• empirijski pristup • provodi se promjenom jedne varijable u vremenu	• sustavni pristup • razumijevanje utjecaja svojstava materijala i procesnih značajki na kritična

Vidovi	Tradicionalni pristup	QbD pristup
		svojstva proizvoda • multivarijatni pristup koji dovodi do razumijevanja proizvoda i procesa • prostor dizajna • procesna analitička tehnologija
Proizvodni postupak	• ustaljen • validacija proizvodne veličine serije • fokusiran na optimiranje i obnovljivost	• prilagodljiv unutar prostora dizajna • pristup validaciji kao dijelu životnog ciklusa i kontinuirana verifikacija procesa • usmjeren na strategiju kontrole i izdržljivost
Kontrola proizvodnog postupka	• testiranja unutar procesa • nepovezana s procesom	• alati procesne analitičke tehnologije i odgovarajuća povratna kontrola • praćenje procesnih aktivnosti s ciljem stalnog poboljšanja
Specifikacije proizvoda	• primarni način kontrole • temeljene na dostupnim podacima u vrijeme registracije lijeka	• dio cjelokupne strategije kontrole kakvoće • temeljene na željenim svojstvima proizvoda uz relevantne podatke koji ih podržavaju
Strategija kontrole	• kakvoća gotovog proizvoda kontrolirana intermedijerima (materijali nastalima u procesu) i ispitivanjem gotovog proizvoda	• osiguranje kakvoće proizvoda strategijom kontrole koja se temelji na procjeni rizika • osiguranje kakvoće proizvoda temeljem procesnih rezultata i provjerom kakvoće proizvoda u realnom vremenu te smanjenom završnom kontrolom proizvoda
Upravljanje	• reaktivno (tj. rješavanje	• preventivno

Vidovi	Tradicionalni pristup	QbD pristup
životnim ciklusom	problema i korektivne radnje)	• kontinuirano poboljšanje

1.1.4. Regulatorne agencije i QbD

Inicijativa za primjenom QbD koncepta u farmaceutskoj industriji započela je s *Farmaceutskom inicijativom za dobrom proizvođačkom praksom za 21. stoljeće - pristup temeljen na procjeni rizika* (*Pharmaceutical cGMP Initiative for the 21st Century – a Risk Based Approach*) (9) od strane Američke agencije za hranu i lijekove. FDA naglašava da je fokus QbD koncepta u tome da kakvoća mora biti ugrađena u proizvod temeljitim razumijevanjem proizvoda i proizvodnog postupka kojim je razvijen i proizveden, zajedno sa znanjem o rizicima u proizvodnom postupku i načinom kojim se oni mogu smanjiti. Još 2005. godine FDA je pokrenula pilot program kojim se omogućilo proizvođačima originalnih lijekova da u svojim registracijskim dosjeima prilažu podatke o kakvoći lijeka dobivene primjenom QbD koncepta. Godine 2006. odobren je prvi lijek za koji je u registracijskom dosjeu prikazana primjena QbD koncepta (Januvia®, Merck).

FDA je implementirala QbD koncept u svoje procese: (1) primjenom sustava kojim se rizici farmaceutske kakvoće procjenjuju na temelju razumijevanja proizvoda i procesa, (2) implementacijom pilot projekta koji omogućuje predavanje informacija o kakvoći lijeka dobivenih primjenom QbD, znanjem o lijeku i razumijevanjem procesa, (3) primjenom procesa pregleda dokumentacije o lijeku temeljenom na pitanjima koji daje smjernice industriji koje odgovore je potrebno dati u registracijskim dosjeima u kojima je implementiran QbD koncept, (4) aktivno sudjelujući u razvijanju inspekcijskih postupaka kojim se nadziru procesi temeljeni na QbD konceptu, (5) implementacijom QbD koncepta u prijavama za biološke lijekove, (6) Ured za generičke lijekove je objavio smjernice u kojima daje primjere kako se QbD koncept može primijeniti u razvoju čvrstih oralnih oblika s trenutnim

oslobađanjem i čvrstih oralnih oblika s modificiranim oslobađanjem. Od siječnja 2013. godine FDA očekuje od proizvođača generičkih lijekova da primjene QbD koncept u razvoju lijekova i podatke prikažu u poglavlju 3.2.P.2. Farmaceutski razvoj u Modulu 3 (Kakvoća) registracijskog dosjea.

Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) daje potporu prijavama koje uključuju primjenu QbD koncepta. Agencija koncept definira kao pristup koji osigurava kakvoću lijekova primjenjujući statističku, analitičku metodologiju, te metodologiju procjene rizika kakvoće u dizajniranju, razvoju i proizvodnji lijekova. Jedan od ciljeva QbD koncepta je omogućiti da svi uzroci koji mogu utjecati na proces budu identificirani, objašnjeni i da se njima upravlja na odgovarajući način. Time je omogućeno da gotov lijek zadovoljava definirane značajke od samog početka. Koncept se temelji na primjeni multivarijatne analize, često u kombinaciji s modernim procesno-analitičkim kemijskim metodama i alatima za upravljanje znanjem koji omogućuju identifikaciju i razumijevanje kritičnih svojstava materijala i kritičnih značajki proizvodnog postupka. Bolje razumijevanje proizvoda i procesa omogućuje ugradnju kakvoće u proizvod i daje osnovu za kontinuirano poboljšanje proizvoda i procesa. EMA je osnovala tim za Procesnu analitičku tehnologiju u studenom 2013. godine koji podupire primjenu procesne analitičke tehnologije i QbD aktivnosti u Europskoj uniji. Tim za procesnu analitičku tehnologiju pregledava dosege primjene QbD koncepta i osigurava da regulatorne agencije u Europi budu spremne za prijave lijekova čiji dosjei uključuju QbD (14).

U ožujku 2011. godine, FDA i EMA pokrenule su pilot program zajedničke procjene dijelova registracijskih dosjea u kojim se primjenjuje QbD koncept. Ciljevi projekta su širenje znanja, ujednačena implementacija internacionalnih smjernica i dostupnost lijekova jednake kakvoće u Europskoj uniji i SAD. Sudjelovanje u pilot programu je dobrovoljno. Obje Agencije pregledavaju dijelove registracijskih dosjea relevantne za primjenu QbD koncepta kao što su

razvoj, prostor dizajna i osiguranje kakvoće proizvoda temeljem procesnih rezultata i provjerom kakvoće proizvoda u realnom vremenu (engl. *Real Time Release Testing*, RLRT). Svaka agencija zasebno pregledava navedene dijelove dosjea uz redovitu komunikaciju i konzultacije tijekom pregleda. Cilj takvog pregleda je stvaranje zajedničkog popisa pitanja podnositelju zahtjeva za dobivanje odobrenja za stavljanje u promet gotovog lijeka i usklađena procjena odgovora. Trogodišnji pilot program doveo je do sporazuma o velikom broju QbD tema što je rezultiralo objavljivanjem dva dokumenta s pitanjima i odgovorima koji su od velike koristi industriji i agencijama, te potaknuo zajedničke istraživačke napore o QbD temama. Unatoč tim uspjesima, agencije su se složile da i dalje postoje područja QbD koncepta za koja je potrebno da agencije usklade stavove, što je rezultiralo odlukom o produljenju pilot programa.

1.1.5. Prednosti primjene QbD koncepta u farmaceutskom razvoju

Primjena QbD koncepta u farmaceutskom razvoju od velike je koristi, kako za farmaceutsku industriju, tako i za pacijente i regulatorne agencije. Za farmaceutsku industriju primjenom QbD koncepta u farmaceutskom razvoju: (1) osigurana je kakvoća gotovog proizvoda (lijeka) razumijevanjem, procjenom rizika kakvoće, kontrolom formulacije i proizvodnih varijabli, (2) omogućen je dosljedan, izdržljiv i učinkovit proizvodni postupak kojim se dobiva proizvod visoke kakvoće koja je osigurana tijekom cijelog životnog ciklusa lijeka, (3) omogućeno je kontinuirano poboljšanje tijekom životnog ciklusa lijeka, smanjenje broja serija koje ne zadovoljavaju potrebnu kakvoću, te je omogućena ušteda i povrat uloženog novca.

Primjena QbD koncepta u farmaceutskom razvoju za pacijente jamči dostupnost proizvoda dosljedne kakvoće, a u slučaju generičkih lijekova, dostupnost lijekova za koje je zajamčena terapijska ekvivalentnost referentnom (izvornom) lijeku.

Za regulatorne agencije primjena QbD koncepta u farmaceutskom razvoju: (1) omogućuje fleksibilniji regulatorni pristup jer QbD osigurava povjerenje u kakvoću lijekova kroz

znanstveno utemeljeni pristup upravljanja rizicima u kakvoći, (2) omogućuje znanstveno utemeljen pregled dokumentacije u registracijskim dosjeima za lijekove, (3) može smanjiti vrijeme potrebno za davanje odobrenja i omogućiti brži dolazak potrebnih lijekova na tržište te smanjiti potrebu za prijavama promjena nakon dobivenog odobrenja.

1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je tehnika odjeljivanja kojom se komponente uzorka raspodjeljuju između dvije faze, od kojih je jedan nepokretna (stacionarna faza), a druga pokretna (mobilna faza, eluent). Stacionarna faza može biti krutina, tekućina nanesena na krutinu ili gel, a može biti u koloni ili na plohi. Mobilna faza može biti tekućina, plin ili superkritični fluid. Kromatografsko odjeljivanje temelji se na adsorpciji, razdjeljenju, ionskoj izmjeni ili razlici fizikalno-kemijskih svojstava molekule poput veličine, mase i volumena, konfiguracije i drugih. Kromatografske tehnike se koriste u preparativne i analitičke svrhe. Tipovi kromatografije koji se najčešće koriste za kvalitativnu i kvantitativnu analizu su kromatografija na papiru, tankoslojna kromatografija, plinska kromatografija i tekućinska kromatografija (15).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je vrsta tekućinske kromatografije kod koje tekuća pokretna faza pod tlakom prolazi kroz kolonu napunjenu česticama nepokretne faze noseći sastavnice uzorka. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra performance liquid chromatography*, UPLC) poboljšava razlučivost te skraćuje vrijeme analize jer su kolone punjene znatno manjim česticama, a pumpe postižu znatno veće tlakove nego kod HPLC. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti nepokretne faze, a razlikujemo razdjeljenje, adsorpciju, ionsku izmjenu, odjeljivanje prema veličini čestica i stereokemijske interakcije od kojih je razdjeljenje najčešće korišteni mehanizam. Razdjelna kromatografija dijeli se na

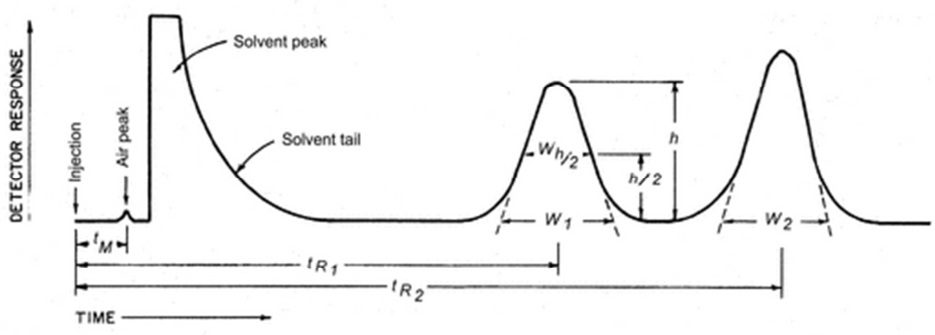
kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Kod kromatografije normalnih faza nepokretna faza je polarna, a pokretna faza je manje polarna ili nepolarna. Kod kromatografije obrnutih faza nepokretna faza je nepolarna dok je pokretna faza polarna. Najčešće korištena tehnika za odvajanje je tekućinska kromatografija obrnutih faza. Kod kromatografije obrnutih faza stacionarna faza je najčešće površina silikagela kemijski modificirana dodatkom dugolančanih ugljikovodika, a mobilna faza je otapalo ili smjesa otapala, najčešće vode i pufera i organskih otapala acetonitrila i metanola. Sastav mobilne faze utječe na vrijeme zadržavanja sastavnica uzorka, a time i na djelotvornost odjeljivanja. Razlikujemo izokratno i gradijentno eluiranje. Izokratno eluiranje podrazumijeva konstantan sastav mobilne faze tijekom eluiranja. Međutim, njime se ne može uvijek postići željena djelotvornost, pa se češće koristi gradijentno eluiranje. Kod gradijentnog eluiranja sastav se mobilne faze mijenja kontinuirano ili skokovito čime se postiže djelotvornije odjeljivanje sastavnica, te znatno kraće vrijeme eluiranja.

Sustav za tekućinsku kromatografiju sastoji se od: spremnika mobilne faze, sustava za obradu otapala koji uklanja otopljene plinove i komore za miješanje otapala; pumpe koja osigurava protok mobilne faze; injektora za unošenje uzorka; kolone i njenog termostata; detektora (UV-Vis, elektrokemijski, detektor indeksa loma, fluorescencijski ili MS); kompjutera koji kontrolira rad sustava i koji signal detektora prevodi u rezultate kvalitativnog i/ili kvantitativnog određivanja (Slika 2.).



Slika 2. Prikaz kromatografskog sustava HPLC (16).

Kromatogram predstavlja grafički prikaz odgovora detektora (Slika 3.).



*Slika 3***.** Prikaz kromatografskog odjeljivanja dvije supstancije (15).

1.2.1 Kromatografske značajke

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 mobilne faze; protok mobilne faze; dimenzija kolone, temperatura kolone i tlak; karakteristike stacionarne faze koje uključuju tip kromatografskog nosača, veličinu čestica, poroznost i specifičnu površinu, površinske modifikacije stacionarne faze, stupanj kemijske modifikacije (15).

Prikaz kromatografskih značajki, njihove definicije i formule za računanje nalaze se u Tablici 2.

*Tablica 2***.** Prikaz kromatografskih značajki.

Značajka	**Definicija**	**Formula**
Vrijeme zadržavanja, $\boldsymbol{t_R}$	Vrijeme koje je proteklo od unosa uzorka do pojave maksimalne visine pika eluiranog uzorka	Očitava se iz kromatograma.
Relativno vrijeme zadržavanja, ***RRT***	Omjer vremena zadržavanja ispitivanih tvari	$RRT = t_{R2}/t_{R1}$
Mrtvo vrijeme, $\boldsymbol{t_M}$	Vrijeme zadržavanja mobilne faze u kromatografskom sustavu (Vrijeme prolaza mobilne faze kroz kolonu)	Očitava se iz kromatograma
Faktor kapaciteta (Faktor zadržavanja), $\boldsymbol{k'}$	Opisuje brzinu gibanja tvari u koloni i može se jednostavno mijenjati promjenom sastava mobilne faze u tekućinskoj kromatografiji	k'=količina tvari u stacionarnoj fazi/količina tvari u mobilnoj fazi, $k' = (t_R - t_M)/t_M$
Broj teorijskih tavana, ***N***	Mjera djelotvornosti kolone	$N=5.54\ (t_R/w_{h/2})^2$, uobičajeno N> 2000
Visina teorijskog tavana, ***h***	Mjera djelotvornosti kolone	$h=L/N$, L je duljina kolone
Razlučivanje, ***Rs***	Kvantitativna mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dva analita na koloni	$R_S = 2 \times (t_{R2} - t_{R1})/(W_1 + W_2)$ (*Rs*-funkcija broja teorijskih tavana, *N*, koeficijenta selektivnosti, α i faktora kapaciteta, k; preporuka: $Rs > 2$)
Kriterij odvajanja, ***S***	Razlika između vremena zadržavanja pikova kritičnog para	$S=t_B-t_E$ (t_B vrijeme zadržavanja početka drugog pika, t_E vrijeme zadržavanja kraja prvog pika)
Koeficijent selektivnosti, $\boldsymbol{\alpha}$	Pokazuje koliko će dobro kromatografska kolona odijeliti dva	$\alpha = k_2/k_1 = t_{rB} - t_M/t_{rA} - t_M$

Značajka	Definicija	Formula
	sastojka	
Simetrijski faktor, $\boldsymbol{A_S}$	Mjera simetričnosti pika (engl. *Tailing factor)*	$A_S = W_{0.05}/2f$ ($W_{0.05}$-širina pika na 5% visine, a f-udaljenost od točke koja predstavlja maksimalnu visinu pika do vodećeg ruba pika mjereno na 5% visine pika od osnovice; preporuka: $A_S \leq 2$).
Retencijski volumen ,$\boldsymbol{v_R}$	Volumen mobilne faze potreban za prolaz komponente kroz kolonu	$V_R = tR \times F$ (*F*-protok mobilne faze (mL/min)
Širina kromatografske krivulje na polovici visine, $\boldsymbol{w_{h/2}}$	Širina (w) kromatografske krivulje na polovici visine (h/2)	Očitava se iz kromatograma.
Omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje, ***p/v*** (engl. *peak-to-valley)*	Kriterij prikladnosti sustava za određivanje onečišćenja kada nije postignuto razdvajanje pikova	$p/v = H_p/H_v$ (H_p-visina kromatografske krivulje iznad bazne linije, H_v-visina najniže točke između dvije kromatografske krivulje iznad bazne linije)
Omjer signala i šuma, ***s/n***	Omjer visine pika i šuma bazne linije; važan značajka kod ispitivanja prikladnosti sustava	$s/n=2H/n$
Ponovljivost, ***RSD%***	Mjera za preciznost kromatografskog sustava	$RSD=s/\bar{x}\cdot 100$ (s-standardno odstupanje, x-aritmetička sredina)

1.2.2 Pristup razvoju metoda HPLC

Dosadašnji razvoj analitičkih metoda tekućinske kromatografije uglavnom se temeljio na tradicionalnom pristupu ispitivanja kakvoće 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 postigla najbolja rezolucija pikova (17). OFAT pristupom se mogu razviti

odgovarajuće metode, no njegovi nedostatci su nedovoljno istražena kombinacija svih značajki koji mogu utjecati na kromatografsko razdvajanje, ograničeno razumijevanje sposobnosti metode, usko područje izdržljivosti i nemogućnost upravljanja rizicima u kakvoći (18).

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

Kromatografske metode su najčešće korištene metode u analitici u svim fazama životnog ciklusa lijeka. Uobičajene analitičke metode za identifikaciju, sadržaj, ujednačenost sadržaja, profil onečišćenja, te ispitivanje sadržaja i onečišćenja tijekom stabiliteta temelje se na metodama HPLC ili UPLC. Zbog široke i česte upotrebe metoda HPLC u ovom radu će se prikazati primjena QbD koncepta u njihovom razvoju.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovne značajke koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn koje se primjenjuju u farmaceutskom razvoju i proizvodnji lijekova opisane su u smjernicama I*CH Q8 (R2), ICH Q9, ICH Q10* i *ICH Q11*. QbD koncept usmjeren je na poboljšanje izdržljivosti proizvodnih procesa sustavnim i znanstvenim pristupom razvoju i provedbom strategije kontrole temeljene na razumijevanju proizvodnog procesa. Iako navedene ICH smjernice ne spominju analitičke metode niti postoje službene smjernice koje opisuju primjenu QbD koncepta za analitičke metode, osnovne značajke koncepta mogu se primijeniti u razvoju i validaciji analitičkih metoda što su prepoznale mnoge farmaceutske tvrtke koje elemente QbD koncepta primjenjuju za poboljšanje pouzdanosti analitičkih metoda.

Cilj ovog specijalističkog rada je razjasniti i pregledno prikazati bitne značajke QbD koncepta i opisati način njegove primjene u razvoju analitičkih metoda s naglaskom na primjenu u razvoju, optimiranju i validaciji metoda HPLC. Svrha studije je bila prikazati prednost primjene QbD koncepta u usporedbi s tradicionalnim pristupima u razvoju analitičkih metoda te suvremeni pristup validaciji analitičkih metoda kroz koncept životnog ciklusa za metode. Prikazana temeljna načela analitičkog QbD koncepta i načela životnog ciklusa za metode služit će kao praktičan obrazac koji će pomoći u planiranju razvoja analitičke metode kao i njezine validacije. Također je oblikovana baza podataka o metodama HPLC u čijem su razvoju i optimiranju primijenjeni elementi QbD koncepta. Prikupljeni podatci mogu poslužiti kao model prilikom razvoja i optimiranja metoda HPLC.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanja u okviru ovog specijalističkog rada su teorijskog karaktera i uključuju detaljan pregled dostupne literature iz područja QbD koncepta, primjene QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda te specifičnu primjenu QbD koncepta u razvoju i optimiranju metoda HPLC. Prikaz osnovnih značajki QbD koncepta u farmaceutskom razvoju te stavovi i inicijative regulatornih agencija o primjeni koncepta dobiveni su pregledom ICH smjernica i podataka dostupnih na stranicama FDA i EMA-a. Pregledom općeg poglavlja Američke farmakopeje (59) obrađene su osnove kromatografskih tehnika s naglaskom na značajke metode HPLC. Na temelju pretražene literature opisani su elementi QbD koncepta koji se primjenjuju u razvoju analitičkih metoda: profil namjene analitičke metode (engl. *Analytical Target Profile*, ATP), ciljna svojstva kakvoće metode (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA), način odabira tehnike i metode, procjena rizika (engl. *Risk assessment*), eksperimentalni dizajn (engl. *Design of Experiments*, DoE), definiranje prostora dizajna (engl. *Design Space*) ili radnog područja dizajna metode (engl. *Method operable design region*, MODR), definiranje strategije kontrole (engl. *Control strategy*) i kontinuirano poboljšanje metoda (engl. *Continous improvement*), te način na koji se navedeni elementi definiraju prilikom razvoja ili optimiranja metoda HPLC. U radu je prikazana inicijativa kojom se novi pristup validaciji i model životnog ciklusa može primijeniti na analitičke metode, te usporedba tradicionalnog pristupa validaciji i pristupa validaciji kroz životni ciklus metoda. Pregledom znanstvenih publikacija stvorena je relevantna baza podataka o metodama HPLC u čijem razvoju i optimiranju su korišteni elementi QbD koncepta.

U pretraživanju su korištene dostupne bibliografske baze podataka i servisi: Medline/PubMed, Scopus, ScienceDirect i ResearchGate, te baze podataka dostupne na web stranicama FDA, EMA-e i ICH uz primjenu ključnih riječi poput: *Quality by Design, Analytical Quality by Design, Design space, Design of Experiments, HPLC.*

4. RASPRAVA

4.1. Primjena QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda

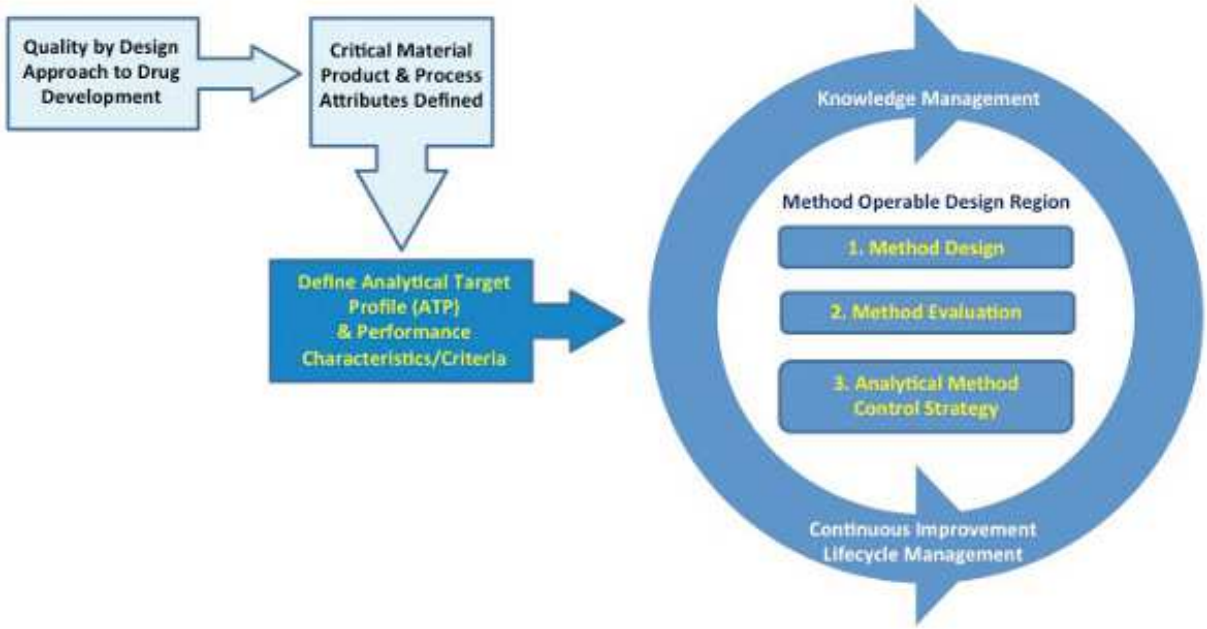
Smjernica *ICH Q8 (R2)* ne spominje izričito analitičke metode i primjenu QbD koncepta u njihovom razvoju no koncept je primjenjiv na analitičke metode ako uzmemo u obzir da je analitički postupak proces, a ishod tog procesa rezultat koji zadovoljava zadani kriterij (19). Prema tome, značajke QbD koncepta u farmaceutskom razvoju navedene u smjernici *ICH Q8 (R2)* mogu se primijeniti i u QbD razvoju analitičkih metoda. Usporedba pojmova farmaceutskog i analitičkog QbD koncepta s regulatornog stajališta nalazi se u Tablici 3. (20).

*Tablica 3***.** Odnos QbD u farmaceutskom razvoju i razvoju analitičke metode.

Farmaceutski QbD	**Analitički QbD**
Ciljni profil kakvoće proizvoda (engl. *Quality TargetProduct Profile*, QTPP)	Profil namjene analitičke metode (engl. *Analytical Target Profile*, ATP)
Kritična svojstva kakvoće	
Procjena rizika	
Prostor dizajna	Prostor dizajna / Radno područje dizajna metode
Strategija kontrole	
Upravljanje životnim ciklusom	

Godine 2010. Udruga inovativnih farmaceutskih i biotehnoloških tvrtki u Americi (engl. *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*, PhRMA), njezina Analitička tehnička grupa (engl. *Analytical Technical Group*, ATG) i Europski savez inovativnih farmaceutskih kompanija i udruženja (engl. *European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*, EFPIA) i njegov Tim za analitički prostor dizajna (engl.

Analytical Design Space, ADS) zajednički su predložili da se QbD koncept i pristup životnog ciklusa primjene u razvoju analitičkih metoda (21, Slika 4.). Oni navode dva glavna cilja primjene QbD koncepta u životnom ciklusu analitičkih metoda: poboljšanje izvedbenih značajki metoda i povećanu regulatornu fleksibilnost.



Slika 4. Komponente primjene QbD koncepta na analitičke metode prema prijedlogu Udruge inovativnih farmaceutskih i biotehnoloških tvrtki u Americi (PhRMA), njezine Analitičke tehničke grupe (ATG) i Europskog saveza inovativnih farmaceutskih kompanija i udruženja (EFPIA), njegovog Tima za analitički prostor dizajna (ADS) (21).

4.2. Analitička kakvoća utemeljena kroz dizajn

QbD koncept primijenjen u životnom ciklusu analitičkih metoda naziva se analitička kakvoća utemeljena kroz dizajn (engl. *Analytical Quality by Design*, AQbD) (20). AQbD omogućuje razvoj izdržljivih 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 kakvoće (*ICH Q10*), analitičke metode su ključni dio strategije kontrole pa primjena AQbD koncepta u proizvodnim postupcima osigurava da će unaprijed definirani zahtjevi za učinkovitost i kakvoću proizvoda biti zadovoljeni. Uloga analitičkih metoda u razvoju lijekova je važna kako bi se razumjele međusobne interakcije komponenata lijeka, za mjerenje kritičnih svojstava kakvoće tijekom pokusa, proizvodnog procesa i kontrole te za kontinuiranu provjeru valjanosti kako bi se pratili trendovi u kakvoći proizvoda. S obzirom da farmaceutski razvoj i proizvodnja ovise o izdržljivim 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 kakvoće u metodu tijekom njenog razvoja, za razliku od ispitivanja kakvoće metode nakon razvoja. U Tablici 4. prikazana je usporedba tradicionalnog pristupa i QbD pristupa u razvoju analitičkih metoda.

Tablica 4. Usporedba tradicionalnog pristupa i QbD pristupa u razvoju analitičkih metoda.

Značajke	**Razvoj analitičkih metoda**	
	Tradicionalni pristup	**QbD pristup**
Pristup razvoju metoda	Ispitivanje materijala, proizvoda i procesnih značajki temelji se na standardnim smjernicama (ICH Q6). Izbor tehnika i uvjeta metode provodi se empirijskim, OFAT pristupom.	Svojstva materijala koje je potrebno ispitati određuju se procjenom rizika. Uvjeti metode se definiraju sustavnom i multivarijatnom strategijom koja je prilagođena krajnjem korisniku metode.
Specifikacije	Temeljene na podacima o dostupnim serijama gotovog lijeka.	Temeljene na izvedbenim značajkama metode koje udovoljavaju ATP-u.
Kakvoća metode	Ispitivanje kakvoće nakon razvoja.	Izdržljivost i obnovljivost metode ugrađeni su u metodu tijekom njenog razvoja.
Analitički postupak	Postupak ne podržava promjene.	Postupak je fleksibilan unutar operabilnog područja dizajna koje dozvoljava kontinuirano poboljšanje.
Značajke metode	Provjera prikladnosti sustava kao pokazatelja valjanosti metode. Provjere izvedbe metode kao posljedica povremenih neuspjeha metode i	Izdržljiva metoda s testom prikladnosti sustava postavljenim na temelju formalne procjene rizika za promjene u značajkama metode koje utječu na kriterije

Značajke	Razvoj analitičkih metoda	
	Tradicionalni pristup	**QbD pristup**
	netipičnih, sumnjivih rezultata i rezultata izvan specifikacija.	izvedbenih značajki metode.
Validacija metode	Validacijske značajke utvrđuju se jedanput prema *ICH Q2 (R1)* smjernici.	Započinje razumijevanjem krajnjeg cilja metode. Validacijom se identificiraju i provjeravaju svi čimbenici koji imaju potencijalni učinak na izvedbene značajke metode i koriste se alati za procjenu rizika kako bi se identificirale kritične i potencijalno kritične varijable za studij validacije.
Transfer metode	Provodi se jedanput primjenjujući ograničen broj analitičara i instrumenata kako bi se pokazalo da prihvatni laboratorij može koristiti metodu.	Zahtjeva postupak kontrole kojim se za varijable, na koje bi promjena mjesta izvedbe metode imala utjecaj, procjenjuju rizici i po potrebi, procjenjuje usklađenost s ATP-om.
Podnošenje dokumentacije regulatornim agencijama	Opis metode i validacijsko/verifikacijsko izvješće.	Podnošenje podataka temeljenih na razumijevanju procesa i zadovoljavanju ATP – a
Upravljanje životnim ciklusom	Uvođenje promjena ili poboljšanja u metodi je ograničeno zbog troškova	Promjene se uvode na temelju znanja sakupljenog tijekom razvoja metode, validacije i

Značajke	Razvoj analitičkih metoda	
	Tradicionalni pristup	**QbD pristup**
	prijave promjena regulatornim agencijama. Promjene u metodama se uvode kod postojanja velikih problema.	transfera metode, te na temelju podataka o izvedbi metode sakupljenih tijekom rutinske primjene metode. Promjene se uvode bez prethodne potrebe za regulatornim odobrenjem, uključujući uvođenje novih tehnologija sve dok njihove izvedbene značajke zadovoljavaju ATP.
Prednost	Jednostavan i ograničen.	Bez potrebe za revalidacijom metode te smanjenje broja rezultata izvan trenda i izvan specifikacija.

4.3. AQbD i regulatorne agencije

Smjernice koje definiraju primjenu QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda još uvijek ne postoje. S obzirom da je primjena koncepta povezana sa znanstvenim saznanjima i procjenom rizika, FDA i EMA su u siječnju 2013. godine započele zajedničko istraživanje o primjeni QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda. Cilj tog projekta jer razviti analitičke metode temeljene na QbD konceptu, definirati protokole za prijenos metoda, razviti metodologiju za validaciju prostora dizajna nakon prijenosa i definirati kriterije za pregled i procjenu analitičkih metoda temeljenih na primjeni QbD koncepta (22). Dijelovi koji su do sada usklađeni su definicija i implementacija profila namjene analitičke metode i zahtjevi koje je

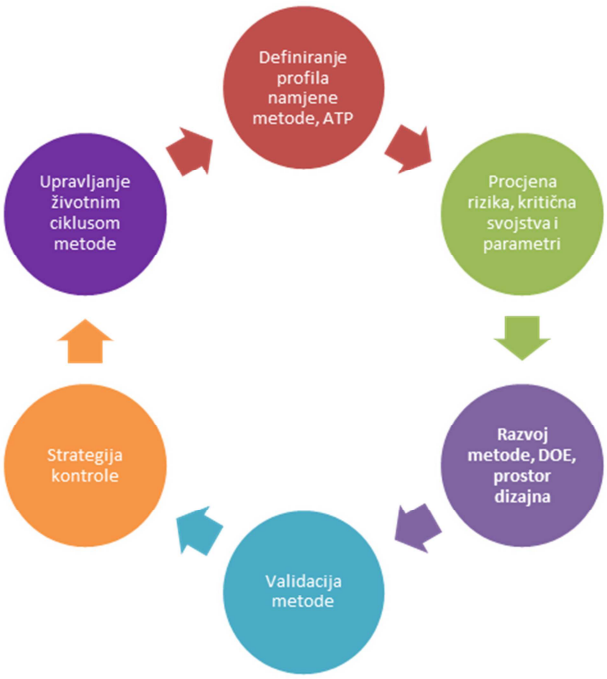
potrebno zadovoljiti kod definiranja prostora dizajna. Pitanja koja je još potrebno harmonizirati su detalji u regulatornim zahtjevima kod prijave prostora dizajna i način izvještavanja regulatornim agencijama kod promjena unutar prostora dizajna. FDA je odobrila nekoliko novih lijekova za koje je u registracijskim dosjeima prikazna primjena QbD koncepta u razvoju metoda HPLC i UV spektrometrije. Odobreni su predloženi prostori dizajna i potvrđena je regulatorna fleksibilnost za promjene u metodi koje će biti provedene unutar odobrenog prostora dizajna. Očekivanja FDA i EMA – e su da se prilikom prijave prostora dizajna metode uključe eksperimentalni protokoli koji na odgovarajući način podržavaju predložene raspone radnih uvjeta i dokaz statističke pouzdanosti kroz prostor dizajna metode. Jednako tako, potrebno je uključiti procjenu validacijskih značajki i potvrdu prikladnosti sustava kroz prostor dizajna metode (23).

4.4. Razvoj metoda primjenom AQbD koncepta

QbD koncept može se primijeniti u razvoju raznovrsnih analitičkih metoda, a općenito se sastoji od sljedećih koraka: (1) Definiranje namjene i cilja metode odnosno profila namjene analitičke metode (ATP); (2) Odabir prikladne analitičke tehnike; (3) Procjena rizika i definiranje kritičnih svojstva kakvoće metode i kritičnih značajki metode; (4) Razvoj metode (eksperimentalni dizajn, definiranje prostora dizajna, procjena izdržljivosti metode i odabir radnih uvjeta metode); (5) Validacija metode; (6) Razvoj strategije kontrole kojom se osigurava učinkovitost metode; (7) Upravljanje životnim ciklusom metode (kontinuirano praćenje izvedbenih značajki metode i stalna poboljšanja) (Slika 5.).

Prilikom razvoja metoda HPLC koraci su isti, jedino je analitička tehnika već odabrana. Razvoj metoda HPLC obično započinje izborom kolone, *pH* i organskih otapala koji ulaze u sastav mobilne faze. Glavni rizik kod korištenja tradicionalnog pristupa u razvoju metode je što on pruža uvid u izuzetno ograničeno eksperimentalno područje koje čine kombinacije

značajki, a koje predstavlja potencijalni prostor dizajna (24). To ograničenje daje malo mogućnosti da se vizualiziraju ili razumiju učinci interakcija koji su obično prisutni kod kombinacije ključnih značajki.



Slika 5. QbD tijek razvoja analitičkih metoda HPLC.

4.4.1. Definiranje namjene i cilja metode

Prilikom razvoja metode u skladu s QbD načelima na početku je potrebno jasno definirati što, kada i kako je potrebno mjeriti. Kako bi se namjena i cilj metode mogli dobro definirati potrebno je dobro razumijevanje proizvoda i proizvodnog postupka. Potrebno je uzeti u obzir i čimbenike poput sigurnosti pacijenata, djelotvornosti proizvoda kao i prethodno znanje stečeno radom sa sličnim proizvodima (lijekovima) na tržištu (25). Potrebno je obratiti pozornost i na poslovnu namjeru (npr. potreba za kratkom analizom) i krajnjeg korisnika, uključujući mogućnosti instrumenata koji će se koristiti u laboratorijima koji će metodu preuzeti, razmišljajući i o geografskom položaju i klimatskim uvjetima u tim laboratorijima, te mogućim ograničenjima u nabavci kemijskih reagensa.

Profil namjene analitičke metode. Namjena i cilj metode definiraju se profilom namjene analitičke metode (engl. *Analytical Target Profile*, ATP) koji predstavlja sažetak mjernih zahtjeva kojima se osigurava prikladnost metode za određenu namjenu (22). ATP u analitičkom QbD-u je jednak ciljnom profilu kakvoće proizvoda kod QbD razvoja lijekova. Stručna komisija za validaciju i verifikaciju Američke farmakopeje navodi da ATP definira cilj metode i zahtjeve za kakvoću rezultata, uključujući očekivanu razinu povjerenja u rezultate koji omogućuju ispravan zaključak o mjerenim svojstvima (19).

ATP se temelji na razumijevanju ciljne mjerne nesigurnosti, a to je maksimalna nesigurnost koju rezultati mogu imati da bi se zadržala prihvatljiva razina pouzdanosti u kakvoći podataka. Prilikom definiranja ATP-a potrebno je uzeti u obzir sljedeće komponente: (1) Raspon u kojem se očekuje određivanje analita danom analitičkom metodom, (2) Ukupna mjerna nesigurnost, izražena kao sustavna (točnost) i slučajna (preciznost) nesigurnost, (3) Opis analita koji se ispituje, uključujući opis uzorka ili matrice u kojoj se analit ispituje (16). ATP predstavlja skup kriterija koji definiraju što će se mjeriti, u kojoj matrici uzorka, te u kojem rasponu koncentracija uz zahtjeve koji proizlaze iz *ICH Q2 (R1)* smjernica (specifičnost, preciznost, točnost, linearnost, granica dokazivanja i određivanja) uzimajući u obzir zajednički kriterij za točnost i preciznost kako bi se definirala prihvatljivost metode u funkciji mjerne nesigurnosti rezultata (26).

Zajednički ATP za metode HPLC je izdržljiva i selektivna metoda s razumnim trajanjem analize i po prihvatljivoj cijeni (27).

ATP je moguće je definirati na dva načina: (1) Definiranje profila namjene ciljne metode čiji zahtjevi moraju biti udovoljeni tijekom cijelog životnog ciklusa metode, (2) Definiranje profila namjene analitičke metode koji nije povezan s određenom analitičkom metodom nego je definiran na način da se svaka analitička tehnika i analitička metoda, koja može ispuniti

definirane zahtjeve i dati rezultate koje su u skladu sa zahtjevima utvrđenim ATP-om, smatra prihvatljivom.

Opći pristup definiciji ATP-a daje fleksibilnost u izboru metoda kojima se ispituje proizvod i omogućuje izbjegavanje prijave skupih izmjena za regulatorno odobrene analitičke metode (21). Umjesto toga, svaka metoda koja zadovoljava ATP bila bi validirana i dokumentirana na odgovarajući način, a samo bi ATP bio registriran. Takav način definiranja ATP-a je potpuno u skladu sa smjernicom *ICH Q10*, odnosno primjenom holističkog sustava upravljanja kakvoćom budući da njegova primjena omogućuje promjene metoda i poboljšanja s potpunim razumijevanjem i znanjem o učinku na proizvod. Ovakav koncept ATP-a primijenjen je u općem poglavlju Američke farmakopeje za elementarna onečišćenja (USP <233>)(28). Pristup koji je naveden temelji se na definiranim izvedbenim značajkama metode i fleksibilnosti u odabiru odgovarajuće analitičke tehnologije sve dok odabrana tehnologija može zadovoljiti traženu točnost (istinitost i nesigurnost), osjetljivost i specifičnost. Dolje su navedeni primjeri ATP-a iz *stimuli* članka Stručne komisije za validaciju i verifikaciju američke farmakopeje (19).

Sadržaj: Metodom se mora kvantificirati analit u prisutnosti [X, Y, Z] u rasponu od A% do B% nominalne koncentracije, s točnošću i preciznošću tako da su rezultati mjerenja unutar ± C% od stvarne vrijednosti, s vjerojatnošću od najmanje 90% određene s 95% pouzdanosti.

Onečišćenja: Metodom se mora točno kvantificirati onečišćenje u lijeku, u prisutnosti ostalih komponenata uzorka, u području od granice izvješćavanja do granice specifikacije. Točnost i preciznost postupka moraju biti takvi da su rezultati mjerenja unutar ± D% od stvarne vrijednosti za onečišćenja čije su vrijednosti 0,05% do 0,15% s vjerojatnošću od 80% utvrđene s 95% pouzdanosti i unutar ± E% od stvarne vrijednosti

za onečišćenja čije su vrijednosti > 0,15%, s vjerojatnošću od 95% utvrđene s 95% pouzdanosti.

Primjena koncepta ATP-a na ovakav način još uvijek nije prihvaćena od strane američke i europske regulatorne agencije. Njihovo stajalište je da se ATP može primijeniti za definiranje izvedbenih značajki metode u analogiji s ciljnim profilom kakvoće proizvoda definiranim u *ICH Q8 (R2).* Međutim, agencije ne smatraju da su analitičke metode, koje se temelje na različitim načelima, primjerice HPLC i NIR (engl. *Near-infrared spectroscopy*, NIR), ekvivalentne isključivo na temelju zadovoljavanja ATP-a. Proizvođači lijekova ne smiju prelaziti s jedne analitičke tehnike na drugu bez odgovarajućeg podnošenja izmjene i odobravanja te izmjene od strane regulatornih agencija (23).

Izvedbene značajke metode. Izvedbene značajke metode se definiraju kako bi se zadovoljili zahtjevi profila namjene analitičke metode (20). Izvedbene značajke metode prema *ICH Q2 (R1)* navedene su u Tablici 5. (29).

Tablica 5. Izvedbene značajke metoda prema *ICH Q2 (R1).*

Izvedbene značajke metode
Sustavna varijabilnost: točnost, specifičnost, linearnost
Slučajna varijabilnost: preciznost, granica dokazivanja i određivanja
Radno područje, izdržljivost

Izvedbene značajke metode uključuju dvije komponente: sustavnu pogrešku i slučajnu pogrešku. Općenito se izvedbene značajke metode ocjenjuju na temelju obje komponente.

Od izvedbenih značajki navedenih u tablici, točnost i preciznost su važne izvedbene značajke metoda koje se koriste za određivanje tvari. Pretpostavlja se da nijedna metoda ne može biti točna i precizna bez odgovarajuće specifičnosti, linearnosti i razlučivanja pikova. Međutim, te

izvedbene značajke ne daju informacije o izdržljivosti metode. Radno područje je također važna komponenta koja se mora utvrditi na temelju prihvatljivih sustavnih i slučajnih pogrešaka. Preporučljivo je ugraditi zajednički kriterij za dvije ili više izvedbenih značajki metode u ATP. Značajke metode kao što su linearnost i specifičnost nije potrebno ugraditi u ATP budući da nisu izravno povezane s razumijevanjem podudarnosti mjerenja i stvarne vrijednosti.

Izbor analitičke tehnike. Izbor analitičke tehnike ovisi o sposobnosti tehnike da zadovolji zahtjeve ATP-a, ali i o drugim znanstvenim, praktičnim i poslovnim zahtjevima (16). Prilikom izbora analitičke tehnike potrebno je uzeti u obzir sve dijelove životnog ciklusa lijeka u kojem će metoda biti korištena, uključiti informacije o fizikalno-kemijskim karakteristikama molekule koja će se ispitivati, saznanja o tome hoće li se metoda koristiti u svrhu istraživanja i razvoja lijekova, laboratorijima za ispitivanja kakvoće ili i u kontroli proizvodnog procesa. Tehnika koja se odabire mora biti dostupna u razvojnom laboratoriju i laboratoriju koji će metodu rutinski koristiti, a osoblje koje će primjenjivati metodu mora biti stručno u radu i održavanju odabrane tehnike (26). Odabrana analitička tehnika, osim zahtjeva ATP-a mora zadovoljiti i validacijske zahtjeve propisane regulativom (20). Primjerice, zahtjev za specifičnost ne mora biti uključen u ATP, no analitička metoda treba biti i specifična. Dakle, kromatografska metoda može zadovoljiti zahtjeve definirane ATP -om i validacijske zahtjeve *ICH Q2 (R1),* dok UV spektrofotometrijska metoda može zadovoljiti potrebe ATP - a, ali ne može zadovoljiti ICH zahtjeve.

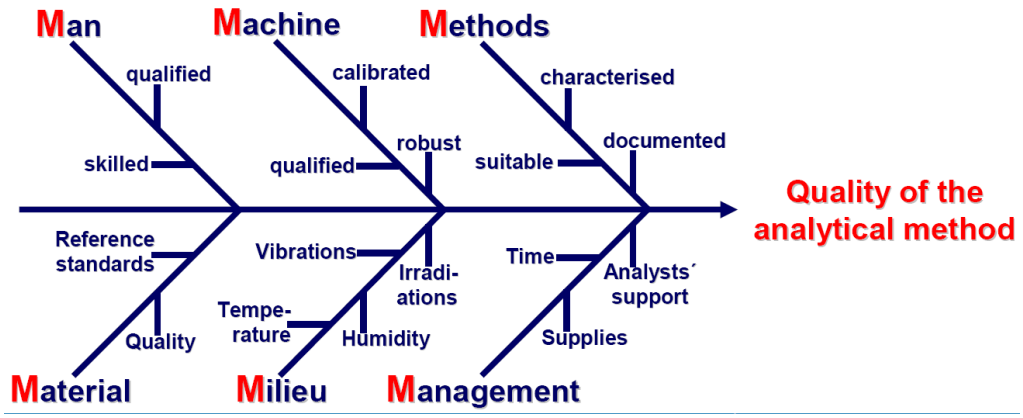
4.4.2. Procjena rizika i definiranje kritičnih svojstva kakvoće metode i kritičnih značajki metode

Ovaj korak AQbD koncepta fokusira se na razvoj metode i detaljnu procjenu rizika za značajke metode koje utječu na ATP. Procjenom rizika dobivaju se informacije o kritičnim značajkama metode koji imaju najveći učinak na udovoljavanje zahtjeva definiranih ATP - om, a mjere se pomoću kritičnih svojstava kakvoće metode. Za metode HPLC kritično svojstvo kakvoće predstavlja kakvoću razdvajanja pikova i najčešće se definira razlučivanjem kritičnog para pikova (*Rs*), ali i razlikom u retencijskom vremenu susjednih pikova i kriterijem odvajanja (*S*) (46). Za kritična svojstva kakvoće uzimaju se u obzir i različite kromatografske značajke kao što su npr. asimetrija (A_s), učinkovitost kolone (broj teorijskih tavana, *N*) i visina pika (*h*). Kao kritična svojstva kakvoće metode navode se i duljina mjerenja, preciznost metode, granica određivanja i mjerno područje. Neki autori spominju i ukupnu potrošnju mobilne faze ili pojedinih otapala koja ulaze u sastav mobilne faze kako bi bili u skladu s novim trendovima tzv. zelene kemije (31).

Kritične procesne značajke su značajke čija promjenjivost ima utjecaj na kritična svojstva kakvoće i stoga ih treba kontrolirati kako bi se osiguralo da metoda zadovoljava unaprijed definirana svojstva kakvoće. Najčešće se kao kritične procesne značajke metoda HPLC navode vrijeme gradijenta (t_G), temperatura (*T*), *pH* mobilne faze (eluent A), tercijarni sastav mobilne faze (eluent B) i stacionarna faza (kolona) budući da oni mogu imati najveći utjecaj na selektivnost metode (32). Protok, volumen injektiranja, promjena gradijenta i značajke kolone (volumen zadržavanja) također su važne procesne značajke kod gradijentne metode HPLC.

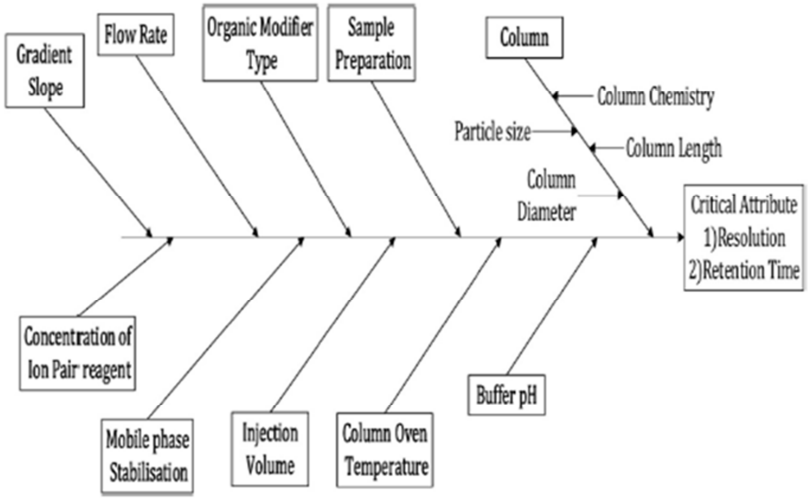
S obzirom da više kritičnih značajki može utjecati na izvedbene značajke metode, potrebna je procjena rizika kako bi se smanjio broj značajki i ispitale one značajke koji imaju najveći utjecaj. Smjernica *ICH Q9* definira strategiju procjene rizika kao sustavni proces za procjenu,

kontrolu, prijenos informacija i pregled rizika u kakvoći tijekom životnog ciklusa proizvoda. Analitička metoda može se rastaviti na glavne korake metode, od pripreme uzorka do analize podataka pomoću dijagrama toka (33). Na taj način moguće je odrediti značajke koje treba uzeti u obzir tijekom procjene rizika. Za inicijalnu identifikaciju potencijalnih značajki koje mogu imati utjecaj na izvedbene značajke metode koriste se Fishbone dijagrami (dijagram izgleda riblje kosti), Ishikawa dijagrami ili dijagrami prikaza uzroka i posljedica (34), (Slika 6.). Ishikawa dijagrami razvrstavaju rizike u različite kategorije (rizici povezani s instrumentacijom, materijalima, metodama, mjerenjima, klimatskim uvjetima i ljudskim faktorima) i prikazuju kako ti rizici utječu na ishod. Svrha ovakvog prikaza je napraviti sveobuhvatan popis značajki metode i grupirati ih u kategorije kako bi se dobio sustavan i organiziran pregled svake značajke koja utječe na kritično svojstvo kakvoće metode.



Slika 6. Općeniti Fishbone dijagram (35).

Generički Ishikawa dijagrami postoje za svaku pojedinu analitičku tehniku, primjerice za Karl Fisher metodu, metodu HPLC za određivanje sadržaja (Slika 7.), kapilarnu elektroforezu, metodu GC za određivanje ostatnih otapala i druge.



Slika 7. Primjer Ishikawa dijagrama za metode HPLC (36).

Značajke metode se mogu procjenjivati i alatima poput tzv. analize pogrešaka i posljedica (engl. *Failure Modes and Effects Analysis*, FMEA)(37). Svaka od ispitivanih značajki se kritički ocjenjuju prema vjerojatnosti, *P* (vjerojatnost da će se pojaviti na temelju dosadašnjeg iskustva, razumijevanja procesa), detekciji, *D* (sposobnost da će se otkriti neuspješnost analitičke metode) i ozbiljnosti, *S* (posljedice, kakav će učinak imati na izvedbu metode, utjecaj na pacijenta, udovoljavanje zahtjevu specifikacije itd.). Za svaki P, S i D koristi se sustav numeriranja, a faktor rizika izračunava se kao doprinos sva tri faktora, vjerojatnost (P) x ozbiljnost (S) x detekcija (D).

Nakon što je napravljena inicijalna procjena rizika, rizici se obično svrstavaju u tri kategorije pristupom poznatim kao *CNX* (engl. *Control, Noise, Experimental*): (1) Značajke koje moraju biti kontrolirane (C), značajke koje moraju biti kontrolirane ili za koje moraju biti definirane vrijednosti (npr. tip stacionarne faze i veličina čestica, promjer i duljina kolone, proizvođač kolone); (2) Značajke potencijalnog šuma (N), značajke koji se ne mogu kontrolirati ili za koje je dopušteno da nasumično variraju (npr. starost kolone); (3) Eksperimentalne značajke (X), značajke koje mogu varirati i za koje se pokusom moraju utvrditi prihvatljivi rasponi (primjerice, temperatura, protok mobilne faze, sastav mobilne faze).

Premda procjena rizika pomoću navedenih alata pomaže u izboru kritičnih značajki koje je potrebno optimirati tijekom razvoja metode, pravilna procjena svake značajke bi se ipak trebala temeljiti na znanstvenim činjenicama, prethodno stečenom znanju i iskustvu. U praksi je uobičajeno da se napravi nekoliko probnih pokusa kako bi se olakšala procjena rizika. Nakon procjene značajki metode slijedi eksperimentalni dizajn kojim se prosuđuju značajke koji imaju najveći utjecaj te se definiraju optimalni uvjeti metode. Kod definiranja inicijalnih značajki metode koji će se ispitivati eksperimentalnim dizajnom, od velike pomoći mogu biti i računalni programi koji daju izračune lipofilnosti, *logP* (SciFinder®), *logD* (Marvin®) i *pKa* vrijednosti te programi koji daju podatke o ekvivalentnim kolonama (ColumnMatch®) (32).

4.4.3. Razvoj metode

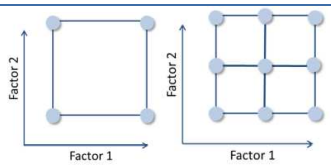
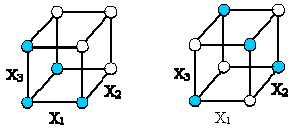
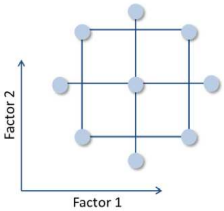
Kako bi se samom razvoju metode pristupilo u skladu sa *ICH Q8 (R2)* smjernicom primjenjuje se statistički eksperimentalni dizajn koji omogućava razumijevanje utjecaja pojedinih značajki i utjecaja njihovih interakcija na kritična svojstva kakvoće metode. Primjena eksperimentalnog dizajna dovodi do povećanog razumijevanja postupka s minimalnim brojem pokusa u usporedbi s pristupom promjene jednog faktora u vremenu.

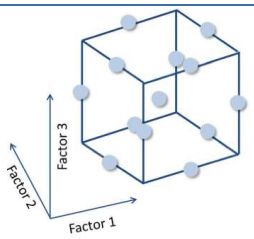
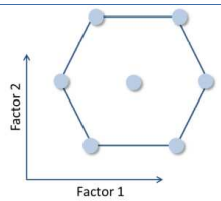
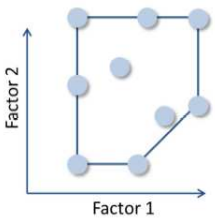
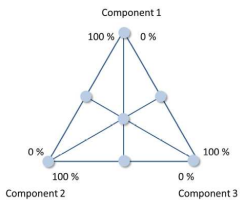
Eksperimentalni dizajn. Eksperimentalni dizajn omogućuje učinkovitu procjenu istovremenih učinaka značajki metode i njihovih interakcija na kritična svojstava kakvoće metode pomoću statističkih modela (33). Odabrani eksperimentalni dizajn mora koristiti valjane statističke karakteristike i sastojati se od što manjeg broja eksperimenata. Mogućnost širenja dizajna je također dobra karakteristika jer omogućuje širenje raspona vrijednosti za ispitivane značajke, dodavanje novih značajki ili povećanje složenosti modela stjecanjem spoznaja o metodi. Odabrani model treba omogućiti procjenu eksperimentalne pogreške i procjenu valjanosti modela.

Eksperimentalni dizajn koristi se za: (1) preliminarne studije kojima se utvrđuje odnos značajki metode i kritičnih svojstava kakvoće metode i koje omogućuju istraživanje i

utvrđivanje preliminarnih uvjeta metode, (2) optimiranje metode kojom se definiraju konačni zahtjevi za značajke metode koje pokazuju najznačajniji utjecaj na izvedbene značajke metode i potvrdu zadovoljavanja zahtjeva ATP-a, (3) optimiranje postojećih metoda, (4) ispitivanje izdržljivosti metode. Postoje dvije kategorije eksperimentalnog dizajna: probirni dizajn (engl. *Screening design*) i dizajn odgovora površine (engl. *Response surface design*). Probirni dizajni primjenjuju se za preliminarne studije kojima se ispituju prvotno određene kritične značajke metode. Kada se analizom pogrešaka i posljedica prosudi da više značajki (četiri ili više) utječe na odgovore, probirnim dizajnom je moguće odabrati one koji imaju najveći učinak na odgovore. Za probirni dizajn koriste se Plackett-Burmanov dizajn i djelomični faktorijalni dizajn na dvije razine. Dizajni odgovora površine kao što su puni faktorijalni dizajn na tri razine, centralno kompozitni dizajn, Box-Behnkenov dizajn, Doehlertov dizajn, D-optimalan dizajn, te mješoviti dizajni koriste se za predviđanje i optimiranje odgovora (38). Navedeni dizajni su usmjereni na razumijevanje procesa koji se ispituje. Oni uključuju ispitivanje velikog eksperimentalnog radnog područja, razumijevanje dobivenih odgovora i kritičnih svojstava kakvoće metode u odnosu na ispitivane značajke i omogućuju predviđanje vrijednosti kritičnih svojstava kakvoće unutar područja vrijednosti značajki koje se ispituju. Ovi dizajni se koriste kako bi se pronašla kombinacija značajki kojom se predviđa optimalni odgovor s dobrom preciznošću. Prikaz modela eksperimentalnog dizajna koji se najčešće koriste u razvoju metoda HPLC nalazi se u Tablici 6.

Tablica 6. Prikaz modela eksperimentalnog dizajna koji se koriste u životnom ciklusu metoda HPLC (38).

Eksperimentalni dizajn	**Opis**	**Dizajn**
1. **Faktorijalni dizajn** *1.1* Puni faktorijalni dizajn *1.2* Djelomični faktorijalni dizajn	Eksperimenti se provode za svaku kombinaciju značajki i sve razine značajki. Postoji L^k kombinacija za L razina i k značajki. Kod punog faktorijalnog dizajna izvodi se svaki pokus, a kod djelomičnog dizajna provodi se specifični podskup eksperimenata koji omogućuje izračun odgovarajućih koeficijenata modela.	 Puni faktorijalni dizajn  Djelomični faktorijalni dizajn
2. **Plackett-Burmanov dizajn**	Dizajn za primjenu u preliminarnim pokusima gdje je potrebno iz velikog broja čimbenika izdvojiti one koji utječu na odgovor. Plackett-Burman dizajn zahtijeva 4n eksperimenata kako bi istražilo najviše 4n - 1 parametra na dvije razine.	
3. **Centralno kompozitni dizajn**	Dizajn koji omogućuje eksperiment za veći broj razina bez izvođenja pokusa na svakoj kombinaciji razina značajki, a pokriva prostor značajki s više točaka u blizini centra nego na periferiji. Dizajn je kombinacija punog faktorijalnog dizajna 2^k (ili djelomičnog 2^{k-p}) na dvije razine s	

Eksperimentalni dizajn	Opis	Dizajn
	dizajnom zvijezde i središnje točke.	
4. **Box-Behnkenov dizajn**	Dizajn koji se može primijeniti na tri ili više razina, za tri ili više parametara. Nema faktorskih ili ekstremnih točki i manji je od središnjeg kompozitnog dizajna, a za tri faktora isti kao i Doehlertov dizajn. Ovaj dizajn se koristi za sustave s više od dva parametra i gdje je poznato da optimalna kombinacija leži u sredini raspona značajki.	
5. **Doehlertov dizajn**	Doehlertov dizajn je učinkovit za različit broj razina za različite parametre. Tako se značajke koje su važnije mogu mjeriti na više razina. Dizajn pokušava ispuniti prostor kombinacije značajki što je ujednačenije moguće.	
6. **D-optimalan dizajn**	Ovaj dizajn je posebno popularan kada prostor značajki nije ravnomjerno dostupan tj. kada je broj razina različit za pojedine parametre.	
7. **Mješoviti dizajn**	Posebna vrsta dizajna koja se koristi kada su značajke ograničene konačnim vrijednostima. Primjerice, sastav mobilne faze od 3 komponente čije vrijednosti čine ukupno 100%.	

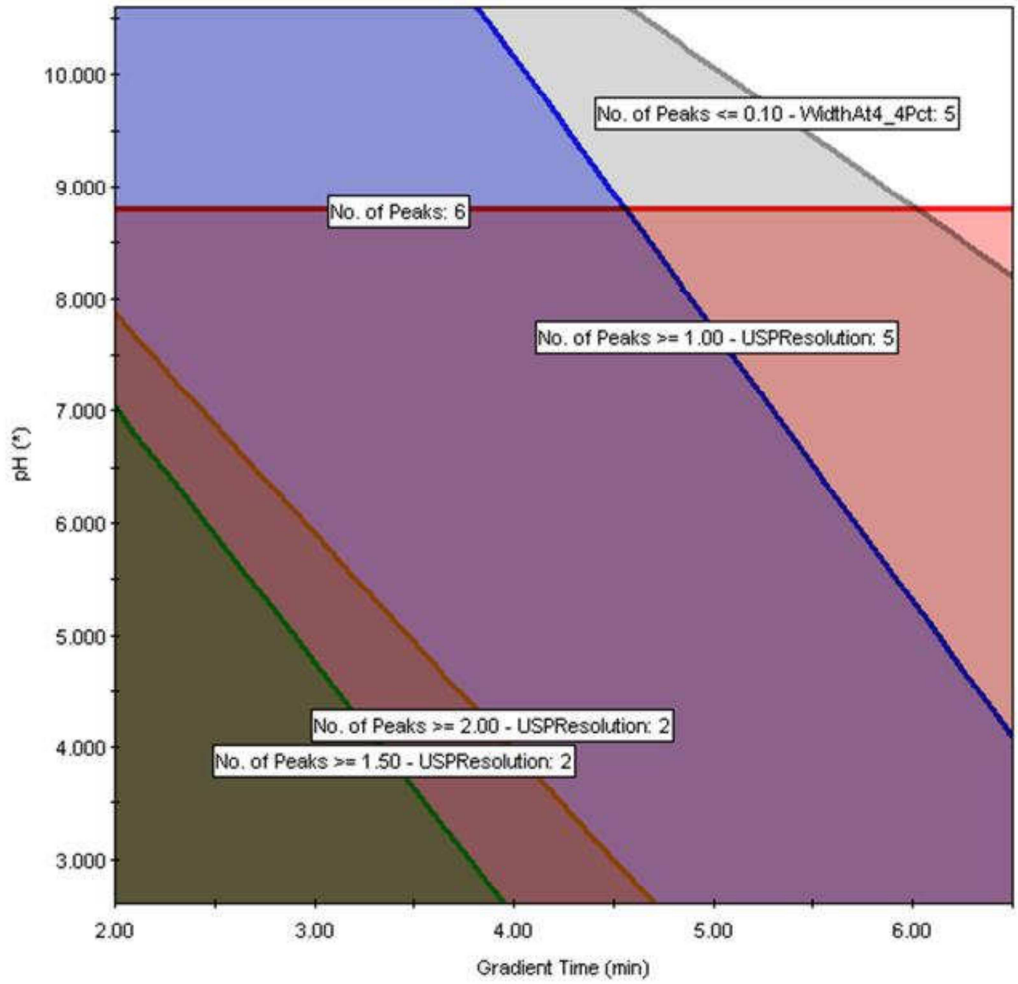
Kada se eksperimentalni dizajn provodi pomoću modela odgovora površine uobičajeno je da se rezultati ilustriraju i prikazuju pomoću plohe ili konture. Kada se nekoliko kritičnih svojstava kakvoće mjeri istovremeno, preklapanje srednjih odgovora površine se obično koristi kako bi se pronašli optimalni uvjeti kod kojih kombinacija značajki zadovoljava definirani odgovor ili kritična svojstva kakvoće. Prikazi odgovora površine predstavljaju regije gdje je prikazan prosječan odgovor kritičnog svojstva kakvoće i one ne garantiraju da će odgovori ili kritična svojstva kakvoće postići unaprijed definirane kriterije s velikom vjerojatnošću, te na taj način ne jamče kakvoću. Da bi se zadovoljili zahtjevi *ICH Q (R2)* smjernice prema kojoj prostor dizajna predstavlja kombinaciju značajki kojom je osigurana kakvoća, potrebno je primijeniti metodologije koje uzimaju u obzir mjernu nesigurnost i daju informaciju koliko često će zahtjev biti zadovoljen. Odabrani eksperimentalni dizajn mora osigurati da su kritična svojstva kakvoće metode unutar definiranih granica s prihvatljivom razinom vjerojatnosti (39). Metodologije koje to omogućuju su statistički modeli koji uključuju nesigurnost modela u procjeni značajki i procjenu vjerojatnosti da će zahtjevi kritičnih svojstava kakvoće biti zadovoljeni. U eksperimentalnom dizajnu za metode HPLC za tu svrhu se najčešće primjenjuju Monte Carlo simulacije. Monte Carlo simulacijama se dobivaju podatci i/ili poboljšava učinkovitost metode pomicanjem unutar prostora dizajna do područja koje pokazuje najveću izdržljivost za kombinacije ulaznih varijabli (36).

Postoji velik broj dobrih računalnih programa koji pomažu u definiranju statistički valjanih pokusa eksperimentalnog dizajna. Prilikom razvoja metoda HPLC najčešće se koriste *DryLab* (Molnár Institute, Berlin, Njemačka), *ACD/LC Simulator* (ACD/Labs, Toronto, Kanada), *ChromSword* (ChromSword Group, Riga, Latvija), *Osiris* (Datalys, Grenoble, Francuska) koji se temelje na kromatografskim teorijama kao što su teorija linearne snage otapala (engl. *Linear Solvent Strength theory*) i solvofobna teorija (engl. *Solvophobic theory*), te *Fusion AE* (S-Matrix, Eureka, CA, Amerika) koji se temelji na modelu višestruke linearne regresije (30).

Uporaba modelirajućih računalnih programa omogućuje da se sa malim brojem eksperimentalnih podataka ispita utjecaj velikog broja kritičnih značajki i njihovih kombinacija na kritična svojstva kakvoće metode (32). Na temelju malog broja eksperimenata navedeni računalni programi mogu predvidjeti kretanje pikova s promjenom sastava ili *pH* mobilne faze, temperature, brzine protoka, te promjenom dimenzije i veličine čestica stacionarne faze (17). Računalni programi za razvoj i optimiranje metoda HPLC su vrlo učinkoviti i štede vrijeme potrebno za rutinski razvoj metoda, vrijeme potrebno za sakupljanje saznanja i razumijevanja o metodi i vrijeme potrebno za prijenos metoda, te omogućuju razvoj fleksibilnih metoda koje ispunjavaju regulatorne zahtjeve (27). Računalni programi pokazuju visoku preciznost predviđenih vrijednosti kritičnih svojstava kakvoće u usporedbi s vrijednostima dobivenim eksperimentalnim radom (primjerice, više od 99,9% točnosti prosječnih vrijednosti retencijskih vremena u odnosu na predviđene vrijednosti za Drylab, 40).

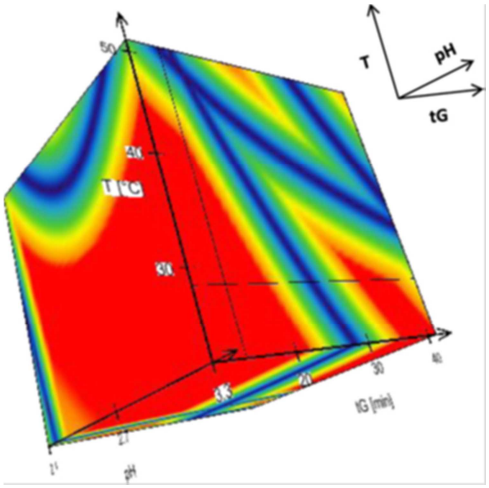
Prostor dizajna. Ključni element QbD koncepta je prostor dizajna, odnosno radno područje dizajna metode (engl. *Method Operational Design Range*, MODR), (31, 32, 41). Prostor dizajna, u analitičkom smislu, uključuje kombinacije značajki metode za koje se eksperimentalnim dizajnom pokazalo da osiguravaju pouzdane rezultate metode (42). Za metode HPLC, prostor dizajna predstavlja višedimenzionalni prostor koji stvaraju kombinacije i interakcije ispitivanih kromatografskih značajki unutar kojeg su željena kritična svojstva kakvoće zadovoljena u unaprijed definiranim granicama i s prihvatljivom razinom vjerojatnosti (33). Glavni koncept koji leži iza *ICH Q8 (R2)* definicije prostora dizajna je osiguranje kakvoće, odnosno mogućnost upravljanja rizicima u kakvoći (43). Stoga je kod definiranja prostora dizajna u razvoju metoda HPLC potrebno uzeti u obzir vjerojatnost da će kritično svojstvo kakvoće biti unutar odgovarajućih vrijednosti te pogrešku i promjenjivost dobivenih odgovora. Područje u kojem sva unaprijed definirana kritična svojstva kakvoće

imaju zadovoljavajuće vrijednosti sa željenom razinom kakvoće (vjerojatnost $\pi \geq$ 95%) odabire se kao prostor dizajna. Promjene u značajkama metode unutar prostora dizajna odnosno unutar radnog područja dizajna metode ne smatraju se promjenama u metodi (22). Zahtjevi za validacijom navedeni u *ICH Q2 (R1)* i zahtjevi za ispitivanje prikladnosti sustava moraju biti zadovoljeni unutar radnog područja dizajna metode. Radno područje dizajna metode se najčešće definira iz grafičkog prikaza utjecaja nekoliko značajki metode na jedan ili više odgovora kojima se mjeri kritično svojstvo kakvoće metode (Slika 8.).

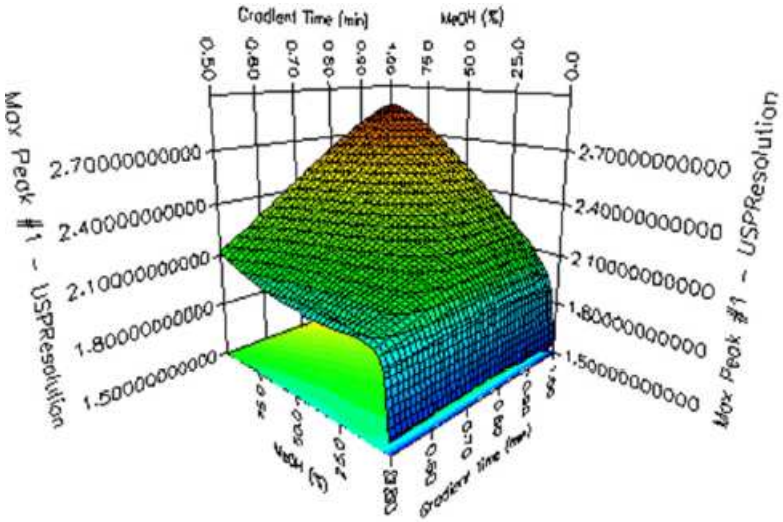


Slika 8. Prikaz radnog područja dizajna metode: bijela regija predstavlja područje kombinacije značajki *pH* i vrijeme gradijenta u kojem su zadovoljena sva kritična svojstva kakvoće metode (broj pikova, broj pikova s *Rs*≥1=5, broj pikova sa *Rs*≥2=2 i broj pikova sa *Rs*≥1.50 =2) (44).

Kromatografski modelirajući računalni programi omogućuju vizualne prikaze višedimenzionalne regije prostora dizajna i prikaze odgovora površine (Slike 9. i 10.).



Slika 9. Prikaz prostora dizajna pomoću *Drylab* računalnog programa. 3D prostor rezolucije koji prikazuje utjecaj vremena gradijenta (t_G), temperature (T) i *pH* mobilne faze na kritičnu rezoluciju. (Regije koje prikazuju rezoluciju iznad bazne linije ($Rs_{, krit} > 1.5$) obojene su crveno) (32).

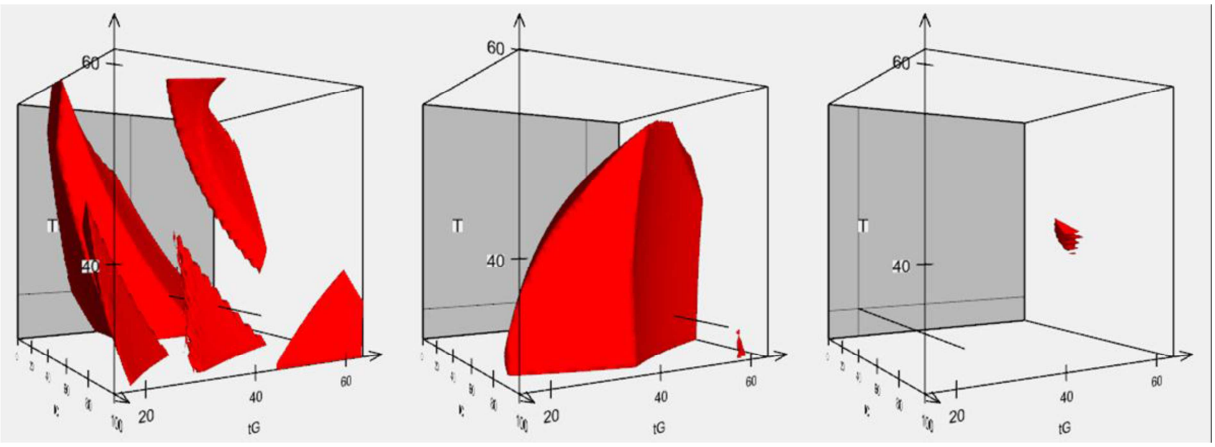


Slika 10. Prikaz odgovora površine za vrijednosti razlučivanja najvećeg pika i njemu najbližeg pika ovisno o gradijentu i udjelu metanola u mobilnoj fazi (45).

Nakon definiranja prostora dizajna potrebno je provesti provjeru valjanosti korištenog statističkog modela. Vrijednosti dobivene modelom potvrđuju se stvarnim pokusom te se provodi regresijska usporedba dobivenih i predviđenih rezultata.

4.4.4. Procjena izdržljivosti i odabir radnih uvjeta metode

Procjena izdržljivosti metode unutar prostora dizajna. Nakon razvoja metode i definicije radnog područja dizajna metode potrebno je provesti ispitavanje izdržljivosti metode kako bi se ispitalo da li metoda uz određene promjene u značajkama daje odgovarajuće odgovore koji zadovoljavaju zahtjeve navedene u ATP - u. Izdržljivost je svojstvo analitičke metode da uz male promjene uvjeta ispitivanja daje rezultate prihvatljive ispravnosti i pouzdanosti (46). QbD pristup ispitivanju izdržljivosti metoda HPLC zahtijeva procjenu svih značajki koje imaju najveći utjecaj na kritična svojstva kakvoće, bilo pojedinačno ili u kombinaciji s drugim značajkama. Ispitivanje izdržljivosti može se provesti primjenom eksperimentalnog dizajna i pomoću ranije navedenih računalnih programa koji većinom sadrže module za ispitivanje izdržljivosti metode (Slika 11).

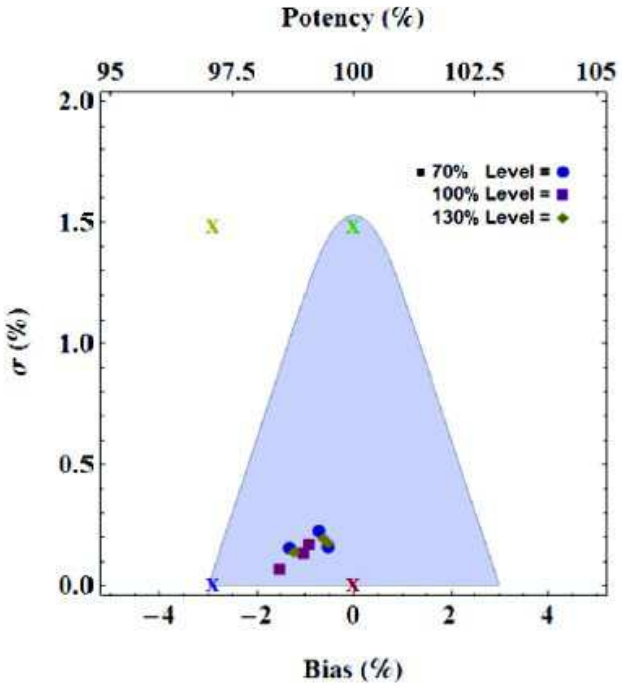


Slika 11. Drylab prikaz područja izdržljivosti za tri različite stacionarne faze ispitivane pod istim uvjetima

Kontinuirane i kategoričke varijable metode. Eksperimentalnim dizajnom mjere se i statistički obrađuju značajke metode za koje se zahtjev prikazuje numerički tzv. kontinuirane varijable (sastav mobilne faze, koncentracija pufera, *pH*, temperatura kolone, protok mobilne faze i gradijent) i procjenjuje njihov utjecaj na kritična svojstva kakvoće metode (razdvajanje kritičnog para pikova, vrijeme zadržavanja, omjer signala i šuma). Za kategoričke varijable (serija kolone, vrsta instrumenta i drugo) eksperimentalni dizajn može pokazati koje značajke

imaju značajan utjecaj na izvedbene značajke metode kao što su točnost i preciznost (19). Kategoričke varijable označavaju se kao značajke potencijalnog šuma. Kontinuirane varijable ispituju se tijekom ispitivanja izdržljivosti, a kategoričke varijable ispituju se kod ispitivanja otpornosti. Otpornost metode je stupanj obnovljivosti rezultata ispitivanja provedenih pod različitim uvjetima (različiti laboratoriji, analitičari, instrumenti, reagensi, dani, i drugo) (46). Otporna metoda je tolerantna na svaki šum s kojim se može susresti tijekom uporabe, a izdržljiva metoda je neosjetljiva na male razlike u značajkama.

Verifikacija prostora dizajna. Verifikaciju metode je potrebno provesti na nekoliko točaka unutar prostora dizajna i provjeriti da li one zadovoljavaju definirane kriterije točnosti i preciznosti (Slika 12.). Provjera točnosti i preciznosti omogućuje dodatno razumijevanje mjerne nesigurnosti metode i potvrđuje usklađenost s prethodno definiranim zahtjevima uspješnosti metode (s ATP-om).



Slika 12. Krivulja ATP zahtjeva za točnost i preciznost metode za određivanje sadržaja. Rezultati ispitivanih točaka unutar prostora dizajna nalaze se unutar očekivanih vrijednosti točnosti i preciznosti (26).

Odabir radnih uvjeta metode. Za radne uvjete metode može biti odabrana bilo koja od točaka unutar prostora dizajna. Najčešće se odabire točka koja najbolje zadovoljava kritična svojstva kakvoće ili točka koja je najprikladnija za eksperimentalni rad (39).

4.4.5. Validacija metode

Nakon što je analitička metoda razvijena može započeti formalni postupak validacije metode. Iako validacija i dalje slijedi *ICH Q2 (R1)* smjernice, pravilan razvoj metode i postupak procjene rizika metode čine validaciju samo formalnošću (47). S obzirom da je metoda temeljito razvijena i ocijenjena, malo je vjerojatno da će se tijekom validacije pojaviti problemi. Validacijske značajke i pripadajući kriteriji prihvata za metode HPLC navedene su u Tablici 7.

Tablica 7. Validacijske značajke i pripadajuće vrijednosti prihvaćanja za metode HPLC (29, 46).

Validacijske značajke	**Identifikacija**	**Ispitivanje onečišćenja**		**Određivanje sadržaja**
		određivanje	**granice**	
Točnost	-	-	Ovisno o konc.	R= 100±2% RSD≤2%
Preciznost				
Ponovljivost	-	-	Ovisno o konc.	RSD ≤ 1%
Srednja preciznost	-	-	Ovisno o konc.	RSD ≤ 2%
Obnovljivost	-	-	Ovisno o konc.	RSD ≤ 2%
Specifičnost	zadovoljavajuća razdvojenost pikova	zadovoljavajuća razdvojenost pikova		zadovoljavajuća razdvojenost pikova
Granica dokazivanja	-	signal/šum = 3		-
Granica određivanja	-	-	signal/šum = 10	-
Linearnost	-	-	$r^2 \geq 0,999$	$r^2 \geq 0,999$
Radno područje	-	-	LOD/LOQ – 120% specificiranog onečišćenja	80 – 120% ispitivane koncentracije analita

Formalna provjera valjanosti metode provodi se na skupu značajki metode odabranom unutar prostora dizajna, najčešće za kombinaciju značajki koje su odabrane kao optimalni i radni uvjeti metode (48). Na taj način kvalitativna izvedba metode ocjenjena je unutar definiranog prostora dizajna ispitivanjem izdržljivosti, a kvantitativna svojstva procijenjena su samo za jedan skup značajki. Kako bi se strategija QbD koncepta primijenila i na validaciju metode, poželjno je odabrati nekoliko skupova značajki metode unutar prostora dizajna, provesti za

njih provjeru valjanosti pomoću eksperimentalnog dizajna i usporediti rezultate s onima dobivenim tijekom formalne validacije.

4.4.6. Strategija kontrole analitičke metode

Strategija kontrole je važna značajka QbD koncepta definirana smjernicom *ICH Q10*. Strategija kontrole za analitičke metode osigurava da se metoda koristi u skladu s njenom namjenom u rutini. Strategija kontrole za metode se definira kao postavke metode kojima se osigurava da metoda zadovoljava tradicionalne kriterije prikladnosti sustava ali i šire ciljeve vezane za izvedbene značajke metode (42). Strategija kontrole definira se na temelju podataka prikupljenih tijekom razvoja metode, ispitivanja izdržljivosti i verifikacije metode. Značajke koji su tijekom procjene rizika identificirane kao one koje je potrebno kontrolirati i značajke za koje je tijekom ispitivanja izdržljivosti dokazano da imaju velik utjecaj na rezultate uzimaju se u obzir prilikom postavljanja strategije kontrole. Definiranje strategije kontrole metoda QbD pristupom ne razlikuje se puno u usporedbi s tradicionalnim pristupom. Primjenom QbD koncepta strategija kontrole se definira na temelju veće količine podataka koristeći zahtjeve ATP-a kao vodič, čime je jače povezana svrha metode i izvedbene značajke metode (26). Strategija kontrole koja se najčešće definira za metode HPLC u rutinskoj primjeni je ispitivanje prikladnosti sustava (engl. *System Suitability Test*, SST) koje pokazuje da analitički postupak zadovoljava kritična svojstva kakvoće definirana tijekom QbD razvoja (18). Ispitivanjem prikladnosti sustava se definiraju minimalno razlučivanje između pikova kritičnog para, prihvatljiva vrijednost za simetričnost pikova, maksimalno prihvatljiva vrijednost izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) za ponovljene analize otopine standarda, minimalna vrijednost koeficijenta određivanja standardne krivulje (R^2) i drugo. Osim ispitivanja prikladnosti sustava, za provođenje strategije kontrole analitičkih metoda mogu se koristiti i grafikoni statističke kontrole, kao što su dijagrami *Shewhart X-R* (33).

4.4.7. Kontinuirano praćenje i poboljšanje metode

Tijekom rutinske primjene metode potrebno je kontinuirano praćenje izvedbe metode i kontrola zadovoljava li metoda značajke definirane profilom namjene analitičke metode. Potrebno je pratiti, dokumentirati i razumjeti izvedbene značajke metode, te na temelju bogatog iskustva stečenog tijekom razvoja metode, procjene valjanosti metode i definirane strategije kontrole uvoditi poboljšanja primjenom novih procesa i tehnologija. Ovaj korak QbD koncepta može se primijeniti za optimiranje postojećih metoda (40). Optimiranje kromatografskih metoda često je složen posao s obzirom na veliki broj značajki koje utječu na selektivnost metode, osobito onih metoda koje se bave velikim brojem onečišćenja i kritičnim razlučivanjem (49). Stoga su QbD koncept, primjena eksperimentalnog dizajna i ostalih koraka koji nakon njega slijede u QbD tijeku razvoja metode od velike pomoći za poboljšanje izvedbenih značajki postojećih metoda.

4.5. Upravljanje životnim ciklusom analitičkih metoda

Validacija analitičkih metoda se često provodi jednokratno s ciljem izrade validacijskog izvješća. Time je *ICH Q2 (R1)* smjernica shvaćena na način da se validacijom provodi testiranje značajki propisanih smjernicom (Tablica 7.), a ne na način da se provodi smislena potvrda valjanosti metode i time osiguraju dosljedne izvedbene značajke metode (50). Takav tradicionalni pristup validaciji analitičkih metoda mogao bi se zamijeniti QbD pristupom na način koji predlažu USP stručna komisija za validaciju i verifikaciju (19) i još neki autori (50). U svom *stimuli* članku, USP stručna komisija za validaciju i verifikaciju je, na temelju ICH smjernica *Q8 (R2), Q9, Q10 i Q11*, napravila procjenu općih poglavlja Američke farmakopeje <1225> (*Validacija farmakopejskih metoda*), <1226> (*Verifikacija farmakopejskih metoda*) i <1224> (*Prijenos analitičkih metoda*), te predložila da se

tradicionalni pristup validaciji, verifikaciji i transferu metoda zamijeni novim pristupom kroz životni ciklus metode i novo USP poglavlje <1220> *Upravljanje životnim ciklusom analitičkih metoda*. Na taj način bi se tradicionalni pristupi validacije, verifikacije i prijenosa integrirali u proces životnog ciklusa analitičke metode umjesto da se gledaju kao zasebne cjeline. Predložen koncept je u skladu s FDA smjernicama za industriju koje opisuju opća načela i primjenu validacije proizvodnog postupka (procesa) kojima su validacijske aktivnosti usklađene s konceptom životnog ciklusa lijeka. Na isti način kako je predloženo za validaciju procesa i prihvaćeno u općem poglavlju Američke farmakopeje za kvalifikaciju opreme, predlaže se novi pristup validaciji analitičkih metoda. Ovaj novi koncept koji se temelji na tri faze (Dizajn metode, kvalifikacija metode i kontinuirana provjera metode) osigurava prikladnost metode za danu namjenu kroz cijeli životni ciklus metode (Slika 13.).



Slika 13. Prikaz životnog ciklusa za analitičke metode.

Primjenom pristupa životnog ciklusa u validaciji metode, validacija bi se definirala kao prikupljanje i procjena podataka i stečenih saznanja, od faze razvoja metode kroz životni ciklus primjene metode i bila temeljena na znanstvenim dokazima da se metodom mogu dobiti kvalitetni rezultati.

Faza dizajna metode uključuje izbor tehnike i razvoj metode u skladu sa zahtjevima definiranim ATP-om, stjecanje saznanja i razumijevanja o tome kako potencijalne promjene u metodi utječu na izvedbene značajke metode procjenom rizika i ispitivanjem izdržljivosti i otpornosti metode, te definiranje uvjeta i strategije kontrole koji omogućuju da metoda uvijek zadovoljava zahtjeve ATP – a. Posljednji korak u ovoj fazi je dijeljenje informacija i iskustava s analitičkim laboratorijem koji će rutinski koristiti metodu.

Kvalifikacijom metode pokazuje se da metoda pri uobičajenim radnim uvjetima i okolini u kojoj se rutinski primjenjuje daje rezultate koji zadovoljavaju uvjete preciznosti i točnosti definirane ATP-om. Kvalifikacija metode se provodi za novu analitičku metodu ili za postojeću metodu kojoj su promijenjeni radni uvjeti ili radna okolina.

Kontinuiranom provjerom metode omogućuje se kontrola metode tijekom njene rutinske uporabe kroz cijeli životni ciklus. To uključuje gmail), kao i verifikaciju izvedbenih značajki nakon uvođenja bilo kakve izmjene. Aktivnosti koje je potrebno provesti nakon uvođenja izmjena definiraju se na temelju procjene rizika kojom se procjenjuje ima li izmjena utjecaj na sposobnost metode da i dalje zadovolji zahtjeve ATP-a. Verifikacija nakon uvođenja izmjene može biti u rasponu od potvrde da li metoda i dalje ispunjava uvjete prikladnosti sustava do provođenja ekvivalencijskih studija koje pokazuju da li promjena negativno utječe na točnost ili preciznost metode. Prilikom svake izmjene potrebno je provesti detaljnu procjenu rizika i utvrditi koje validacijske značajke je potrebno ispitati.

Glavna prednost primjene životnog ciklusa metode umjesto tradicionalne validacije je fleksibilnost u obavljanju validacijskih aktivnosti i kontrola samo onih značajki za koje je procjenom rizika utvrđeno da ih je potrebno validirati i koje su definirane ATP-om za danu namjenu metode. Time bi se zamijenio pristup validaciji koji se provodi na *check-box* način, da se zadovolje svi zahtjevi navedeni u *ICH Q2 (R1)* i nepotrebno opsežan rad te osiguralo da su napori koji se ulažu u postupku validacije zaista oni koji su stvarno i potrebni. Ovaj pristup

ujednačava terminologiju koja se koristi za validaciju proizvodnog postupka i kvalifikaciju opreme i podupire pristup životnog ciklusa, uklanja postojeće nejasnoće vezane za pojmove u validaciji kao što su validacija, re-validacija, prijenos i verifikacija i pojašnjava za koje je značajke potrebna procjena valjanosti u pojedinom dijelu životnog ciklusa. Prednosti primjene predloženog koncepta životnog ciklusa navedene su u Tablici 8.

Tablica 8. Prednosti primjene koncepta životnog ciklusa za upravljanje analitičkim metodama.

Trenutni pristup	**Predložen pristup životnog ciklusa**
Ograničeno razumijevanje utjecaja promjena na izvedbu metode.	Detaljan, strukturirani pristup kojim se identificiraju i istražuju značajke metode i njihovi utjecaji.
Validacija se provodi na način da se zadovolje kriteriji prihvata izvedbenih značajki metode prema *ICH Q2 (R1).*	Prikladnost metode se provodi ispitivanjem specifičnog ATP-a koji za svaki zahtjev mjerenja ima definirane značajke i kriterije koje metoda mora zadovoljiti.
Validacija, verifikacija i transfer se smatraju zasebnim aktivnostima.	Sve tri aktivnosti su integrirane u životni ciklus analitičke metode, a uspjeh se prikazuje dobivanjem rezultata koji su u skladu sa zahtjevima ATP-a.
Nejasnoća oko primjene pojmova validacija, transfer i verifikacije metode.	Povećano razumijevanje i holistički pristup uz ATP kao žarište.
Validacija metode se provodi jednom na završetku razvoja metode.	Validacija u životnom ciklusu metode predstavlja sve aktivnosti kojima se osigurava da metoda daje valjane rezultate tijekom cijelog svog životnog ciklusa (od razvoja kroz cijelu rutinsku primjenu);

Trenutni pristup	Predložen pristup životnog ciklusa
	kvalifikacijom metode se prikazuje da metoda ima izvedbene značajke potrebne za danu namjenu.
Transfer metode uključuje aktivnosti kojima se metoda prenosi iz jednog analitičkog laboratorija u drugi i dokaze da oba laboratorija dobivaju jednake rezultate.	Uvođenje metode uključuje aktivnosti koje se provode kako bi se osiguralo učinkovito postavljanje metode za rutinsku primjenu i uključuje prijenos saznanja iz izvornog laboratorija.
Verifikacijom metode se osigurava da je farmakopejska metoda djelotvorna u stvarnim uvjetima, a revalidacija se provodi kod uvođenja promjena koje bi mogle utjecati na validacijske značajke.	Verifikacijom izvedbe metode se potvrđuje da metoda i dalje udovoljava svojoj namjeni nakon promjene u radnim uvjetima metode i radnom okruženju metode.
Odvojene smjernice u Američkoj farmakopeji koje se odnose na validaciju, verifikaciju, transfer analitičkih metoda i verifikaciju izvedbenih značajki sustava.	Jedinstvena smjernica za pristup životnog ciklusa za analitičke metode. Primjena terminologije životnog ciklusa koja je u skladu s terminologijom koja se koristi za novi pristup u validaciji proizvodnog postupka i kvalifikaciji opreme.

4.6. Upravljanje znanjem

Smjernica *ICH Q10* upravljanje znanjem definira kao sustavni pristup stjecanja, analize, pohranjivanja i širenja informacija vezanih za proizvod, proizvodne procese i komponente. Upravljanje znanjem je važan čimbenik u osiguravanju učinkovitosti strategije kontrole (21).

Veliku količinu znanja sakupljenog tijekom analitičkog QbD razvoja metode potrebno je pohraniti za buduću upotrebu u odgovarajuće baze podataka. Pohranjivanje i širenje saznanja i iskustva stečenog tijekom razvoja je potrebno kako bi se strategija kontrole primijenila u svim laboratorijima koji koriste metodu. Promjene i poboljšanja u metodi je potrebno provoditi u skladu s informacijama i saznanjima sakupljenim u različitim fazama životnog ciklusa metode. Baza podataka omogućuje da se potencijalne promjene u metodi provode u skladu sa saznanjima i iskustvom stečenim za vrijeme odabira i ocjenjivanja metode i provedene procjene rizika. Upravljanje rizicima u kakvoći analitičkih metoda se može definirati kao sustavni postupak procjene, kontrole, komunikacije i pregleda rizika u kakvoći podataka kroz životni ciklus metode i u skladu je sa smjernicom *ICH Q10* (19).

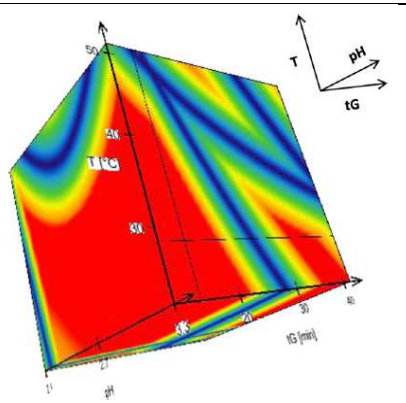
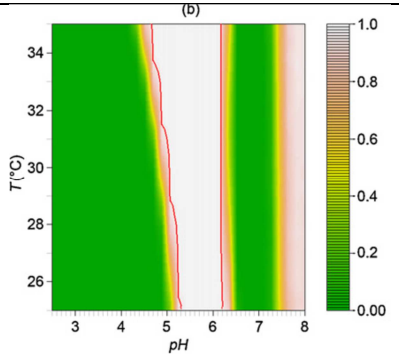
4.7. Primjena elemenata QbD koncepta u razvoju i optimiranju metoda HPLC

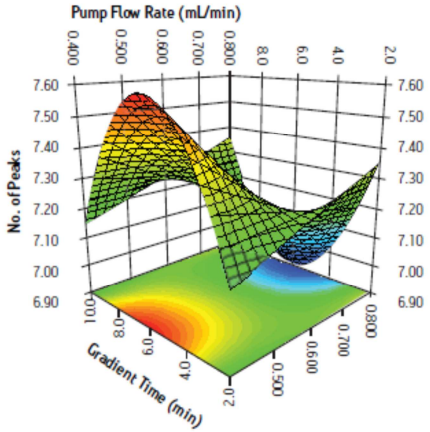
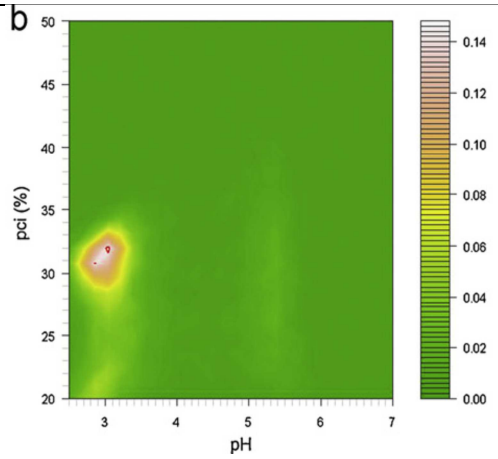
Razvoj novih metoda HPLC često predstavlja složen i dugotrajan proces, a s obzirom da farmaceutske tvrtke danas teže bržem i učinkovitom razvoju jednostavnih, izdržljivih i preciznih metoda koje karakterizira kratko vrijeme mjerenja, bilo bi za očekivati da se elementi QbD koncepta često primjenjuju kao alternativni pristup konceptu *kakvoće nakon kontrole kakvoće*. Istraživanje objavljenih radova o primjeni elemenata QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda HPLC pokazuje, jos uvijek, rijetku primjenu QbD koncepta, vjerojatno zbog ograničenih saznanja o njegovim mogućnostima i alatima za njegovu primjenu.

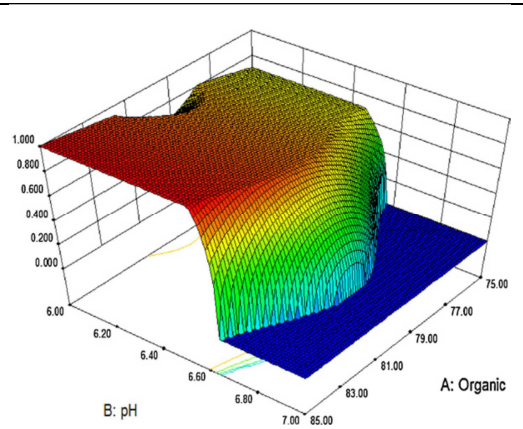
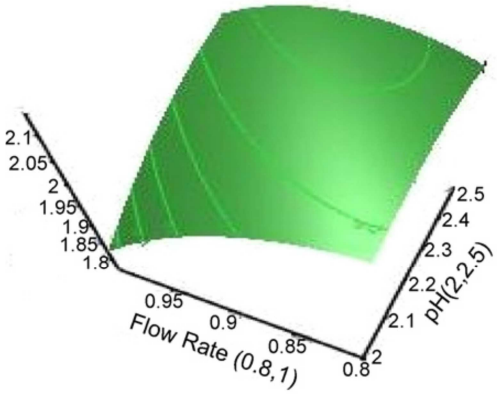
U ovom radu sustavno je prikazana primjena elemenata QbD koncepta u razvoju i optimiranju metoda HPLC u zadnjih pet godina (Tablica 9.).

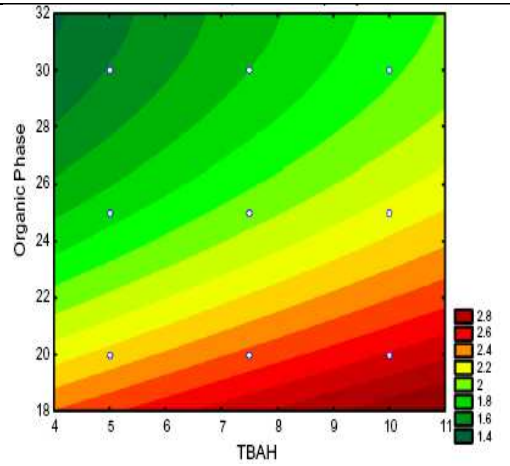
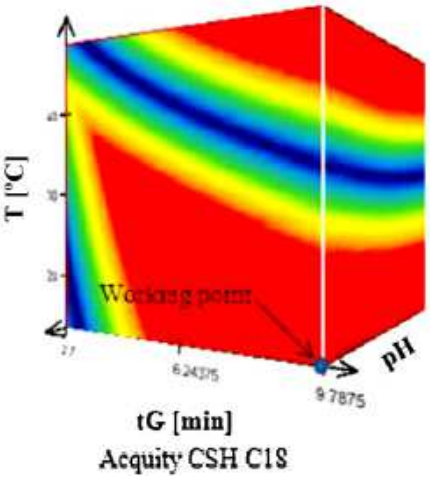
Za svaki rad navedeni su ispitivane kritične procesne značajke i kritična svojstva kakvoće koja opisuju izvedbu metode, te model eksperimentalnog dizajna korišten za definiranje prostora dizajna.

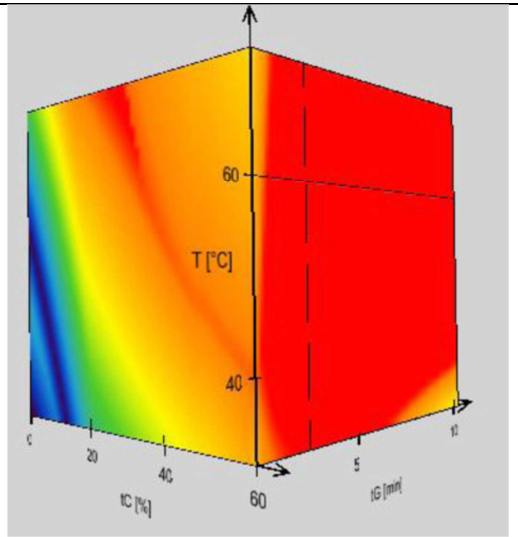
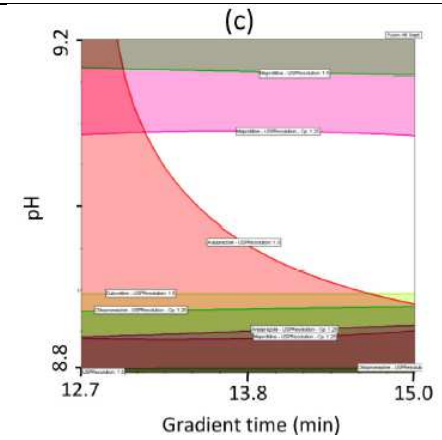
Tablica 9. Sustavni prikaz primjene elemenata QbD koncepta u razvoju i optimiranju metoda HPLC u zadnjih pet godina

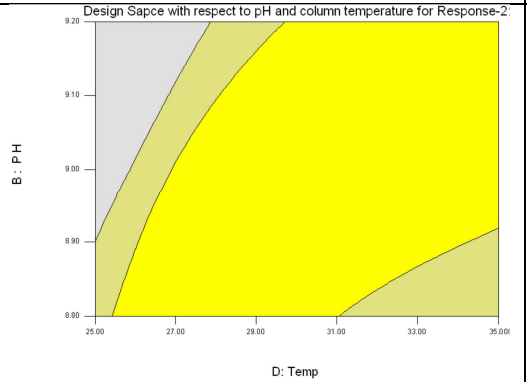
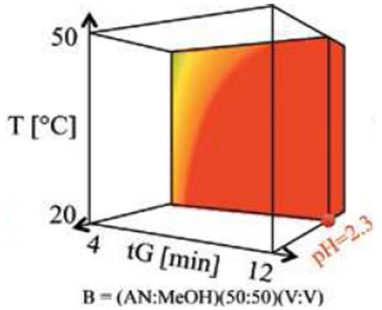
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Razvoj metode UPLC za određivanje sadržaja dvije djelatne tvari u kapima za oči	vrijeme gradijenta (15 i 30 min); temperatura (25 i 50 °C); pH (2.1, 2.7 i 3.3; 6.8, 7.4 i 8.0)	razdvajanje pikova, $Rs_{,krit}$>1.5; kritični par pikova; vrijeme mjerenja	Drylab (puni faktorijalni dizajn)	Brza, izdržljiva i pouzdana metoda		32
Metoda HPLC za provjeravanje 19 antimalarika	Vrijeme gradijenta (20, 40 i 60 min); temperatura (25, 30 i 35°C); pH (2.5, 4.0, 6.0, 8.0 i 10.0)	Kriterij odvajanja, S	Puni faktorijalni dizajn	Optimalno razdvajanje složene smjese; metoda izdržljiva na promjene temperature		43

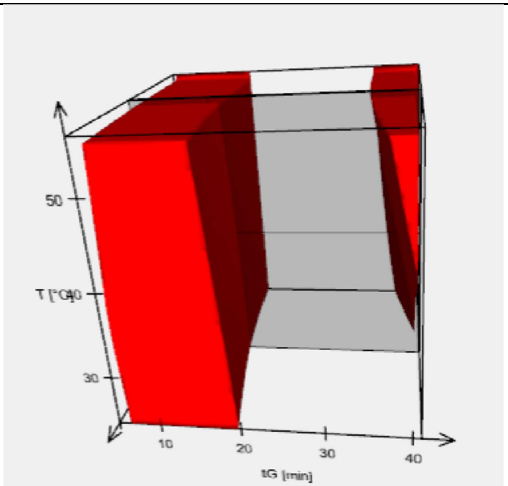
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za određivanje onečišćenja u prisilno razgrađenom uzorku ziprasidona	temperatura; volumen injektiranja; vrijeme gradijenta (2-10 min); protok (0.4-0.8 mL/min)	broj pikova; razlučivanje pikova; vrijeme zadržavanja zadnjeg pika; faktor simetrije	Fusion AE	Izdržljiva metoda koja omogućuje odvajanje i simetričnost svih pikova; metoda je uspješno transferirana s UPLC na HPLC pomoću računalnog programa		54
Metoda HPLC za kvanitativno određivanje dicentrina u listovima *S.penduliflorum*	tri različite kolone; pH (2.5, 4.5 i 7); promjena gradijenta (0.4, 0.6 i 1%/min); % MeOH na početku gradijenta (20,30, 40 i 50)	Vrijeme zadržavanja početka, vrha i kraja svakog pika; kriterij odvajanja, S	Puni faktorijalni dizajn	Razdvajanje dicentrina i njegovog izomera; selektivnost prema 11 ostalih sastojaka		61

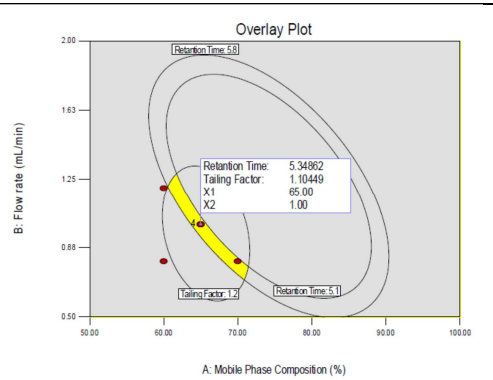
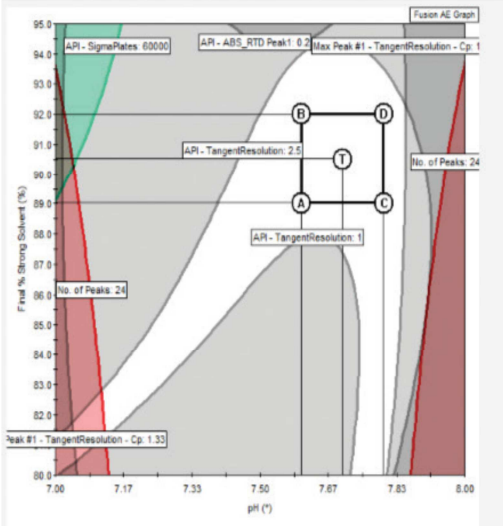
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Stabilitetno-indikativna metoda UPLC za određivanje darifenacin hidrobromida, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata	postotak organskog otapala u mobilnoj fazi B (75 i 85); pH (6 i 7); temperatura (25 i 35°C)	Razdvajanje kritičnog para pikova; vrijeme zadržavanja posljednjeg pika	Design Expert (Centralno kompozitni dizajn)	Selektivna stabilitetno-indikativna metoda za kvantitativno određivanje darifenacin HBr i njegovih onečišćenja		49
Metoda HPLC za razdvajanje hidroliziranih peptida protamin sulfata	Protok (0.8, 0.9 i 1.0 mL/min); pH (2.0, 2.25 i 2.5); temperatura (24, 27 i 30 ˚C)	Razdvajanje pikova >1.8; simetrijski faktor <1.2	Box–Behnkenov dizajn	Učinkovita i izdržljiva metoda HPLC za određivanje peptida protamin sulfata s granicom dokazivanja 0,015 mg/mL i granicom određivanja 0,06 mg/mL.		64

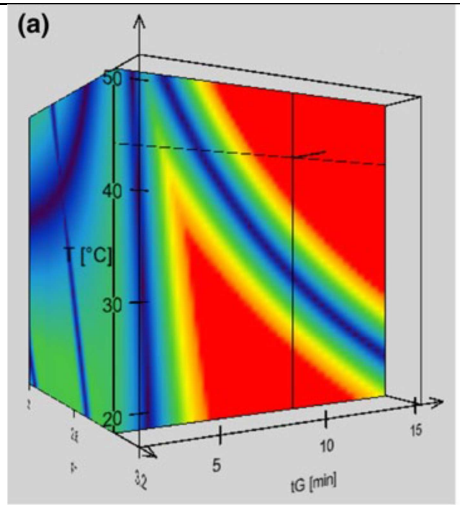
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Stabilitetno-indikativna metoda za određivanje eberkonazol nitrata	Postotak metanola u mobilnoj fazi B (20, 25 i 30%); konc. ion-par reagensa (5, 7.5 i 10 mM); pH (2.6, 2.9 i 3.2)	faktor kapaciteta	Puni faktorijalni dizajn	Jednostavna, precizna i ponovljiva metoda za određivanje eberkonazol nitrata u prisutnosti njegovih razgradnih produkata		55
Optimiranje metode UPLC za određivanje Amlodipina i njegovih onečišćenja	Devet kolona; vrijeme gradijenta (3 i 9 min); temperatura (15 i 45°C); pH (2.0, 2.5 i 3.0)	Razdvajanje pikova, $Rs_{, krit}$>1.5	Drylab (puni faktorijalni dizajn)	Optimirana metoda; optimalni uvjeti određeni za svaku ispitivanu kolonu; mjerenje skraćeno sa 60 min na 6 min		40

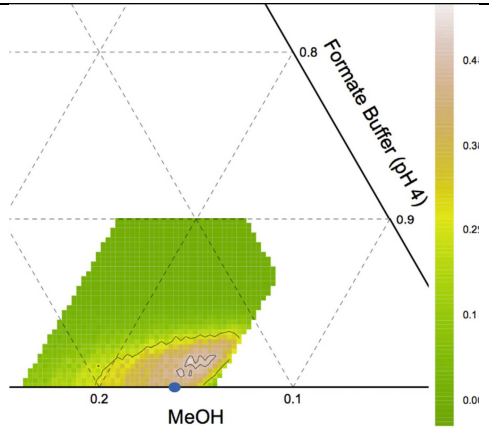
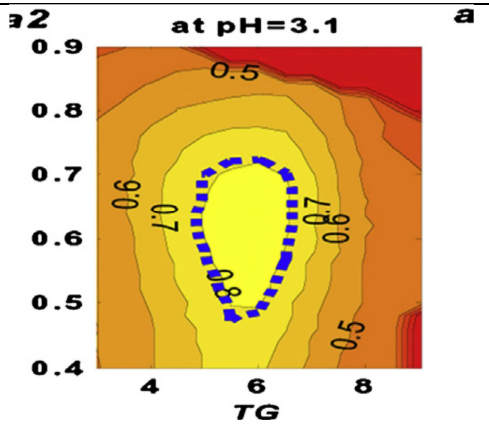
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Stabilitetno-indikativna metoda UPLC za određivanje ebastina i njegovih onečišćenja	Vrijeme gradijenta (2 i 6 min); temperatura (35 i 70◦C); tercijarni sastav mobilne faze B (100% AN, AN:2-propanol 70:30 i AN:2-propanol 40:60)	Razdvajanje pikova, Rs >2	Drylab (Puni faktorijalni dizajn)	Brza, izdržljiva metoda za određivanje onečišćenja i razgradnih produkata u ebastinu; metoda prikladna za analizu djelatne tvari i gotovog lijeka; kratko mjerenje		17
Metoda UPLC za određivanje 15 antipsihotičkih djelatnih tvari	pH (3, 5 i 9); temperatura (30, 45 i 60 ◦C); vrijeme gradijenta (2, 6 i 10 min)	Ukupan broj pikova; Broj pikova za koef. razdvajanja>1.5	Fusion AE (Puni faktorijalni dizajn)	Izdržljiva metoda koja uspješno razdvaja smjesu antipsihotika s vremenom analize manjim od 15 min		30

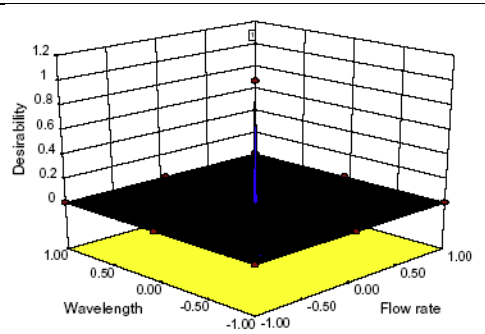
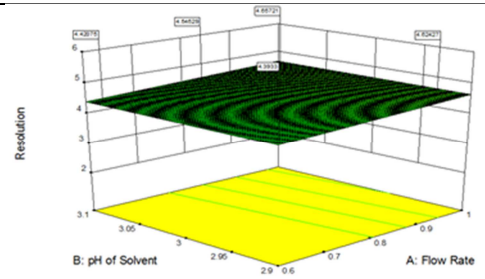
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za određivanje omeprazola i njegovih onečišćenja u formulaciji sa odgođenim otpuštanjem	protok (0.6-1.0 mL/min); pH (8.6-9.4); postotak acetonitrila u mobilnoj fazi B (45-85%); temperatura (20- 40°C)	Razlučivanje pikova>2	Design Expert (puni faktorijalni dizajn)	Izdržljiva metoda za odvajanje omeprazola i njegovih 11 onečišćenja u kratkom vremenu analize		57
Metoda UPLC za određivanje amlodipina i njegovih onečišćenja	Vrijeme gradijenta (4 i 12 min); sastav mobilne faze B (100% MeOH, MeOH:AN=50:50%, 100% AN); temperatura (20 i 50 °C); pH (2.0, 2.5 i 3.0)	Razdvajanje pikova $Rs_{,krit}$> 3.0	Drylab (Puni faktorijalni dizajn)	Brza i izdržljiva metoda		59

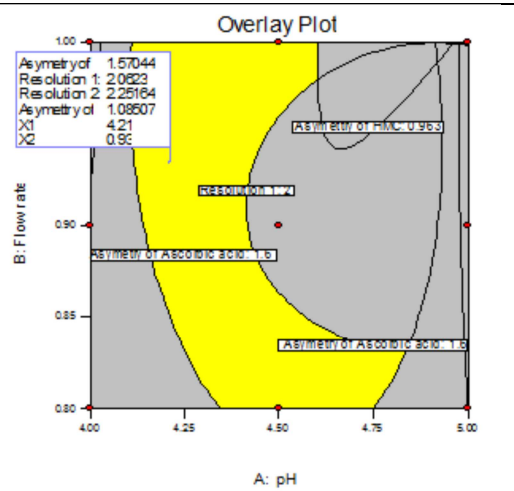
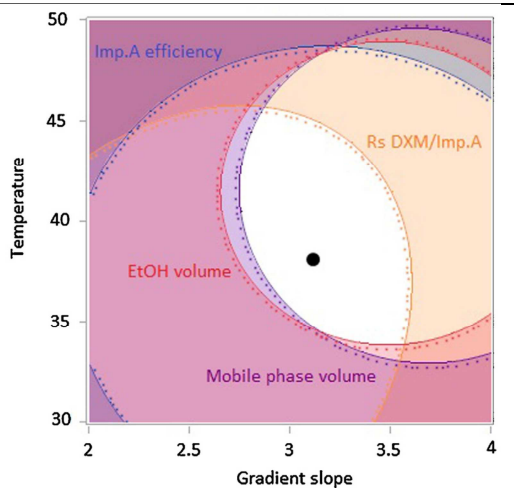
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Ispitivanje prikladnosti uporabe farmakopejske metode HPLC za pramipeksol i onečišćenja u ispitivanju gotovog lijeka	Vrijeme gradijenta (8 i 24 min); temperatura (27 i 54°C); pH (2.7, 3.0 i 3.3)	Razdvajanje pikova, Rs >2	Drylab (Puni faktorijalni dizajn)	Izdržljiva metoda za određivanje pramipeksola u gotovom lijeku		41
Optimiranje USP metode HPLC za određivanje amiodarona i njegovih onečišćenja	pH (4.7 - 5.1); udio organskog otapala u mobilnoj fazi (60 - 80%); temperatura (25 -40°C)	Razdvajanje pikova; vrijeme zadržavanja	Fusion AE	Optimirana farmakopejska metoda neosjetljiva na varijabilnost različitih serija kolone	Prikaz nije dostupan	66

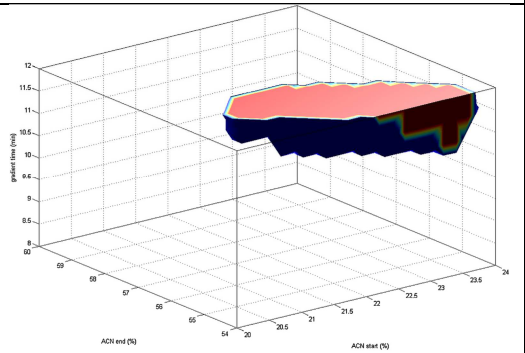
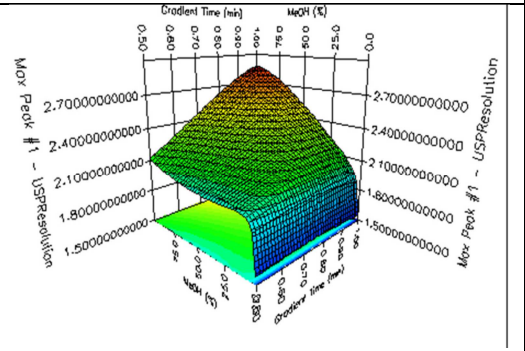
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za određivanje roflumilasta u djelatnoj tvari i gotovom lijeku	postotak organskog otapala u mobilnoj fazi (60, 65 i 70); pProtok (0.8, 1.0 i 1.2); pH (5.5, 6.0 i 6.5)	Vrijeme zadržavanja; faktor simetrije	Design Expert (Box-Behnkenov dizajn)	Jednostavna, brza, točna i precizna metoda		51
Stabilitetno-indikativna metoda HPLC za određivanje linagliptina u gotovom lijeku	Gradijent (5-95% i 5-80%); temperatura (30, 40 i 45 °C ; pH (7.0, 7.5 i 8.0)	broj pikova; razlučivanje pikova; simetrijski faktor; površina pika	Fusion AE (Centralni kompozitni dizajn)	Izdržljiva i selektivna metoda		52

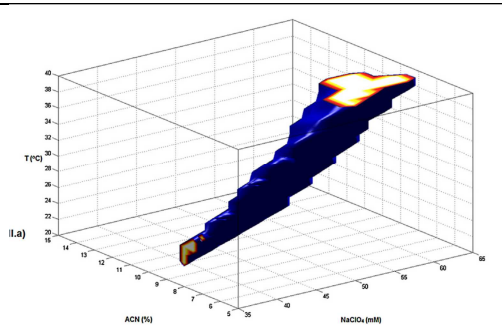
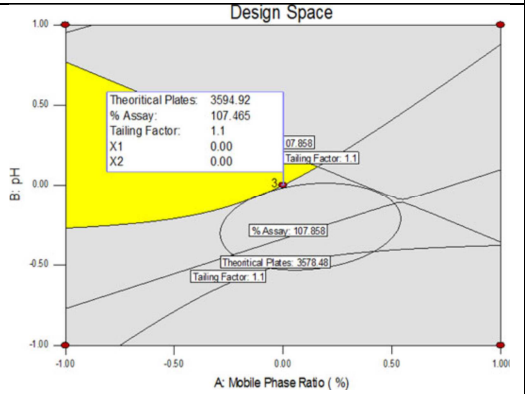
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda UPLC za određivanje amlodipina i bisoprolola i njihovih onečišćenja	Kolone (25); vrijeme gradijenta (3 i 9 min); temperatura (20 i 50 °C); pH (2.0, 2.6 i 3.2)	$Rs_{,krit} > 2.5$	DryLab (Puni faktorijalni dizajn)	Zadovoljavajuće odvajanje na 24 testirane kolone odgovarajućim prilagodbama gradijenta, temperature i pH uz vrijeme analize manje od 10 min. Određeni uvjeti konačne metode za razdvajanje 16 pikova u manje od 7 min		53

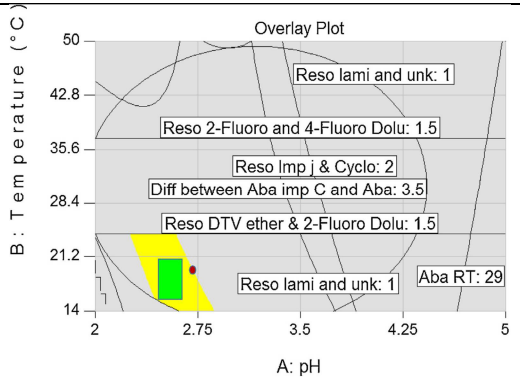
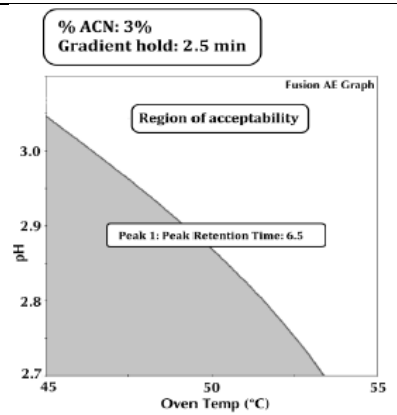
Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Stabilitetno-indikativna metoda HPLC-MS za određivanje onečišćenja u gotovom lijeku	dvije kolone; postotak organskog otapala u mobilnoj fazi (10-45); temperatura (22-44 °C).	Vrijeme zadržavanja; kriterij odvajanja, S	D-optimalni mješoviti dizajn	Optimirana metoda koja omogućuje odjeljivanje onečišćenja koja se javljaju u zadnjoj fazi stabilitetnog ispitivanja lijeka od do tada praćenih onečišćenja		30
Razvoj metode HPLC za određivanje osam molekula antidijabetika	tri kolone; vrijeme gradijenta (6 i 18 min; 4 i 12 min); pH (2.2, 3.1 i 3.8); tercijarni sastav mobilne faze B (100% AN, AN:MeOH=1:1 MeOH 100 %)	Minimalno razdvajanje R≥1.5; minimalno vrijeme zadržavanja prvog pika NLT 1.5 min; maksimalno vrijeme zadržavanja posljednjeg pika NMT 10/15 min	Chromocad (puni faktorijalni dizajn)	Brzo i izdržljiva metoda za razdvajanje osam molekula antidijabetika u manje od 6 min		18

Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za određivanje valsartana u formulaciji s nanočesticama	pH (2.8, 3.0 i 3.2); protok (0.8, 1.0 i 1.2 mL/min); valna duljina UV detektora (248, 250 i 252 nm)	Površina pika; faktor zadržavanja; broj teorijskih tavana	Design Expert (Puni faktorijalni dizajn)	Jednostavna, točna i precizna, štedljiva i izdržljiva metoda		62
Metoda HPLC za identifikaciju i određivanje risperidona i benzojeve kiseline u	pH (2.9, 3.0 i 3.1); protok (0.6, 0.8 i 1.0 mL/min); temperatura (20, 25 i 30 °C)	Površina pika; faktor simetrije; broj teorijskih tavana	Design Expert (Puni faktorijalni dizajn)	Izdržljiva metoda za određivanje risperidona i benzojeve kiseline i njihovih onečišćenja		37

Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za određivanje hesperidina, hesperidin metil kalkona i askorbinske kiseline u tabletama	pH (4.0, 4.5, 5.0); udio acetonitrila u mobilnoj fazi (0, 5 i 10%); protok (0.8, 0.9, 1.0)	Simetrijski faktor; razlučivanjepikova	Puni faktorijalni dizajn	Jednostavna, specifična i precizna metoda za istodobno određivanje hesperidina, hesperidin metil kalkona i askorbinske kiseline		63
Stabilitetno indikativna metoda UPLC za određivanje dekstrometorfan hidrobromida koja uključuje načela „zelene kemije“	pH (2.0-6.0); promjena gradijenta (2.0-4.0%/min); protok (0.20-0.40 mL/min); temperatura (30-50°C)	Vrijeme zadržavanja; broj teorijskih tavana za onečišćenja; ukupni volumen mobilne faze	Nemrod-W (Centralno kompozitni dizajn)	Učinkovita metoda koja uključuje elemente „zelene kemije“ u QbD pristup		31

Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za identifikaciju dabigatran eteksilate mesilata i njegovih 10 onečišćenja	sadržaj acetonitrila na početku gradijenta (10 i 30%); sadržaj acetonitrila na kraju gradijenta (48 i 60%); vrijeme gradijenta (8 i 15 min)	Kriterij odvajanja, S	Design-Expert (Box-Behnkenov dizajn)	Pouzdana i izdržljiva metoda za određivanje dabigatran eteksilat mesilata i njegovih procesnih i degradacijskih onečišćenja		65
Metoda UPLC za kvantitativno određivanje benzalkonij klorida	četiri kolone sastav mobilne faze B, udio acetontrila i metanola (MeOH 0-100%); sastav mobilne faze B na početku gradijenta (45-80%); vrijeme gradijenta (0.5–1 min)	četiri pika sa koef. radzvajanja ≥2.0; četiri pika sa koef. simetrije≤1.8; koeficijent razdvajanja između najvećeg i njemu najbližeg pika ≥2.5	Fusion AE	Više od 10 puta brža metoda i više od 80 puta osjetljivija metoda u odnosu na USP metodu		45

Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za određivanje pramipeksola i njegovih onečišćenja	koncentracija kaotropnih soli (35:3:65 mM); sadržaj acetontrila (5:0.5:15%); temperatura (20-40°C) 4 kolone 2 tipa kaotropnih soli	Vrijeme zadržavanja prvog i zadnjeg pika Razdvajanje pikova Koeficijent selektivnosti	Design Expert (D-optimalni dizajn)	Metoda s dodatkom kaotropnih soli u mobilnoj fazi koja uspješno razdvaja pramipeksol i njegovih 5 onečišćenja		39
Metoda HPLC za određivanje metotreksata	Sastav mobilne faze (65:15:05, 70:20:10 i 75:25:15); pH (2,3 i 5); protok (0.4, 0.6 i 0.8 mL/min)	broj teorijskih tavana; sadržaj; simetrijski faktor	Design Expert (Box–Behnkenov dizajn)	nova, jednostavna, brza i izdržljiva metoda za određivanje metotreksata u većem broju dozirnih oblika		56

Primjena QbD	**Ispitivane kritične značajke metode**	**Kritična svojstva kakvoće**	**Eksperimentalni dizajn**	**Rezultat**	**Grafički prikaz prostora dizajna**	**Lit.**
Metoda HPLC za određivanje Abacavir, Lamivudina i Dolutegravir i njihovih onečišćenja u gotovom lijeku	pH (2.5, 3.5 i 4.5); temperatura (20, 32.5 i 45°C); sastav mobilne faze B (10, 15 i 20%)	Vrijeme zadržavanja; razlučivanjepikova	Design Expert (Centralno kompozitni dizajn)	Selektivna, izdržljiva i jeftina metoda		36
Optimiranje stabilitetno-indikativne metode HPLC za gotov lijek	temperatura (45, 50 i 55°C); pH mobilne faze (2.7, 2.9, 3.1); početni % AN u mobilnoj fazi B (1,2 i 3%); vrijeme gradijenta (2.5, 5 i 10 min)	razdvajanje pikova>2; vrijeme zadržavanja pikova od interesa	Fusion AE	Selektivna metoda koja omogućuje razdvajanje pikova svih razgradnih produkata; izdržljiva metoda		67

Iz pregleda radova u Tablici 9., možemo zaključiti da se elementi QbD koncepta uspješno primjenjuju u razvoju i optimiranju postojećih (najčešće farmakopejskih) metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti koje se koriste za ispitivanje složenih smjesa djelatnih tvari i njihovih onečišćenja u gotovim lijekova. Razvijene i optimirane metode su jednostavne, brze, selektivne i izdržljive. U radovima uglavnom nisu korišteni svi elementi QbD koncepta. Radovi najčešće prikazuju primjenu eksperimentalnog dizajna za utvrđivanje i analizu odnosa kritičnih procesnih značajki i kritičnih svojstava kakvoće te način definiranja prostora dizajna i kontrolne strategije. Metode su validirane tradicionalnim pristupom validaciji prema smjernici *ICH Q2 (R1).*

5. ZAKLJUČAK

- Koncept kakvoće utemeljene kroz dizajn podrazumijeva sustavni pristup razvoju koji započinje s unaprijed definiranim ciljevima i stavlja naglasak na razumijevanje procesa i proizvoda te kontrolu procesa, a temelji se na znanstvenim dokazima i upravljanju rizicima u kakvoći. Elementi QbD koncepta i način njihove primjene opisani su u smjernicama *ICH Q8 (R2), ICH Q9, ICH Q10* i *ICH Q11*.
- Premda ICH smjernice ne spominju razvoj analitičkih metoda, načela QbD koncepta mogu se primijeniti za razvoj i optimiranje analitičkih metoda. QbD koncept primijenjen u životnom ciklusu analitičkih metoda naziva se analitička kakvoća utemeljena kroz dizajn.
- Analitička kakvoća utemeljena kroz dizajn (AQbD) uključuje definiranje cilja i namjene analitičke metode, odabir prikladne analitičke tehnike, procjenu rizika i definiranje kritičnih svojstva kakvoće metode i kritičnih značajki metode, razvoj metode, validaciju metode, razvoj strategije kontrole i upravljanje životnim ciklusom metode.
- Premda je primjena QbD koncepta u razvoju analitičkih metoda tek na početku i ne postoje jasne smjernice, primjena znanstvenog pristupa i pristupa temeljenog na procjeni rizika osigurava optimalna svojstva i pouzdanost metoda i njima dobivenih podataka.
- Najvažniji ishod uspješnog QbD razvoja analitičke metode je izdržljiva i otporna metoda koja će se koristiti mnogo godina.
- Dobro definirani cilj i namjena metode omogućuju razvoj metode koji se temelji na razumijevanju zahtjeva o kakvoći podataka i izvedbenim značajkama metode.
- Korištenjem QbD pristupa u razvoju metode omogućena je fleksibilnost. S obzirom da su ključne značajke metode dobro definirane, a izdržljivost metode ispitana u širokom rasponu, osnova regulatorne prijave može biti prijava prostora dizajna odnosno raspona odgovarajućih značajki metode.

- Koncept profila namjene analitičke metode (ATP) predstavlja dodatnu fleksibilnost. Razvoj metode koja zadovoljava ATP primjenom QbD metodologije u konačnici bi doveo do mogućnosti zamjene analitičkih metoda bez potreba regulatornih aktivnosti.
- Razvoj pouzdanih, izdržljivih i otpornih metoda omogućuje pouzdano ispitivanje i potvrdu kakvoće lijekova tijekom njihovog farmaceutskog razvoja i dalje kroz cijeli životni ciklus.
- Primjenom računalnih programa za razvoj metoda HPLC omogućen je brz i učinkovit QbD razvoj izdržljivih, selektivnih i brzih metoda. Računalni programi za razvoj metoda HPLC olakšavaju rad pri razvoju metoda jer sadrže razne module koji omogućuju izbor prikladne kolone, odabir inicijalnih eksperimentalnih uvjeta, odabir i izvođenje statističkog eksperimentalnog dizajna te testiranje izdržljivosti i otpornosti razvijenih metoda.

6. LITERATURA

1. Pojmovnik regulatornih kratica i akronima.

   Available at: http://www.farmaceut.org/o-nama/sekcije/sekcija-za-farmaceutsku-regulativu/pojmovnik-regulatornih-kratica-i-akronima-glossary-of-regulatory-abbreviations-and-acronyms, Accessed March 1,2016.

2. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q 8 (R2) Pharmaceutical Development; 2009.

   Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf. Accessed March 12, 2016.

3. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q 6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances;1999.

   Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf. Accessed March 22, 2016.

4. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q9 Quality Risk Management; 2005.

   Available at: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf. Accessed March 12, 2016.

5. Yu, LX. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control, Pharmaceutical Research 2008; 25(4): *DOI:* 10.1007/s11095-007-9511-1.
6. McConnell J, Nunnally BK, McGarve B. The Forgotten Origins of Quality by Design, Journal of Validation Technology; Summer 2010.
Available at: http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/Forgotten.pdf. Accessed March 12, 2016.
7. Juran, JM. The Quality Trilogy: A Universal Approach to Managing for Quality. Quality Progress;1986.
8. Juran, JM. Juran on Quality by Design: The New Steps for Planning Quality into Goods and Services. Free Press; 1992.
9. Pharmaceutical Quality for the 21st Century: A Risk-Based Approach.
Available at:
http://www.fda.gov/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/cder/ucm128080.htm. Accessed March 6,2016.
10. Luigetti R. EMEA QbD: A Global Implementation Perspective The EU Perspective, The Siena Conference on Product and Process Optimization, 2008.
11. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q 10 Pharmaceutical Quality System; 2008.
Available at:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf. Accessed March 12, 2016.

12. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q 11 Development and Manufacture of Drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities); 2012.

Available at:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11_Step_4.pdf. Accessed March 12, 2016.

13. Final Concept Paper Q12: Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management dated 28 July 2014.

Available at:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q12/Q12_Final_Concept_Paper_July_2014.pdf. Accessed March 12, 2016.

14. European Medicines Agency (EMA): Quality by Design. *Available at:*

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000162.jsp&mid=WC0b01ac058076ed73. Accessed March 6, 2016.

15. USP 39 – NF 34, General Chapter 621, Chromatography, 2016.

16. Colgan S, Hanna-Brown M, Pellett J, Wrisley L, Sluggett G, Morgado J, Harrington B, Szucs R, Barnett K, Graul T, Steeno G. Using Quality by Design to Develop Robust Chromatographic Methods. PharmTech2014; 38 (8). *Available at*:

http://www.pharmtech.com/using-quality-design-develop-robust-chromatographic-methods. Accessed April 17, 2016

17. Schmidt AH, Molnár I. Using an innovative Quality-by-Design approach for development of a stability indicating UHPLC method for ebastine in the API and pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013; 78– 79: 65– 74.

18. Hubert C, Lebrun P, Houari S, Ziemons E, Rozet E,Hubert P. Improvement of a stability-indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing: A case of a learning process. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2014; 88: 401–409.
19. Martin GP, et al. Lifecycle Management of Analytical Procedures: Method Development, Procedure Performance Qualification and Procedure Performance Verification. Pharmacopeial Forum 2013;39.
20. Peraman R, Bhadraya K, Reddy XP. Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Analytical Chemistry 2015; 868727.
21. Schweitzer MG, Pohl M, Hanna-Brown M, Nethercote P, Borman P, Hansen G, Smith K, Larew J. Implications and opportunities of applying QbD principles to analytical measurements. PharmTech 2010; 34: 52–59.
22. Chatterjee S. IFPAC Annual Meeting:QbD Considerations for Analytical Methods - FDA Perspective, Baltimore, January 25, 2013.
23. EMA-FDA pilot program for parallel assessment of Quality-by-Design applications: : lessons learnt and Q&A resulting from the first parallel assessment. *Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2013/08/WC500148215.pdf. Accessed March 15, 2016.*
24. Turpin J, Lukulay PH, Verseput R. A Quality-by-Design Methodology for Rapid LC Method Development. S-Matrix Corporation 2012.
25. Vogt FG, Kord A. S. Development of quality-by-design analytical methods, Journal of Pharmaceutical Sciences 2011; 100: 797–812.
26. Reid GL, Morgado J, Barnett K, Harrington B, Wang J, Harwood J, Fortin D. Analytical Quality by Design (AQbD) in Pharmaceutical Development. 2013.

27. Molnár I, Rieger HJ, Monks KE. Aspects of the “Design Space” in high pressure liquid chromatography method Development, Journal of Chromatography A 2010; 1217:3193–3200.

28. USP 39 – NF 34, General Chapter 233, Elemental impurities, 2016.

29. ICH Harmonized Tripartite Guideline prepared within the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology; 2005. Available at: *http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Accessed March 22, 2016.*

30. Debrus B, Guillarme D, Rudaz S. Improved quality-by-design compliant methodology for method development in reversed-phase liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013; 84: 215– 223.

31. Boussès C, Ferey L, Vedrines E, Gaudin K. Using an innovative combination of quality-by-design and greenanalytical chemistry approaches for the development of a stabilityindicating UHPLC method in pharmaceutical products. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2015;115:114–122.

32. Karmarkar S, Garber R, Genchanok Y, George S, Yang X, Hammond R. Quality by Design (QbD) Based Development of a Stability Indicating HPLC Method for Drug and Impurities. Journal of Chromatographic Science 2010; 49.

33. Rozet E, Lebrun P, Debrus B, Boulanger V, Hubert P. Design Spaces for analytical Methods. Trends in Analytical Chemistry 2013; 42.

34. Ishikawa K. What is total quality control? The Japanese way. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1985: 63–64.

35. Schmauser B. Training workshop: Pharmaceutical development with focus on paediatric Formulations. Federal Institute for Drugs and Medical Devices (BfArM), Germany. Beijing, 2010.
36. Tol T, Kadam N, Raotole N, Desai A, Samanta G. A simultaneous determination of related substances by highperformance liquid chromatography in a drug product using qualityby design approach. Journal of Chromatography A 2016; 1432: 26–38.
37. Bhusnure OG, Shinde NG, Gholve SB, Giram PS. QbD approach for analytical method development of anti-pschotic drug. Der Pharmacia Lettre 2015; 7 (12): 62-70.
38. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: A tutorial review. Journal of Chromatography B 2012; 910: 2- 13.
39. Vemić A, Rakić T, Malenović A, Medenica M. Chaotropic salts in liquid chromatographic method development forthe determination of pramipexole and its impurities followingquality-by-design principles. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2015; 102: 314–320.
40. Kormánya R, Molnár I, Rieger HJ. Exploring better column selectivity choices in ultra-high performance liquid chromatography using Quality by Design principles. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013; 80:79– 88.
41. Schmidt AH, Stanic M, Molnár I. In silico robustness testing of a compendial HPLC purity method byusing of a multidimensional design space build by chromatographymodeling—Case study pramipexole. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2014; 91:97– 107.
42. Borman P, Nethercote P, Chatfield M, Thompson D, Truman K. 2007. The application of quality by design to analytical methods. PharmTech 2012; 31:142–152.
43. Debrus B, Lebrun P, Kindenge JM, Lecomte F, Ceccato C, Caliaro G, Tayey Mbay JM, Boulanger B, Marini RD, Rozet E, Hubert P. Innovative high-performance liquid

chromatography method development for the screening of 19 antimalarial drugs based on a generic approach, using design of experiments, independent component analysis and design space. Journal of Chromatography A 2011; 1218: 5205– 5215.

44. Lehtorinne E. A Systematic Approach Towards UPLC Method Development. Waters Corporation 2011. *Available at*: *http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/FI_NUT 2011_F6_UPLC_Method_Development.pdf. Accessed April 20, 2016.*
45. Lehtorinne E. A Systematic Approach Towards UPLC Method Development. Waters Corporation 2011. *Available at:* http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/FI_NUT 2011_F6_UPLC_Method_Development.pdf. *Accessed April 20, 2016.*
46. Vuković Rodríguez J. Validacija analitičkih metoda, nastavni materijal za kolegij Validacija analitičkih metoda, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
47. Sangshetti JN, Deshpande M, Zaheer Z. Quality by design approach: Regulatory need. Arabian Journal of Chemistry 2014.
48. Hubert C, Houari S, Rozet E, Lebrun P, Hubert P. Towards a full integration of optimization and validation phases: Ananalytical-quality-by-design approach. Journal of Chromatography A 2015; 1395: 88–98.
49. Murthy MV, Krishnaiah C, Srinivas K, Rao KS, Kumar NR, Mukkanti K. Development and validation of RP-UPLC method for the determination of darifenacin hydrobromide, its related compounds and its degradation products using design of experiments. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013; 72: 40– 50.
50. Ermer J, Nethercote P. Quality by Design for Analytical Methods: Implications for Method Validation and Transfer. PharmTech 2012; 36 (10). *Available at:*

http://www.pharmtech.com/quality-design-analytical-methods-implications-method-validation-and-transfer?id=&pageID=1&sk=&date=. Accessed April 17, 2016.

51. Shah AD, Patel CN. Implementation of QbD approcah to the RP-HPLC method development and valdiation of Roflumilast in bulk and tablet dosage form: An application in degradation study. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2014; 3 (6): 2281-2307.
52. Lateef SS, Vinayak AK. Quality-by-Design Approach to Stability Indicating Method Development for Linagliptin Drug Product. Agilent Technologies, Inc., 2014; 5991-3834EN.
53. Kormány R, Molnár I, Fekete J, Guillarme D, Fekete S. Robust UHPLC Separation Method Development for Multi-API Product Amlodipine and Bisoprolol: The Impact of Column Selection. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014; Chromatographia. DOI 10.1007/s10337-014-2633-9.
54. Summers M, Fountain KJ. A Quality by Design (QbD) Based Method Development for the Determination of Impurities in a Peroxide Degraded Sample of Ziprasidone. Waters Corporation. 2011; 720004072EN LS-PDF.
55. Krishna MV, Dash RN, Reddy BJ, Venugopal P, Sandeep P, Madhavi G. Quality by Design (QbD) approach to develop HPLC method for eberconazole nitrate: Application to hydrolytic, thermal, oxidative and photolytic degradation kinetics. Journal Of Saudi Chemical Society 2012.
56. Neeraj K. Garg, Sharma G, Singh B, Nirbhavane P, Katare OP. Quality by Design (QbD)-Based Development and Optimization of a Simple, Robust RP-HPLC Method for the Estimation of Methotrexate. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 2015; 38: 1629–1637.

57. Manranjan VC, Yadav DS, Jogia HA, Chauhan PL. Design of Experiment (DOE) Utilization to Develop a Simple and Robust Reversed-Phase HPLC Technique for Related Substances' Estimation of Omeprazole Formulations. Scientia Pharmaceutica 2013; 81: 1043–1056.
58. HPLC Basics Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC) Courtesy of Agilent Technologies, Inc. *Available at: http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf. Accessed April 14, 2016.*
59. Rieger HJ, Kormany R, Molnar I. Application of Quality by Design Principles to a Pharmaceutical Sample Using UHPLC Method Development with Modeling Technologies. Special Issues 2013.
60. Mokhtar HI, Abdel-Salam RA, Hadad GM. Development of a fast high performance liquid chromatographicscreening system for eight antidiabetic drugs by an improvedmethodology of in-silico robustness simulation. Journal of Chromatography A 2015; 1399: 32–44.
61. Rafamantanana MH, Debrus B,. Raoelison GE, Rozet E, Lebrun P, Uverg-Ratsimamanga S, Hubert P, Quetin-Leclercq J. Application of design of experiments and design space methodology for the HPLC-UV separation optimization of aporphine alkaloids from leaves of Spirospermum penduliflorum Thouars. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2012; 62: 23– 32.
62. Kumar L, Reddy MS, Managuli RS, Pai KG. Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. Saudi Pharmaceutical Journal 2015; 23: 549–555.
63. Patel B, Mittal K, Damor D, Mashru R. Quality by Design Approach to Analytical Method Development for Simultaneous Estimation of Hesperidin Methyl Chalcone, Hesperidin

and Ascorbic Acid in Their Combined Dosage Form by RP-HPLC Method. Human Journals Research Article 2015; 4 (2).

64. Awotwe-Otoo D, Agarabi C, Faustino PJ, Habib MJ, Lee S, Khan MA, Shah RB. Application of quality by design elements for the development and optimization of an analytical method for protamine sulfate. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2012; 62: 61– 67.
65. Pantović J, Malenović A, Vemić A, Kostić N, Medenica M. Development of liquid chromatographic method for the analysis ofdabigatran etexilate mesilate and its ten impurities supported byquality-by-design methodology. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2015; 111: 7–13.
66. Karmarkar S, Yang X, Garber R, Szajkovics A, Koberda M. Quality by design (QbD) based development and validation of an HPLC method for amiodarone hydrochloride and its impurities in the drug substance. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2014; 100: 167–174.
67. Karmarkar S, Garber R, Genchanok Y, George S, Yang X, Hammond R. Quality by Design (QbD) Based Development of a Stability Indicating HPLC Method for Drug and Impurities. Journal of Chromatographic Science 2010; 49.

KRATICE

AQbD	engl. *Analytical Quality by Design*	Analitička kakvoća utemeljena kroz dizajn
ATP	engl. *Analytical Target Profile*	Profil namjene analitičke metode
EMA	engl. *European Medicines Agency*	Europska agencija za lijekove
FDA	engl. *U.S. Food and Drug Administration*	Američka agencija za hranu i lijekove
HPLC	engl. *High performance liquid chromatography*	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
ICH	engl. *International Conference on Harmonisation*	Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za lijekove
QbD	engl. *Quality by design*	Koncept kakvoće utemeljene kroz dizajn
SAD	/	Sjedinjene Američke Države
UPLC	engl. *Ultra performance liquid chromatography*	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti