Razvoj UHPLC metode za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn

Car-Pavlic, Blaž

Master's thesis / Diplomski rad

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:163:906946

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Blaž Car-Pavlic

Razvoj UHPLC metode za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod mentorstvom prof.dr.sc Biljane Nigović, a izrađen je u Plivi Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj pod stručnim vodstvom Sanele Mutka, dipl.ing.chem. sveučilišne magistre razvoja lijekova.

Zahvaljujem se mentorici, prof.dr.sc. Biljani Nigovićna strpljenju, pomoći i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se Saneli Mutka, dipl.ing.chem. na pruženoj pomoći, trudu i strpljenju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada. Hvala kolegama u Plivi d.o.o. na odjelju Istraživanje i razvoj na nesebičnoj pomoći i brojnim savjetima. Hvala svim prijateljima koji su učinili studentske dane prekrasnim razdobljem i uvijek bili oslonac. Najviše hvala mojoj obitelji koja mi je bila bezuvjetna podrška kako tijekom studiranja, tako i uvijek u životu.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Pregabalin 1

1.2. Kromatografske metode odjeljivanja 2

1.2.1. Kromatografski parametri 3

1.2.2. Kvantifikacija 7

1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 9

1.3.1. Uređaj za tekućinski kromatografiju visoke djelotvornosti 10

1.4. Onečišćenja u lijekovima 12

1.4.1. Vrste onečišćenja 13

1.3.1. Kvaliteta ugrađena u dizajn u razvoju analitičke metode 16

2. Obrazloženje teme 17

3. Materijali i metode 18

3.1. Materijali 18

3.2. Radni instrumenti 18

3.3. Metode 19

3.3.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja od pregabalina 19

3.3.2. Određivanje optimalnog pufera za odjeljivanje sastavnica 19

3.3.3. Određivanje optimalne kolone za odjeljivanje sastavnica 19

3.3.4. Provjera linearnosti metode za određivanje onečišćenja 20

4. Rezultati 21

4.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja pregabalina 21

4.2. Određivanje optimalnog pufera za odjeljivanje sastavnica 22

4.3. Određivanje optimalne kolone za odjeljivanje sastavnica 25

4.4. Provjera linearnosti metode za određivanje onečišćenja 28

5. Rasprava 35

5.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja od pregabalina 35

5.2. Određivanje optimalnog pufera za odjeljivanje sastavnica 35

5.3. Određivanje optimalne kolone za odjeljivanje sastavnica 36

5.4. Provjera linearnosti metode za određivanje onečišćenja 37

6. Zaključci 39

7. Literatura 40

8. Sažetak/Summary 41

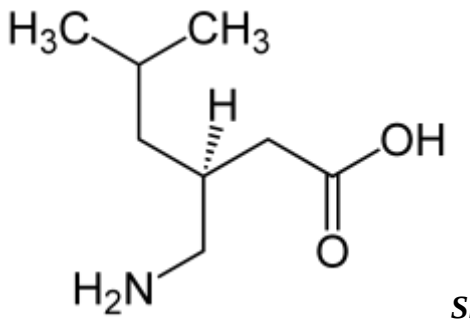
1. Uvod

1.1. Pregabalin

Pregabalin je lijek s djelovanjem na središnji živčani sustav koji se primarno koristi kao antikonvulziv. Analog je gama-aminomaslačne kiseline (GABA), slične strukture i djelovanja kao i gabapentin. Iako je strutkurno sličan GABA-i, ne djeluje izravno na GABA receptore, nego modulira sinaptičko i izvansinaptičko otpuštanje GABA-e. Glavni mehanizam antikonvulzivnog djelovanja jest učinak na voltažne Ca^{2+}-kanale. Pregabalin se visokim afinitetom veže za α2β podjedinice presinaptičkih kanala N-tipa s posljedičnim smanjenim utokom Ca^{2+} i inhibicijom otpuštanja glutamata.

Na temelju kontroliranih kliničkih studija, odobren je kao dodatna terapija u liječenju parcijalnih napada konvulzija. Također, odobren je i za liječenje neuropatske boli, uključujući i bolnu dijabetičku neuropatiju i postherpetičnu neuralgiju. Oralna mu je apsorpcija dobra, ne veže se za proteine plazme i ne metabolizira se. Poluvrijeme eliminacije iznosi 4,5 do 7 sati pa se kod većine bolesnika lijek mora primijeniti u višekratnim dozama. Dnevne su oralne doze u rasponu od 150 do 600 mg/dan, obično podijeljene u dvije do tri primjene. Najčešće nuspojave su pospanost, omaglica i ataksija, a interakcije s drugim lijekovima su minimalne. (Katzung, 2011)

Strukturno je mala molekula, kemijske formule $C_8H_{18}NO_2$. IUPAC-ovo ime molekule je "(3S)-3-(aminomethyl)-5-methylhexanoic acid". Molekulska masa pregabalina iznosi 159.23 $gmol^{-1}$. (www.drugbank.ca)



Slika 1: Struktura pregabalina

1.2. Kromatografske metode odjeljivanja

Kromatografija je najčešće korištena analitička tehnika u farmaceutskoj analizi. Razumijevanje parametara koji upravljaju kromatografskim performansama omogućilo je poboljšanja kromatografskih sustava. Mogućnost za postizanje razdjeljivanja visokog razlučivanja kontinuirano raste. (Watson, 2012)

Kromatografske tehnike temelje se na pojavama adsorpcije, razdijeljenja, ionske izmjene ili isključenja. Kromatografski postupci odjeljivanja temelje se na razdiobi između nepokretne faze velike površine i pokretne faze koja prolazi preko nepokretne. Uzorak otopljen u pokretnoj fazi koja može biti tekuća, plinovita ili superkritični fluid kreće se preko nepokretne faze koja može biti u koloni ili na plohi. Uzevši u obzir prirodu faza i dominantne sile koje utječu na razdiobu, kromatografske metode možemo svrstati kao u Tablici 1.

Tablica 1:*Podjela kromatografskih metoda*

Mehanizam odjeljivanja	Nepokretna faza	Pokretna faza	Izvedbena tehnika	Kratica
adsorpcija	čvrsta	tekuća	kolonska	LSC
	čvrsta	tekuća	plošna	TLC
	čvrsta	plin	kolonska	GSC
razdijeljenje/adsorpcija	tekućina na čvrstom nosaču	tekuća	kolonska	HPLC, LLC (LC)
	tekućina na čvrstom nosaču	tekuća	plošna	PC, TLC
	tekućina na čvrstom nosaču	plin	kolonska	GLC (GC)
	tekućina na čvrstom nosaču	superkritični fluid	kolonska	SFC
ionska izmjena	čvrsta	tekuća	kolonska	IEC
	čvrsta	tekuća	plošna	TLC
isključenje	čvrsta	tekuća	Kolonska, plošna	EC

Kromatografska analiza uključuje:

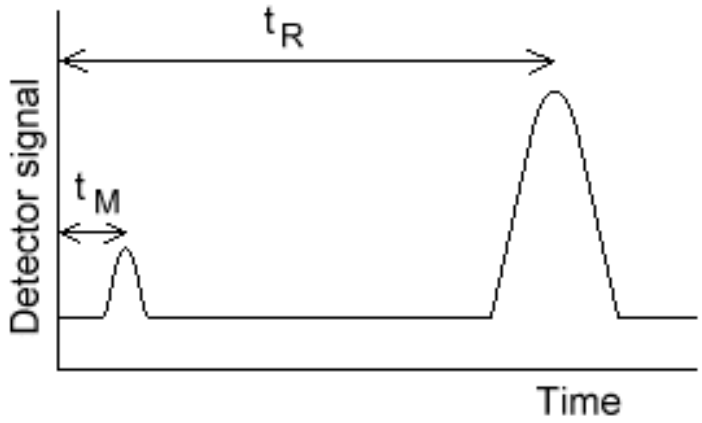
1. Adsorpciju supstancija na nepokretnu fazu,
2. Odjeljivanje adsorbiranih supstancija kontinuiranim protokom pokretne faze,
3. Sakupljanje odvojenih supstancija progresivnom eluacijom,
4. Kvalitativnu i kvantitativnu analizu odvojenih i sakupljenih tvari.

Izvođenje kromatografskog postupka može biti na koloni (stupcu) ili na ravnoj plohi (papir, tanki sloj). Tankoslojna kromatografija (engl. thin-layer chromatography) često se koristi u preliminarnim ispitivanjima prije postavljanja kolonskog odjeljivanja. Odjeljivanje se temelji na adsorpciji, razdjeljenju, ionskoj izmjeni, isključenju veličinom ili na kombinaciji tih mehanizama. Nepokretna faza je tanki sloj fino dispergiranih čestica nanesen na staklenu ili plastičnu ploču, a pokretna se faza kreće kapilarnim silama ili silom gravitacije uzduž sloja. Modifikacijom tankog sloja na ploči dobivena je tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (engl. high-performance thin-layer chromatography) čijom primjenom se postižu bolja i brža odjeljivanja. Plošna izvedba tankoslojne kromatografije je papirna kromatografija (engl. paper chromatography). Zasniva se na tome da se otopljene tvari nanesene u vrlo malim količinama na filter papir razdjeljuju između otapala kojim je impregniran filter papir (nepokretna faza) i otapala koje putuje po papiru (pokretna faza). Kolonske tehnike obuhvaćaju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvorsnosti (engl. high-performance liquid chromatography, HPLC) i plinsku kromatografiju (engl. gas chromatography, GC). Kod ovih tehnika sve sastavnice analita prelaze isti put, ali zbog interakcija s nepokretnom fazom izlaze iz kolone u različitim vremenima i detektiraju se izvan kolone na detektoru. Kromatografski postupci najčešće se provode u svrhu odjeljivanja, ukoncentriravanja, kvantitativne analize ili u preparativne svrhe (Luterotti, 2006).

1.2.1. Kromatografski parametri

Kromatogram je zapis analitičkog singala u funkciji vremena ili volumena eluata. Kod razvoja kromatografske metode postoji mnogo parametara koje treba optimizirati da bi dobili željene rezultate.Kako bi osigurali valjanost kromatografskih metoda, primjenjujemo određena ispitivanja prikladnosti sustava.

Glavni parametar kromatografskog pika je vrijeme zadržavanja (engl. retention time). Vrijeme potrebno da molekule pokretne faze ili nezadržavane molekule prođu kroz kolonu označavamo s $t_0$ili t_M^i i nazivamo ga "mrtvo vrijeme". Vrijeme zadržavanja, t_R je vrijeme potrebno pojedinoj sastavnici da nakon nanošenja uzorka stigne na detektor (Slika 2).



Slika 2: Vrijeme zadržavanja mobilne faze (t_M) i uzorka (t_R)

Vrijeme koje je potrebno sastavnici da prođe kroz kolonu ovisi o faktoru kapaciteta (k'). Opisuje brzinu gibanja tvari u koloni i pokazuje mjeru u kojoj se uzorak razdjeljuje (adsorbira) u nepokretnu fazu iz mobilne faze. Nazivamo ga i omjerom distribucije mase (Dm), a možemo ga mijenjati promjenom temperature u plinskoj kromatografiji i mijenjanjem sastava mobilne faze u tekućinskoj kromatografiji. Računamo ga prema jednadžbi (1) u kojoj je K_C ravnotežni omjer raspodjele, V_S volumen nepokretne faze, a V_M volumen pokretne faze.

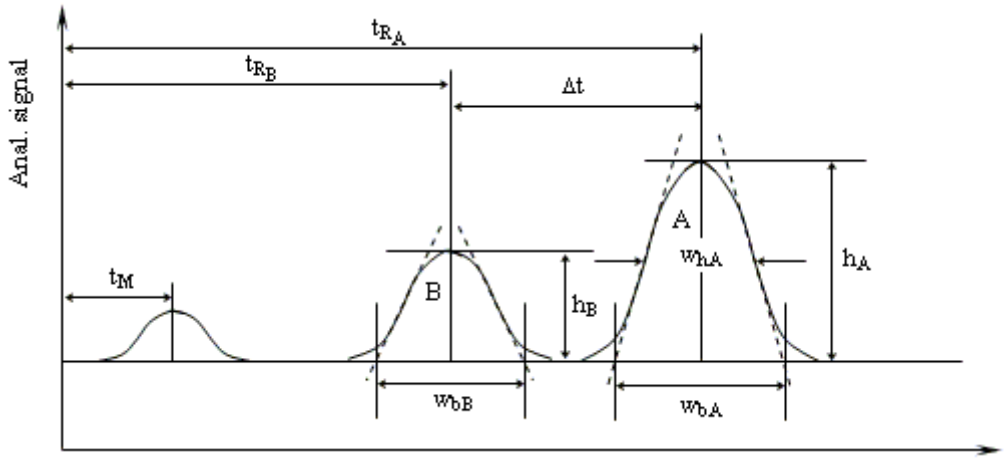
$$k' = \frac{količina\ tvari\ u\ stacionarnoj\ fazi}{količina\ tvari\ u\ mobilnoj\ fazi} = K_C \frac{V_S}{V_M} \quad (1)$$

Što su kromatografski pikovi širi u odnosu prema vremenu zadržavanja, manja je djelotvornost kolone. Djelotvornost kolone može se kvantitativno izraziti brojem i visinom teorijskih tavana. Teorijski tavan je područje u kromatografskom sustavu gdje se uspostavlja ravnoteža raspodjele sastavnice između nepokretne i pokretne faze. S obzirom da u realnom kromatografskom sustavu odijeljenih područja gdje se uspostavlja ravnoteža, teorijski tavan je hipotetska veličina. Broj tavana predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze. Djelotvornost kolone povećavamo smanjenjem visine tavana i povećanjem

broja tavana. Broj teorijskih tavana (N) računamo prema jednadžbi (2) u kojoj je t_R vrijeme zadržavanja sastavnice, a $W_{1/2}$ širini pika na polovici njegove visine. Visina tavana (H) računa se prema jednadžbi (3) gdje je L dužina kolone, a N broj tavana.

$$N = 5{,}54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad (2)$$

$$H = \frac{L}{N} \qquad (3)$$



Slika 3: *Kromatogram smjese sastavnica A i B.* (t_{RA}-*vrijeme zadržavanje supstancije A,* t_{RB}-*vrijeme zadržavanje supstancije B,* Δt- *razlika u vremenu zadržavanja supstancija A i B,* t_M- *vrijeme zadržavanja mobilne faze,* h_A- *visina pika supstancije A,* h_B- *visina pika supstancije B,* W_{bA}- *širina bazne linije pika supstancije A,* W_{bB}- *širina bazne linije pika supstancije B,* W_{hA}- *širina linije pika na polovici visine*)

Parametri procjene djelotvornosti kolone su razlučivanje (R_S), koeficijent selektivnosti (α), simetrijski faktor (A_S) te omjer vrha i podnožja pika (p/v). Razlučivanje kolone kvantitativna je mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dvije supstancije. Razlučivanje veće od 1,5 odgovara odjeljivanju dvaju susjednih pikova na baznoj liniji. Možemo ga povećati produženjem kolone ili povećanjem faktora kapaciteta (k'). Računa se prema

jednadžbi (4) gdje je t_{rB} vrijeme zadržavanja supstance B, t_{rA} vrijeme zadržavanja supstance A, a $W_{B\ 0,5}$ i $W_{A0,5}$ su širine pikova B i A na polovici njihove visine.

$$R_S = \frac{1.18\,(t_{rB} - t_{rA})}{W_{B\ 0.5} + W_{A\ 0.5}} \qquad (4)$$

Koeficijent selektivnosti (α) mjera je odjeljivanja dvije supstancije, pokazuje kako će dobro kromatografska kolona odijeliti dva sastojka. Računamo ga prema jednadžbi (5) gdje sut_{rA} i t_{rB} vremena zadržavanja supstanci A i B, t_0 je vrijeme zadržavanja pokretne faze, a k'_A i k'_B su faktori kapaciteta pikova A i B.

$$\alpha = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0} = \frac{k'_B}{k'_A} \qquad (5)$$

Simetrijski faktor (A_S) opisuje simetriju kromatografskog pika. Uzroci loše simetrije mogu biti: stavljanje previše uzorka na kolonu, razgradnja uzorka, jaka adsorpcija analita na aktivni dio stacionarne faze, loše „uhvaćen“ analit prilikom unosa na kolonu ili prevelik „mrtvi volumen“ u kromatografskom sistemu (Watson, 2012). Računa se prema jednadžbi (6) gdje je $w_{0.05}$ širina pika na 5% njegove visine, a d je udaljenost od maksimuma pika do vodećeg dijela pika mjerena na 5% njegove visine.

$$A_S = \frac{w_{0.05}}{2d} \qquad (6)$$

Omjer vrha i podnožja pika (p/v) važan je kod odjeljivanja onečišćenja. Može biti korišten kao kriterij prikladnosti sustava za srodne tvari kada razdvajanje baza pikova nije postignuto. Računa se prema jednadžbi (7) gdje je H_p visina kromatografske krivulje iznad bazne linije, a H_v visina najniže točke kromatografske krivulje iznad bazne linije.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v} \quad (7)$$

Parametri za kvantitativno određivanje su omjer signala i šuma (s/n, engl. *signal-to-noise*) i ponovljivost (RSD%).

Omjer signala i šuma (s/n) koristan je parametar priladnosti sustava. Računa se prema jednadžbi (8) gdje je H visina kromatografskog pika, a n je šum bazne linije.

$$s/n = \frac{2H}{n} \quad (8)$$

Ponovljivost (RSD%) se računa prema jednadžbi (9) gdje je s standardna devijacija, a $\bar{x}$ je aritmetička sredina.

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (9)$$

1.2.2. Kvantifikacija

Iako postoje mnoge vrste detektora za kvantitativnu analizu, glavna premisa je konstantna. Svaki detektor daje odgovor ovisno o količini analita. Jačina odgovora može ovisiti o samom analitu kao i o uzorku iz kojeg dolazi. Zbog toga se obično koriste standardi za kalibraciju odgovora instrumenta. Kromatogrami se mogu kvantitativno analizirati na nekoliko načina:

1. *Metoda s vanjskim standardom:* Koncentracija ispitivane tvari odredi se iz površine ili visine pripadajućeg pika uspoređenog s površinom ili visinom kromatografskog pika otopine standarda. Pod vanjskim standardom podrazumijeva se spoj, najčešće sam

analit, iz kojeg se pripremaju standardne otopine poznate koncentracije koje se mjere odvojeno od ispitivane tvari, ali pod identičnim uvjetima.

2. *Metoda s unutarnjim standardom:*Metoda u kojoj se poznata količina unutarnjeg standarda dodaje otopini uzorka i otopini poredbene tvari. Unutarnji standard odabere se tako da ne reagira s ispitivanim analitom, da je stabilan i da nema onečišćenja s istim vremenom zadržavanja kao i onečišćenja analita. Koncentracija analita određuje se usporedbom omjera površine ili visine pika analita i unutarnjeg standarda s omjerom površine ili visine pika otopine standarda i unutarnjeg standarda. Metoda se koristi u slučajevima kada je osjetljivost metode promjenjiva s vremenom, kada je moguć gubitak uzorka i kod nestabilnog rada instrumenta.
3. *Metoda kalibracije:*Napravi se koncentracijski niz poredbenih otopina. Izračuna se kalibracijska funkcija iz odnosa izmjerene površine ili visine pika i pripadajuće koncentracije. Koncentracija analita izračuna se pomoću inverzne funkcije iz izmjerenog signala analita.
4. *Metoda ukupne površine:* Postotak sadržaja izračuna se iz omjera površine pika određivane tvari i ukupne površine svih pikova. Računa se prema jednadžbi (10) gdje je A_X površina pika, a f faktor odgovora. Faktor odgovora relativna je veličina koja predstavlja odnos površine pika ispitivane tvari prema površini pika poredbene tvari uz propisane uvjete. Kod navedene metode sve sastavnice uzorka moraju eluirati, odgovor detektora mora biti linearan prema koncentraciji i zahtijeva propisanu granicu za površinu pikova koji se ne uključuju u računanje ukupnog zbroja površine svih pikova.

$$c_x = \frac{A_x/f_x}{\sum A_i/f_i} \times 100 \qquad (10)$$

5. *Metoda standardnog dodatka:* Upotrebljava se u slučajevima znatnog utjecaja matrice uzorka na određivanje analita. Smanjuje se pogreška od interferencija jer se standard i analit nalaze u istoj matrici. Alikvotima otopine uzorka doda se otopina standarda u rastućim koncentracijama. Iz odnosa izmjerene površine ili visine pika i pripadajuće koncentracije dobije se kalibracijska funkcija. Ekstrapolacijom pravca očita se vrijednost koncentracije analita u uzorku.

1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

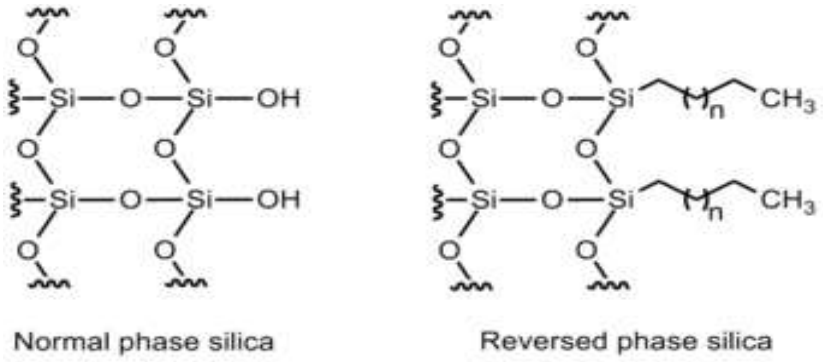
HPLC je tehnika najčešće korištena za kvantifikaciju lijeka u formulacijama. Tekuća mobilna faza prolazi pod tlakom kroz kolonu od nehrđajućeg čelika koja sadrži čestice stacionarne faze promjera 3-10 μm (1.7 μm kod tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti, UPLC).

Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze:

1. *Razdioba*: odjeljivanje nepolarnih i slabo polarnih tvari
2. *Adsorpcija***:** odjeljivanje polarnih tvari
3. *Ionska izmjena:*odjeljivanje tvari ionskog karaktera
4. *Raspodjela prema veličini čestica:*smjesa tvari s razlikama u veličini čestica
5. *Stereokemijske interakcije:*odjeljivanje enantiomera (kiralna kromatografija)

Najzastupljenija, razdijelna kromatografija, dijeli se na kromatografiju normalnih i obrnutih faza, a 80% svih odijeljivanja čini kromatografija obrnutih faza. Kod kromatografije normalnih faza, nepokretna faza je polarna (silikagel), a mobilna faza je manje polarna (heksan, diklormetan, metanol, izopropanol). U kromatografiji obrnutih faza, nepokretnu fazu čini kemijski modificirana nepolarna površina silikagela, a mobilna faza je polarna (voda, acetonitril, tetrahidrofuran).

Stacionarna faza najčešće se sastoji od silikagela ili kemijski modificirane površine silikagela (slika 4) . Silikagel se modificira reakcijom njegovih –OH skupina na površini i organoklorsilana. Najzastupljenije modifikacije, koje čine 80% farmaceutskih analiza, su oktadecilsilil (ODS) silikagel (C18) i oktilsilil silikagel (C8). Opseg do kojeg je supstancija zadržana primarno ovisi o polarnosti (u slučaju silikagela), odnosno lipofilnosti (u slučaju ODS-silikagela) nepokretne faze.

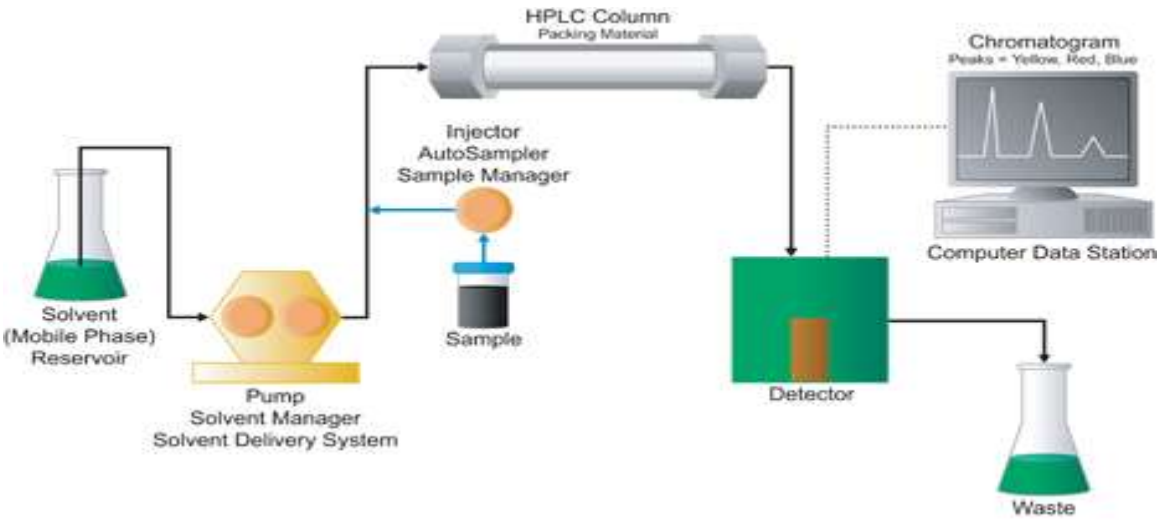


***Slika 4*:** Shematski prikaz normalno fazne i obrnuto fazne nepokretne faze.

Osim nepokretne faze, na vrijeme zadržavanja utječe i priroda mobilne faze. Što je mobilna faza polarnija, supstancijaće se prije eluirati s kolone punjene silikagelom, a što je mobilna faza lipofilnija, supstancija će se brže eluirati na obrnuto-faznoj koloni. Postoje dva načina eluiranja: izokratno i gradijentno. Kod izokratnog eluiranja sastav mobilne faze je cijelo vrijeme konstantan. Njegova djelotvonost često nije dovoljna pa se koristi gradijentno eluiranje. U tom slučaju sastav mobilne faze mijenja se kontinuirano ili skokovito čime se postiže bolje odjeljivanje sastavnica i kraće vrijeme eluiranja. Kako ne bi došlo do začepljenja kolone ili uređaja općenito, pokretna faza ne smije sadržavati čestice veće od 0,45 μm (HPLC), odnosno 0,22 μm (UPLC). Zbog toga se moraju koristiti kemikalije visokog (kromatografskog) stupnja čistoća, a po potrebi se mobilne faze filtriraju odgovarajućim filterima.

1.3.1. Uređaj za tekućinski kromatografiju visoke djelotvornosti

Glavni dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (slika 5) su: spremnik za pokretnu fazu, pumpa, sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor, spremnik za otpad i uređaj za analitički zapis.



Slika 5: Shematski prikaz uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.

Spremnik za pokretnu fazu sadrži otapalo. Pumpa pod visokim pritiskom generira protok mobilne faze, najčešće u redu veličine mililitri u minuti. Kvalitetu pumpe određuje koliko ravnomjeran i reproducibilan protok može osigurati. Fluktuirajući protok može stvoriti šum na detektoru koji može prikriti slabi signal. Otapalo prolazi kroz električni ulazni ventil koji je sinkroniziran s velikim klipom kako bi se stvaranje zračnih mjehurića smanjilo na najmanju moguću mjeru. Sustav za unošenje uzorka sposoban je injektirati uzorak u mobilnu fazu kontinuiranog protoka koja ga donosi na kolonu.Detektor je potreban kako bi se odvojene sastavnice vidjele dok se eluiraju iz kolone. Mobilna faza nakon prolaska kroz detektor može ići u spremnik za otpad ili se može sakupljati.

Detektor je spojen na računalni sustav za obradu podataka koji pomoću električnog signala generira grafički zapis na ekranu (kromatogram). Idealni detektor, bilo koje vrste, osjetljiv je na niske koncentracije svakog analita, osigurava linearan odgovor, ne uzrokuje širenje pikova, nije osjetljiv na promjene temperature i sastav pokretne faze. Postoji nekoliko vrsta detektora: UV/Vis detektor, ELS (engl. evaporative light-scattering) detektor (detktor raspršenja svjetla u uparenom uzorku), detektor nabijenog aerosola, elektrokemijski detektor, detektor indeksa loma, fluorescentni detektor. Najčešće korišteni HPLC detektor je UV/Vis detektor koji može snimati jednu odabranu valnu duljinu ili više njih, cijeli spektar od 190-800 nm. Noviji sustavi koriste niz fotodioda (engl. diode array detector, DAD) kako bi snimili cijeli UV/Vis spektar svake sastavnice. Koristi se za analizu uzoraka koji apsorbiraju ultraljubičasto svjetlo različitom jačinom. Također, koristi se i za identifikaciju prema UV spektru u slučajevima gdje se kromatografske krivulje sastavnica preklapaju, ali imaju

različiti UV spektar. UV detektor dobar je izbor kod gradijentnog ispiranja s otapalima koja ne apsorbiraju, odnosno potrebno je znati „cut-off“ valnu duljinu ispod koje otapala prejako apsorbiraju. Kako bi se napravila strukturna karakterizaciju analita, kroristi se spregnuta tehnika tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS).

1.4. Onečišćenja u lijekovima

Onečišćenje je bilo koji sastojak lijeka koji nema kemijski identitet definiran kao ljekovita tvar ili kao pomoćna tvar u farmaceutskom proizvodu (ICH Q6A). Onečišćenja ne moraju biti povezana samo s ljekovitom tvari ili sastojcima koji se koriste pri formulaciji proizvoda, ona mogu biti dovedena u lijek prilikom proizvodnog procesa ili u kontaktu s ambalažom. Nemaju terapijsku vrijednost i potencijalno su štetna i zbog toga ih je potrebno kontrolirati. Najveću pažnju treba posvetiti onečišćenjima koja su farmakološki aktivna, toksična, onima koja mijenjaju aktivnost ljekovite tvari i utječu na njenu stabilnost te onečišćenjima koja mijenjaju analitičke rezultate.

Potencijalna onečišćenja (WHO, 2011):

1. Ostaci polaznih sirovina aktivne tvari
2. Ostaci međuprodukata
3. Onečišćenja u polaznim sirovinama
4. Reagensi, otapala, katalizatori
5. Reakcijski nusprodukti
6. Produkti razgradnje
7. Produkti nastali interakcijom aktivne tvari i pomoćnih tvari
8. Produkti nastali interakcijom sa spremnikom

Najviše potencijalnih onečišćenja nastaje tijekom pripreme aktivne tvari i naknadno njene razgradnje. Fokus kod gotovih farmaceutskih proizvoda praćenje je razgradnih produkata i ponekad interkacija aktivne tvari s pomoćnima ili interakcija između dvije aktivne kod kombiniranih pripravaka.

1.4.1. Vrste onečišćenja

ICH smjernice dijele onečišćenja u 3 kategorije: organska, anorganska i ostatna otapala.

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa i/ili za vrijeme čuvanja supstance. Mogu biti identificirana i neidentificirana, hlapljiva i nehlapljiva, a uključuju polazne sirovine, nusprodukte, međuprodukte, razgradne produkte, reagense, ligande i katalizatore. Anorganska onečišćenja najčešće nastaju kao rezultat proizvodnog procesa. Obično su poznata i identificirana, a uključuju reagense, ligande, katalizatore, teške metale, anorganske soli i ostale materijale (npr. filteri, ugljen). Ostatna otapala su organske i anorganske tekućine koje se koriste ili nastaju u postupku proizvodnje.

Prema Europskoj farmakopeji onečišćenja se dijele na specificirana onečišćenja i ostala onečišćenja koja se mogu dokazati. Specificirana onečišćenja poznata su onečišćenje i dijele se na identificirana koja su karakterizirana kemijskom strukturom i neidentificirana koja su definirana isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvima (npr. kromatografsko vrijeme zadržavanja). Ostala onečišćenja koja se mogu dokazati nisu detektirana niti u jednom ispitivanom uzorku tijekom izrade monografije, ali su ograničena ispitivanjima u Europskoj farmakopeji. (Nigović, 2013).

Definirane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja prikazana su u Tablici 2. Onečišćenja koja prelaze granicu za izvještavanje zahtijevaju izjavu o onečišćenjima s točnim postotkom i metodom analize. Onečišćenja koja prelaze granicu identifikacije potrebno je strukturno karakterizirati, a za onečišćenja koja prelaze granicu za kvalifikaciju potrebno je procijeniti biološku sigurnost (Nigović, 2013). Identifikacija onečišćenja koja su ispod granice za identifikaciju obično nisu potrebna. Ipak, potrebno je razviti analitičke metode za onečišćenja za koja se očekuje da su izuzetno potentna, toksična i farmakološki aktivna i pri koncentracijama manjim od onih koje zahtjevaju identifikaciju. Propisane granice onečišćenja ne odnose se na pomoćne tvari, biološke i biotehnološke proizvode, peptide, oligonukleotide, radiofarmaceutike, fermentacijske i polusintetske proizvode, biljne proizvode i produkte iz biljnih i životinjskih izvora (Nigović, 2013).

U Tablici 3 prikazane su granice onečišćenja u dozirnim oblicima gotovog farmaceutskog proizvoda prema ICH smjernicama. Smjernice se odnose samo na onečišćenja u novim ljekovitim proizvodima koja su klasificirana kao produkti razgradnje ljekovite supstance ili produkti reakcije ljekovite supstancije s pomoćnim tvarima i/ili primarnim pakiranjem. Smjernice se ne odnose na strana onečišćenja koja ne bi trebala nastati i vezana su uz dobro proizvođačku praksu (engl. Good manufacturing practice, GMP), polimorfne oblike i enantiomerna onečišćenja.

Tablica 2: Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja prema ICH smjernicama (ICH, 2006).

Najviša dnevna doza	**Granica za izvještavanje**	**Granica za identifikaciju**	**Granica za kvalifikaciju**
≤ 2 g/dan	0,05%	0,10% ili 1,0 mg/dan (ovisno što je niže)	0,15% ili1,0 mg/dan (ovisno što je niže)
> 2 g/dan	0,03%	0,05%	0,05%

Tablica 3: Granice razgradnih produkata u novim farmaceutskim proizvodima (*UDU-ukupni dnevni unos).

Maksimalna dnevna doza	**Granica za izvještavanje**
≤ 1 g	0,1 %
> 1 g	0,05 %
Maksimalna dnevna doza	**Granica za identifikaciju**
< 1 mg	1% ili 5 µg UDU* (ovisno što je niže)
1 mg – 10 mg	0,5% ili 20 µg UDU (ovisno što je niže)
> 10 mg – 2 g	0,2% ili 2 mg UDU (ovisno što je niže)
> 2 g	0,10%
Maksimalna dnevna doza	**Granica za kvalifikaciju**
< 10 mg	1% ili 50 µg UDU (ovisno što je niže)
10 mg – 100 mg	0,5% ili 200 µg UDU (ovisno što je niže)
> 100 mg – 2 g	0,2% ili 3 mg UDU (ovisno što je niže)
> 2 g	0,15%

1.5. Kvaliteta ugrađena u dizajn

Cilj farmaceutskog razvoja je dizajnirati kvalitetni proizvod i njegov proces proizvodnje kako bi se konstantno isporučivao proizvod željene kakvoće. Kvaliteta ugrađena u dizajn (engl. Quality by Design, QbD) sistematski je pristup razvoju koji počinje predefiniranim ciljevima i naglašava razumijevanje proizvoda i procesa te kontrolu, a temelji se na znanstvenim dokazima i procjeni rizika kvalitete. (ICH, 2009) QbD zahtijeva identifikaciju svih kritičnih formulacijskih atributa i procesnih paramatera kao i određivanje opsega do kojeg svaka varijacija može utjecati na kvalitetu konačnog proizvoda.

QbD ima 4 ključne komponente:

1. Definiranje dizajna proizvoda

U ovom koraku određuje se ciljni profil kvalitete metode (engl. Quality Target Method Profile, QTTP) i identificiraju se svi kritični parametri metode. (engl. Critical Method Attributes, CMA).

2. Procjena rizika

Ispituju se multidimenzijske kombinacije i interakcije materijalnih atributa i procesnih parametara kako bi se osigurala sigurnost kvalitete. Kritične varijable u metodi (engl. Critical method variable, CMV) se identificiraju tako da se odrede granice do kojih varijacije u metodi mogu utjecati na kvalitetu metode.

3. Dizajn eksperimenta (engl. Design of experiments, DoE)

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

4. Kontrolna strategija

Omogućuje cjeloviti pregled o tome kako je osigurana kvaliteta proizvoda.

Za farmaceutsku industriju, sigurnost pacijenta i osiguranje kvalitete proizvoda imaju primarnu važnost, a ti ciljevi se postižu QbD pristupom. Druge prednosti QbD-a su znanstveno razumijevanje farmaceutskih procesa i metoda, procjena rizika temeljena na znanstvenim činjenicama, definirani kritični parametri kvalitete i analizirani njihovi učinci na konačnu kvalitetu proizvoda. Također, poboljšana je robusnost metoda i procesa, a financijski benefiti u poslovanju djeluju kao pokretačka snaga u implementaciji QbD pristupa. (Sangshetti i sur., 2014)

1.3.1. Kvaliteta ugrađena u dizajn u razvoju analitičke metode

Kvaliteta ugrađena u dizajn je metodologija pomoću koje se učinkovito mogu dobiti kvantitativna procesna znanja (engl. process knowledge). Primijenjeno na tekućinskoj kromatografiji, razvoj metode na tekućinskom kromatografu je proces (engl. process), a kvantitativno određivanje kako kontrolirani parametri utječu na učinkovitost kromatografije je znanje (engl. knowledge). (Turpin, S-matrix, 2012)

Razvoj analitičke metode obično se provodi u dvije faze. U prvoj fazi radi se pregled kolona (engl. column screening) u kojem se odabire kolona s najboljom selektivnosti. Druga faza uključuje provođenje eksperimenata s ostalim instrumentalnim parametrima za koje se smatra da utječu na razdvajanja sastavnica. Zajednički cilj obje faze je pronaći najbolje postavke koje osiguravaju optimalne rezultate kromatografije. U tradicionalnom pristupu razvoju metode pojedinačno su se mijenjali pojedini parametri, a svi ostali su bili konstantni. Nedostatak tog pristupa je što se parametri koji najviše utječu na djelotvornost kromatografije (npr. kolona, pH, mobilna faza) teže i sporije prilagode. Noviji uređaji omogućuju lakše variranje tih parametara jer istodobno mogu koristiti više kolona i kanala za mobilne faze. U QbD pristupu varira se kombinacija različitih parametara kroz niz eksperimenata pomoću kojih se opsežno ispituje područje eksperimenta. Dobiveni podaci statistički se obrađuju, no često dolazi do gubitka podataka u ključnim kromatogafskim parametrima zbog velikih promjena u pikovima i zajedničkog eluiranja sastavnica uzorka. Zbog toga se odabir najboljeg kromatograma često svodio na vizualan pregled. Taj problem može se riješiti kombinacijom metode dizajna eksperimenta s tehnikom *Trend Responses*™. Tehnika daje podatke iz kojih se mogu kvantitativno odrediti varijabilni učinci djelotvornost kromatografije bez direktnog praćenja pikova. U svrhu dizajna eksperimenata i obrade podataka korišten je komercijalni software Fusion AE™.

2. Obrazloženje teme

Pregabalin je lijek koji je indiciran u slučajevima neuropatske boli, epilepsije i generaliziranih anksioznih poremećaja. Lijek je prisutan u nekoliko različitih doza uglavnom u obliku kapsula. Na tržištu postoji pod različitim trgovačkim imenima od nekoliko proizvođača, između ostalih i Pregabalin Pliva tvrde kapsule koje su korištene u eksperimentima.

Kako bi korištenje lijeka bilo sigurno, potrebno je poznavati farmakološko-toksikološki profil lijeka, ali i onečišćenja koja se u lijeku nalaze i mogući su uzročnik neželjenih učinaka. Zbog toga su propisane granice za sve vrste onečišćenja i one se kontroliraju.

Analiza onečišćenja u kapsulama pregabalina već se radi HPLC tehnikom, ali pojavom nove i brže UPLC tehnike javlja se potreba za razvojem nove metode kojom bi se skratilo vrijeme analize. U razvoju UPLC metode koristit će se princip kvalitete ugrađene u dizajna (QbD) s ciljem bržeg razvoja metode, smanjenjem potrošenih resursa i razvoja robusne metode.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

U izradi eksperimenta korišten je standard pregabalina. Metanol i acetonitril, koji su korišteni za pripremu mobilne faze i kao diluenti, nabavljeni su od Mercka (SAD), a fosfatni i acetatni pufer od Kemike (Hrvatska). Metanol i acetonitril bili su kromatografskog stupnja čistoće, a korištena voda bila je pročišćena uređajem Evoqua water technologies.

3.2. Radni instrumenti

Eksperimenti su provedeni na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti ACQUITY® UPLC H class system (Waters, Velika Britanija) s kvarternom pumpom ACQUITY® UPLC Quaternary Solvent Manager, automatskim dodavačem uzoraka ACQUITY® UPLC Sample Manager, odjeljkom za kolonu ACQUITY® UPLC Column Manager i fotoelektričnim detektorom s diodnim nizom (engl. *photodiode array*, PDA) ACQUITY® UPLC Photodiode Array Detector.

Dobiveni kromatogrami obrađeni su u programu Empower (Waters, Velika Britanija), a rezultati pomoću programskog paketa Fusion (S-matrix). Dizajn eksperimenata radi se u Fusionu nakon čega se sekvence generirane u Fusionu prebacuju u Empower i provode se analize. Nakon toga se dobiveni kromatogrami uvoze nazad u Fusion gdje se obrađuju.

3.3. Metode

3.3.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja od pregabalina

Da bi koristili prikladnu pH vrijednost pufera s ciljem najboljeg odjeljivanja sastavnica, korišten je programski paket Marvin Beans (ChemAxon, Mađarska). U programu su nacrtane kemijske strukture onečišćenja i aktivne tvari pregabalina, a na temelju svake strukture program računa koeficijent distribucije pojedine tvari (log D) i daje numeričke i grafičke podatke o optimalnom pH za odjeljivanje sastavnica.

3.3.2. Određivanje optimalnog pufera za odjeljivanje sastavnica

Na temelju rezultata dobivenih u programskom paketu Marvin Beans (metoda 3.2.1.) odabrane su najpogodnije pH vrijednosti za pufere. Iz tabličnih podataka odabrana su 3 najpogodnija pufera na temelju njihovog preporučenog raspona pH vrijednosti u kojem djeluju. Odabrani su hidrogenfosfatni pufer (K_2HPO_4), acetatni pufer ($NaCH_3COOH$), i dihidrogenfosfatni pufer ($NH_4H_2PO_4$). Puferi su redom imali pH vrijednosti:2.5, 4.3 i 6.1. Kao i kod odabira kolone, u Fusionu se kreira eksperiment koji za sve pufere kreira jednake metode s različitim uvjetima. Podaci se statistički obrade i na temelju zadanih parametara (USP-rezolucija, „USP-tailing“) odabere se optimalan pufer.

3.3.3. Određivanje optimalne kolone za odjeljivanje sastavnica

Iz literaturnih podataka smo zaključili da su u našem slučaju za razvoj metode najpogodnije kolone C-8 i C-18. Zato smo odabrali tri C-18 i jednu C-8 kolonu koje smo stavili u uređaj. Fusion generira metode i sekvence na temelju statističkog dizajna eksperimenta, a prema unaprijed zadanim kriterijima. Podaci se statistički obrade i na temelju zadanih parametara odabere se optimalna kolona. Traženi zahtjevi su čim veći broj pikova s USP-rezolucijom iznad 1,50 i čim više pikova s USP-tailingom (simetrijski faktor) ispod vrijednosti 2,00.

3.3.4. Provjera linearnosti metode za određivanje onečišćenja

Pripreme se temeljne standardne otopine („stock solution“) u koncentraciji 0,25 mg/mL za aktivnu tvar (pregabalin) i za svako pojedino onečišćenje. Iz temeljne standardne otopine pripremi se niz razrijeđenih otopina kako je prikazano u tablici (4). Svi pripremljeni uzorci analiziraju se prethodno određenom metodom. Za svaki rezultat napravi se grafički prikaz odnosa koncentracije i površine iz kojega se odredi koeficijent korelacije, nagib pravca i izračuna se faktor odgovora za svako razrjeđenje (RF-„ response factor“) prema jednadžbi (11). Iz svakog faktora odgovora izračuna se relativni faktor odgovora u odnosu na srednje razrijeđenje prema jednadžbi (12). Farmakopejski zahtjev je da relativni faktor odgovora bude između 80% i 120% za 0,05%-tne i 0,1%-tne otopine, a za 0,2%, 0,5% i 1%-tne otopine između 90% i 110%.

$$RF = \frac{Površina\ pika}{Koncentracija\ uzorka} \qquad (11)$$

$$Rel.RF = \frac{RF\ (svakog\ razrjeđenja)}{RF\ (srednjeg\ razrjeđenja)} \text{x} 100 \qquad (12)$$

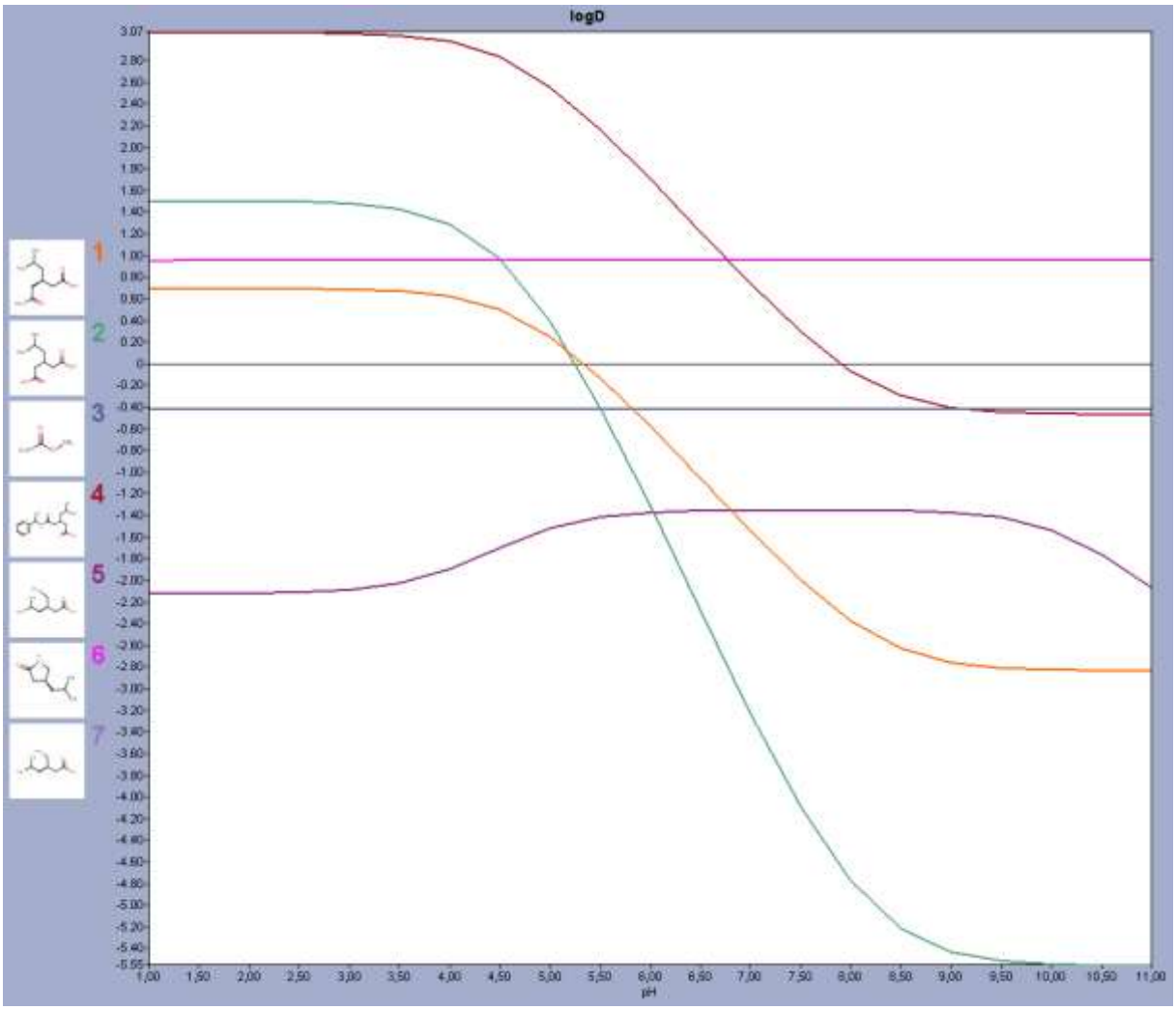
Tablica4: Pripremljene razrijeđene otopine za provjeru linearnosti.

Oznaka	% koncentracije u odnosu na konc. uzorka (5mg/mL)	C (mg/mL)
L1	**1%**	**0,05**
L2	**0,5%**	**0,025**
L3	**0,2%**	**0,01**
L4	**0,1%**	**0,005**
L5	**0,05%**	**0,0025**

4. Rezultati

4.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja pregabalina

Korištenjem programskog paketa Marvin Beans dobiven je graf koji prikazuje ovisnost koeficijenta distribucije (logD) pregabalina i njegovih onečišćenja te pH vrijednosti (slika6). Za daljnji razvoj metode odabrane su tri pH vrijednosti(2.5, 4.3 i 6.1), a najveća razlika u logD vrijednostima je u pH području ispod 3,5.



Slika6: Grafički prikaz logD vrijednosti pregabalina i onečišćenja u ovisnosti o pH vrijednosti

4.2. Određivanje optimalnog pufera za odjeljivanje sastavnica

Analizirani su rezultati odjeljivanja sastavnica s 3 različita pufera: acetatni pufer ($NaCH_3COOH$), hidrogenfosfatni pufer (K_2HPO_4) i dihidrogenfosfatni pufer ($NH_4H_2PO_4$). Parametri koji su bili konstante u eksperimentu isti su kao i u prethodnoj metodi 4.3. Programski paket Fusion je kreirao 27 različitih uvjeta u kojem je vrijeme gradijenta varirano između 15 i 45 minuta, a temperatura kolone između 30°C i 50°C. Program je izračunao optimalnu metodu čiji su parametri prikazani u tablici 5.

Tablica5: Varijable izračunate za optimalnu metodu

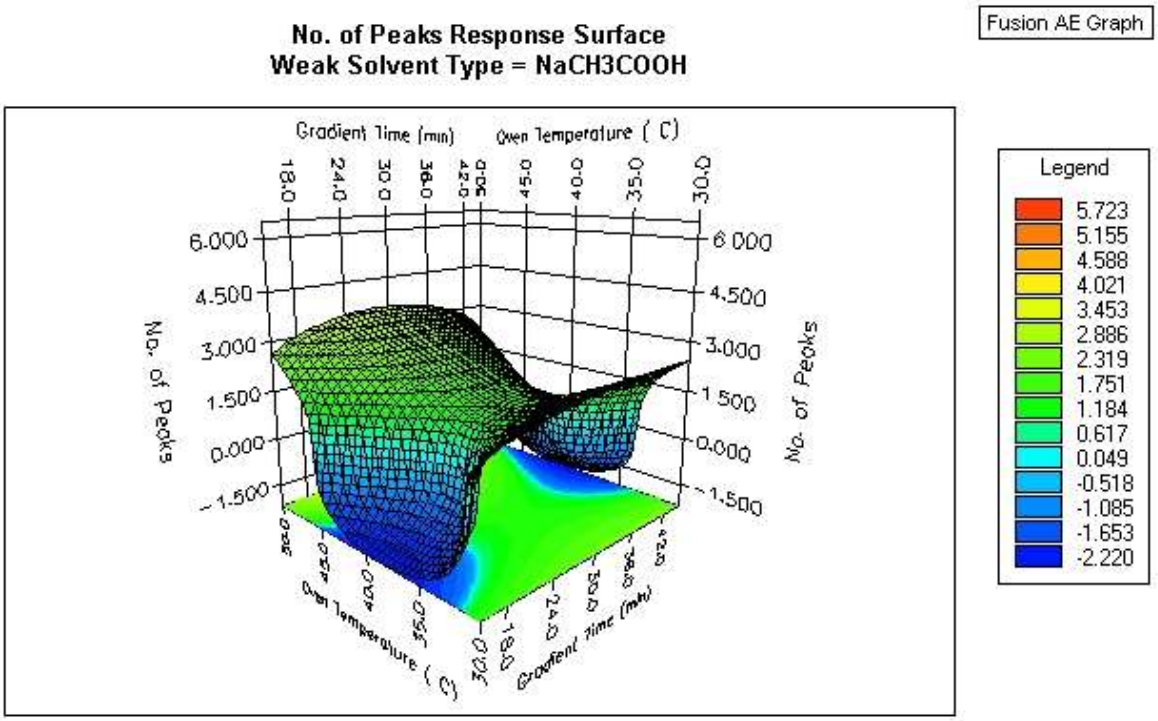
Ime varijable	**Optimalna vrijednost**
Vrijeme gradijenta	21,0 min
Temperatura kolone	30°C
Vrsta pufera	Dihidrogenfosfatni pufer ($NH_4H_2PO_4$)

U tablici 6 prikazane su predikcijske vrijednosti za prethodno zadane kriterije. Broj pikova treba biti čim veći (cilj je 6), a USP-rezolucija iznad 1,50 za čim veći broj pikova.

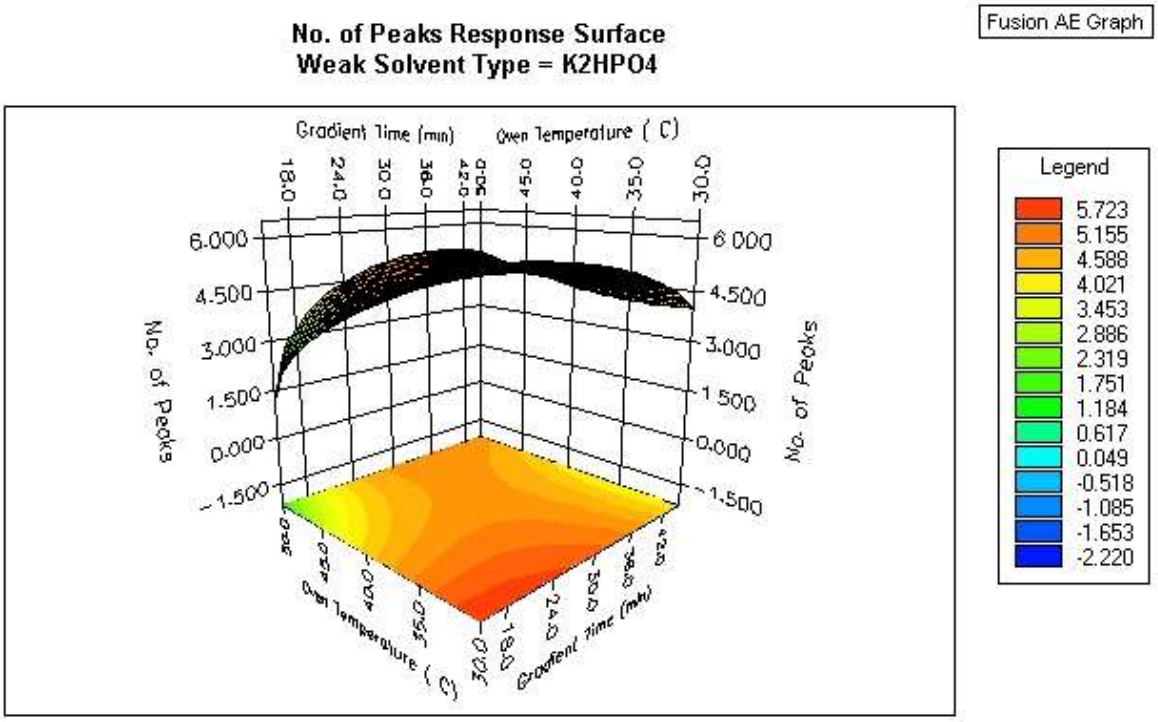
Tablica 6: Predikcijske vrijednosti za broj pikova i USP-rezoluciju.

Ime varijable odgovora	**Cilj**	**Predikcijski rezultat**	**-2 sigma konfidencijski limit**	**+2 sigma konfidencijski limit**
Broj pikova	Maksimizirati	6.005	5.890	6.115
Broj pikova s USP-rezolucijom iznad 1,50	Maksimizirati	5.005	4.925	5.082

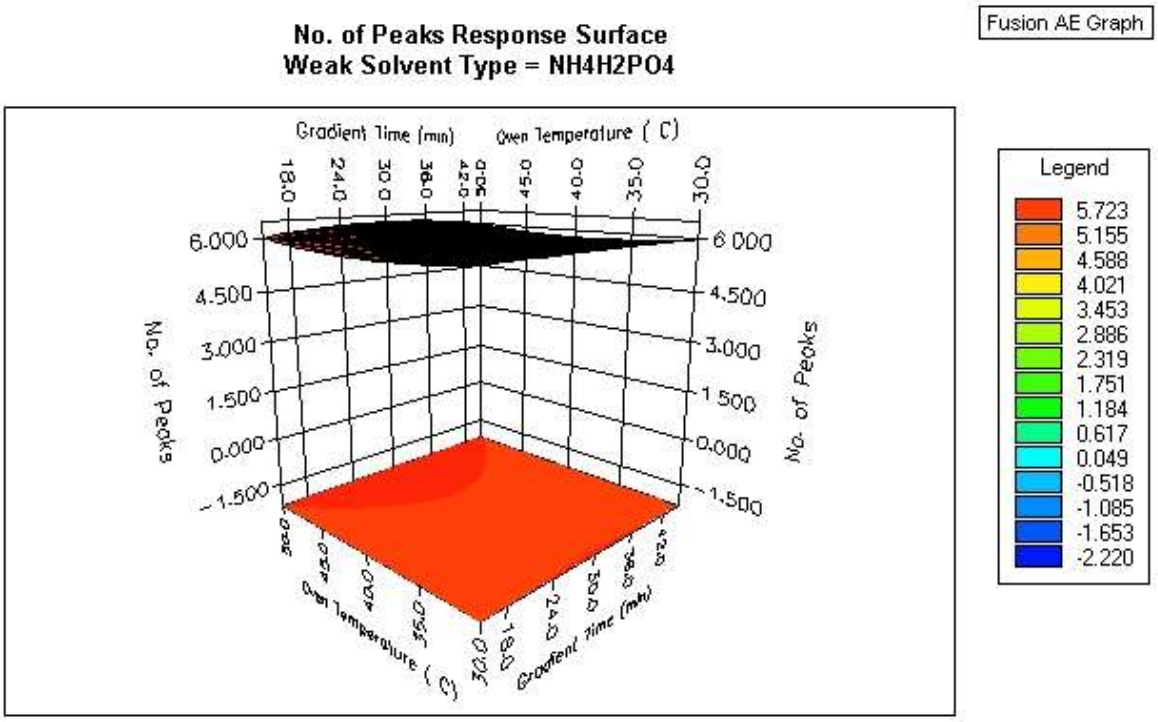
Grafički su prikazane ovisnosti temperature kolone i vremena gradijenta o broju pikova za svaki pufer (slika 7, slika 8, slika 9).



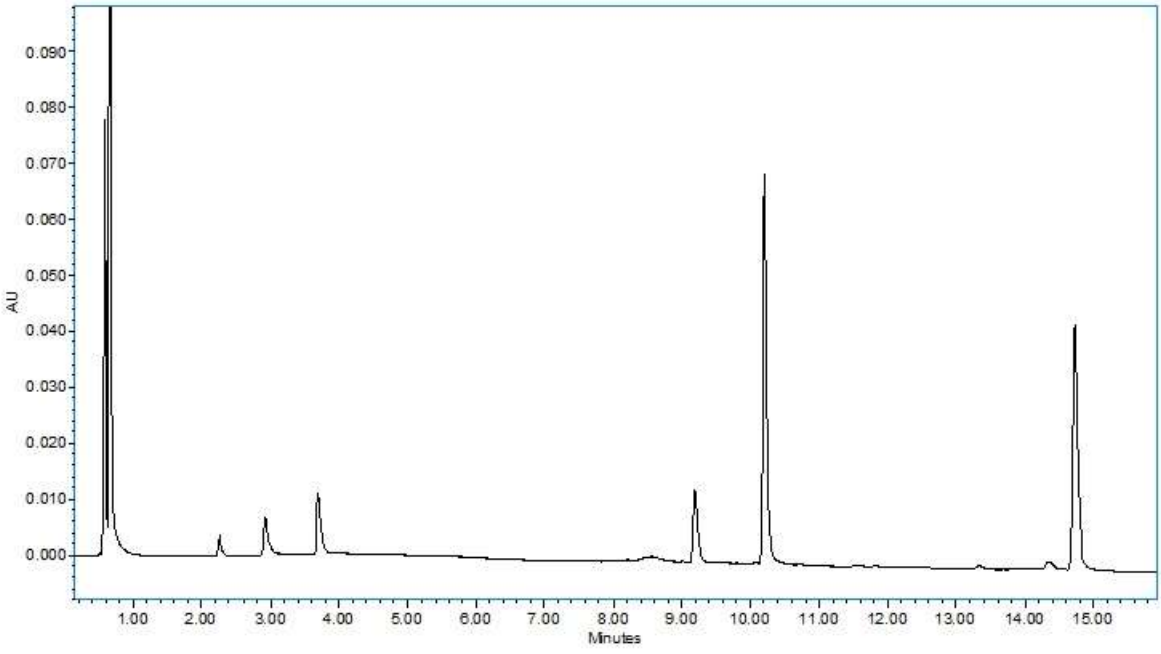
Slika7: Grafički prikaz rezultata za acetatni pufer.



Slika 8: Grafički prikaz rezultata za hidrogenfosfatni pufer.



Slika 9: Grafički prikaz rezultata za dihidrogenfosfatni pufer.



Slika 10: Kromatogram odjeljivanja aktivne sastavnice i onečišćenja s dihidrogenfosfatnim puferom kao mobilnom fazom (vrijeme gradijenta 30 min, temperatura kolone 40°C).

4.3. Određivanje optimalne kolone za odjeljivanje sastavnica

Fusion eksperiment analizirao je rezultate odjeljivanja na 4 kolone: Acquity UPLC BEH C18, Acquity UPLC CSH C18, Fortis C8 i Fortis C18. Vrijeme gradijenta varirano je između 15 i 45 minuta, temperatura između 30°C i 50°C. Tablica 7 prikazuje podatke u eksperimentu koji su konstante.

Tablica 7: Konstante u eksperimentu za određivanje optimalne kolone.

Ime konstante	**Vrijednost**
Brzina protoka	0,400 mL/min
Volumen injektiranja	5,0 µL
Valna duljina	210 nm
Vrijeme ekvilibracije	3,0 min
Početno vrijeme čekanja	1,0 min
Početni udio organske faze	5,0%
Konačno vrijeme čekanja	1,0 min
Konačni udio organske faze	95,0 %
Vrijeme podizanja do pranja	0,5 min
Vrijeme pranja	4,0 min
Udio organske faze kod pranja	99,0 %
Vrijeme spuštanja nakon pranja	0,5 min
Vrijeme re-ekvilibracije	3,0 min
Udio organske faze u re-ekvilibraciji	5,0%

Program je izradio 33 različita eksperimenta, a neki su eksperimenti ponavljani u svrhu kasnije statističke obrade. Program je izračunao optimalnu metodu koja je prikazana u tablici 8 i statističkom obradom je izračunao predikcijske vrijednosti za postavljene zahtjeve u metodi (tablica 9). Na slici 11 je kromatogram odjeljivanja onečišćenja i aktivne sastavnice na Fortis C-18 koloni za koju je program izračunao da je najbolja od 4 ispitane kolone. Slika

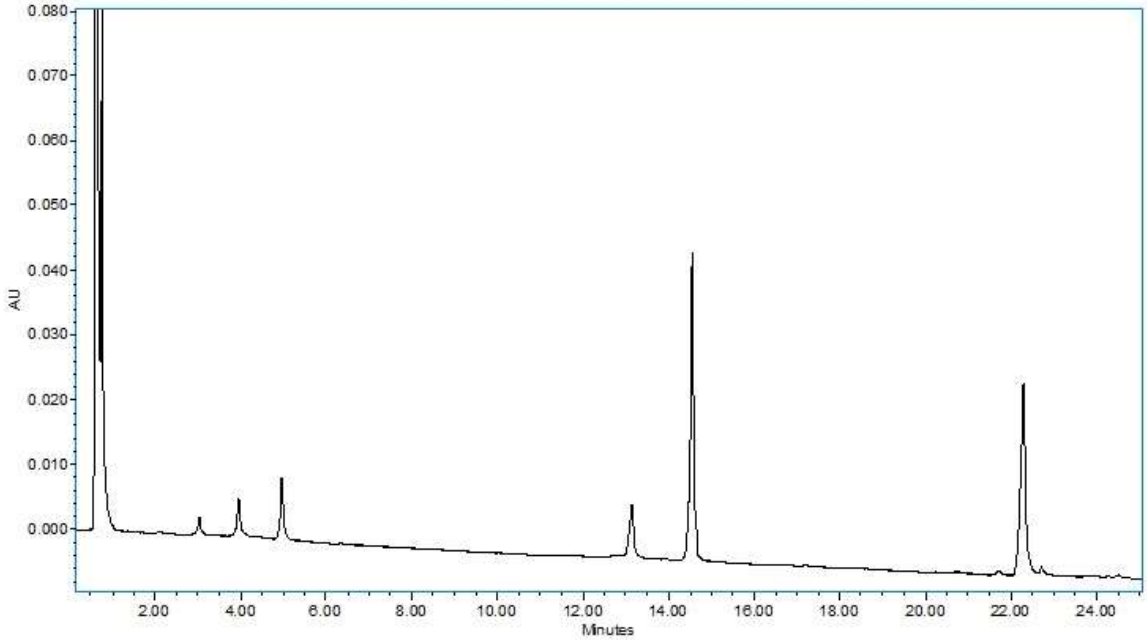
12 grafički prikazuje kako ovisi broj pikova s USP-rezolucijom većom od 1,5 o vremenu gradijenta i temperaturi kolone spregnuto za sve 4 kolone zajedno, a na slici 13 je grafički prikaz ovisnosti broja pikova s USP-tailingom manjim od 2 o istim parametrima.

Tablica 8: Varijable izračunate za optimalnu metodu.

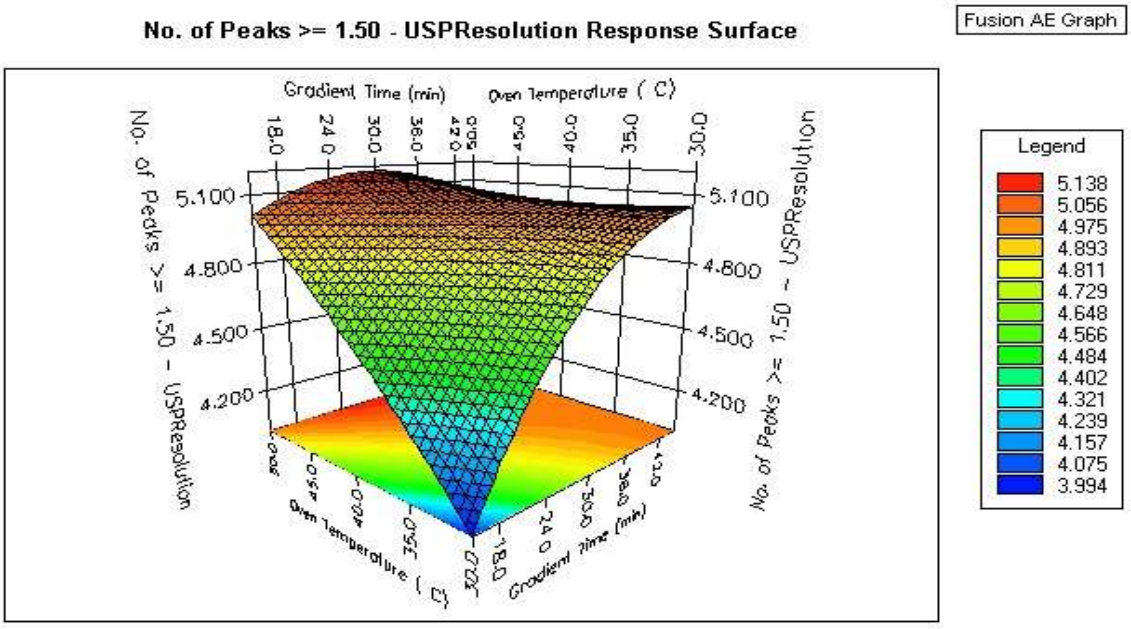
Ime varijable	**Optimalna vrijednost**
Vrijeme gradijenta	45,0 min
Temperatura kolone	33,5°C
Tip kolone	Fortis C-18

Tablica 9: Predikcijski rezultati za USP-rezoluciju i USP-tailing.

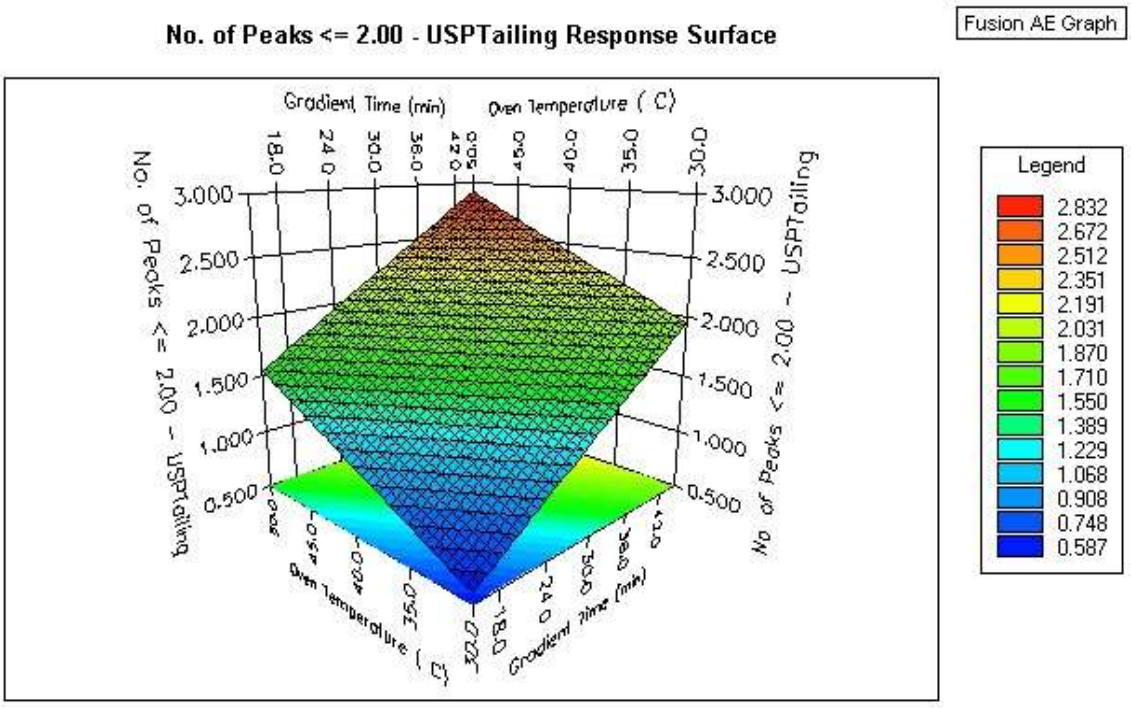
Ime varijable odgovora	**Cilj**	**Predikcijski rezultat**	**-2 sigma konfidencijski limit**	**+2 sigma konfidencijski limit**
Broj pikova s USP-rezolucijom iznad 1,50	Maksimizirati	5.000	4.850	5.142
Broj pikova s USP-tailingom ispod 2,00	Maksimizirati	5.999	4.405	7.593



Slika 11: Kromatogram odjeljivanja aktivne sastavnice i onečišćenja na Fortis C-18 koloni. (Mobilna faza je dihidrogenfosfatni pufer, vrijeme gradijenta 45 min i temperatura kolone 30°C).



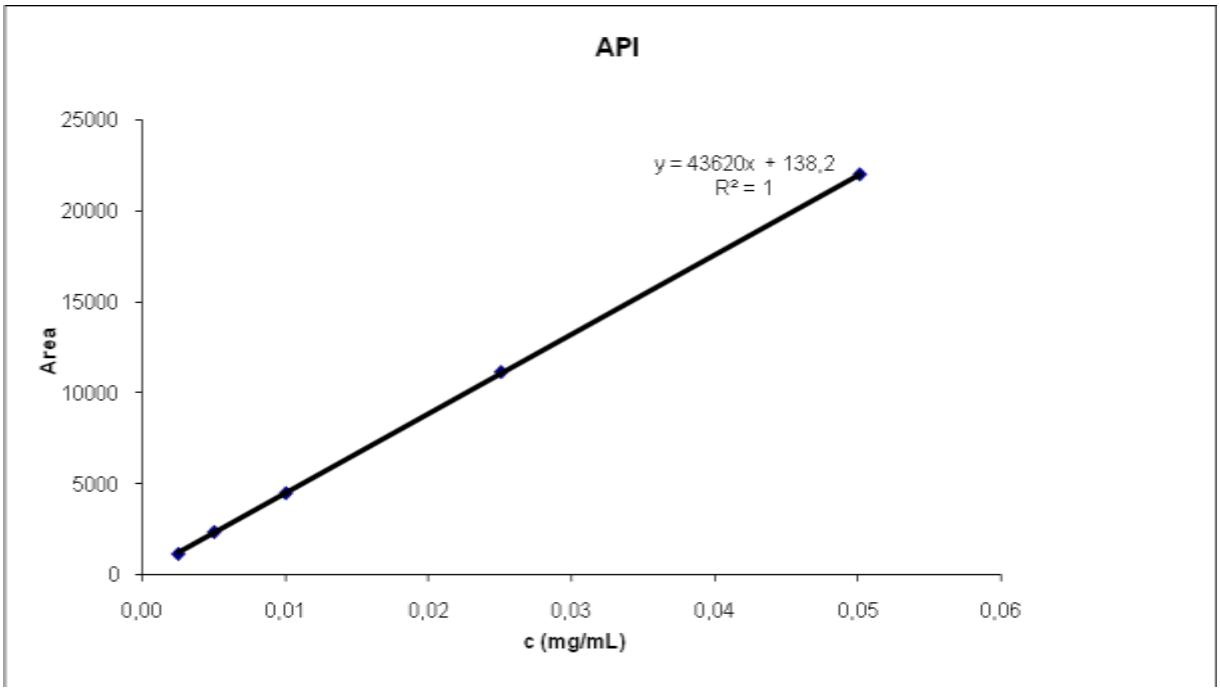
Slika 12: Grafički prikaz ovisnosti broja pikova s USP-rezolucijom većom od 1,5 u odnosu na vriijeme gradijenta i temperaturu kolona.



Slika 13: Grafički prikaz ovisnosti broja pikova s USP-tailingom manjim od 2,0 u odnosu na vriijeme gradijenta i temperaturu kolona.

4.4. Provjera linearnosti metode za određivanje onečišćenja

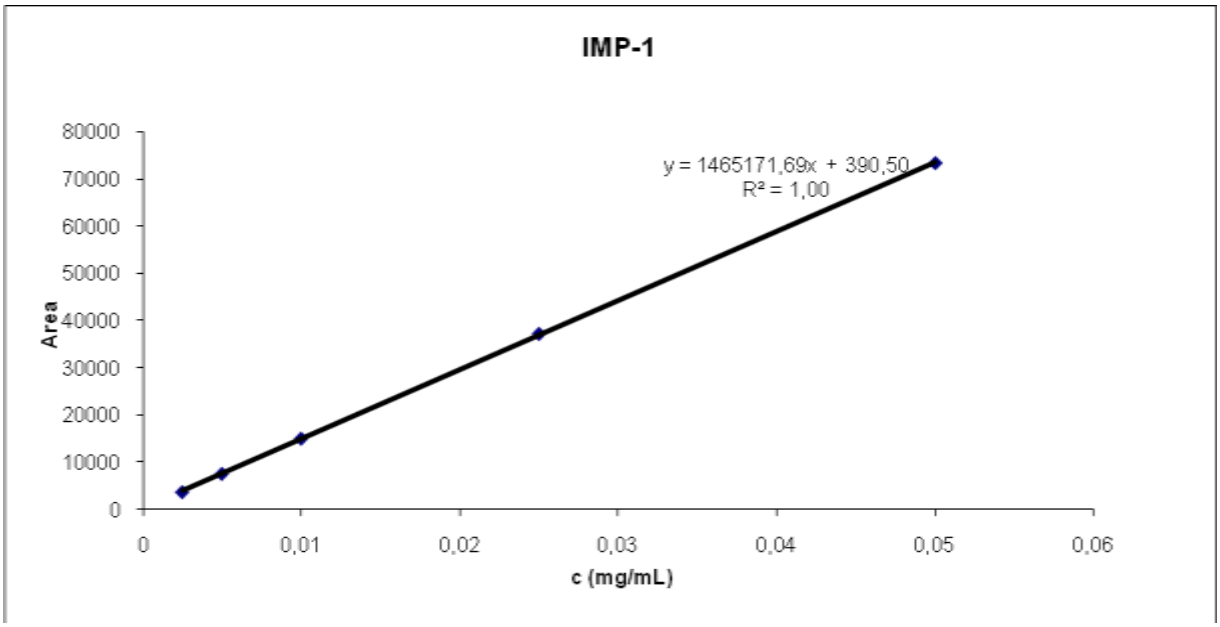
Za aktivnu tvar pregabalin i svako onečišćenje prikazan je grafički prikaz ovisnosti koncentracije uzorka i površine pika te sastavnice na kromatogramu. U tablicama je prikazana koncentracija uzoraka,faktor odgovora detektora (engl. Response faktor, RF), relativni faktor odgovora u odnosu na srednje razrijeđenje (engl. Relativ response factor). Tablica 10 prikazuje rezultate za pregabalin (slika 14), tablica 11 za prvo onečišćenje (slika 15), tablica 12 za drugo onečišćenje (slika 16), tablica 13 za treće onečišćenje (slika 17), tablica 14 za četvrto onečišćenje (slika 18) i tablica 15 za peto onečišćenje (slika 19). Također, iz grafičkog rezultata izračunati su koeficijent korelacije i nagib pravca.



Slika 14: Graf ovisnosti koncentracije pregabalina (API) i površine njegovog pika na kromatogramu.

Tablica 10: Tablični prikaz rezultata provjere linearnosti metode za pregabalin.

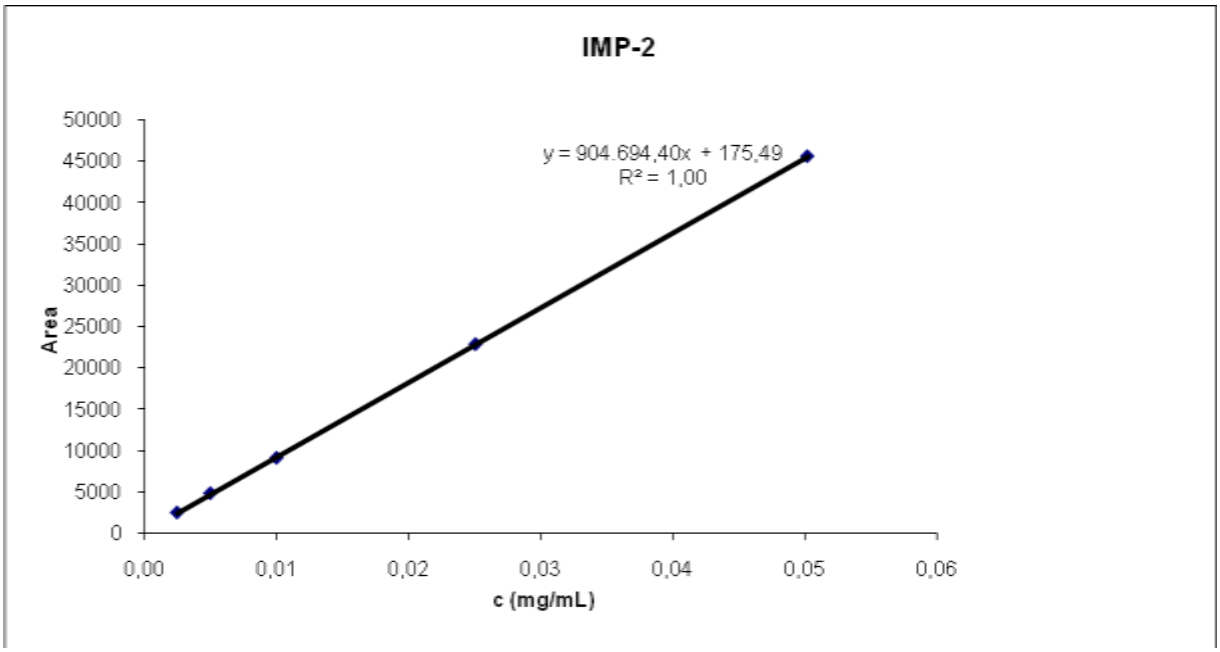
Uzorak	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Površina pika**	**Visina pika**	**Koncentracija uzorka (mg/mL)**	**Faktor odgovora**	**Relativni faktor odgovora (%)**
L1	3,077	1166,058	8462	0,0025	465306,46	103,7
L2	3,063	2366,312	8463	0,0050	472129,29	105,2
L3	3,048	4499,392	8464	0,100	448861,93	100,0
L4	3,085	11136,47	8465	0,0251	444392,14	99,0
L5	3,085	21968,57	8466	0,0501	438319,33	97,7
Nagib pravca		436202,22				
Koef. korelacije		1,00				



Slika 15: Graf ovisnosti koncentracije onečišćenja 1 (IMP1) i površine njegovog pika na kromatogramu.

Tablica 11: Tablični prikaz rezultata provjere linearnosti metode za onečišćenje 1 (IMP1).

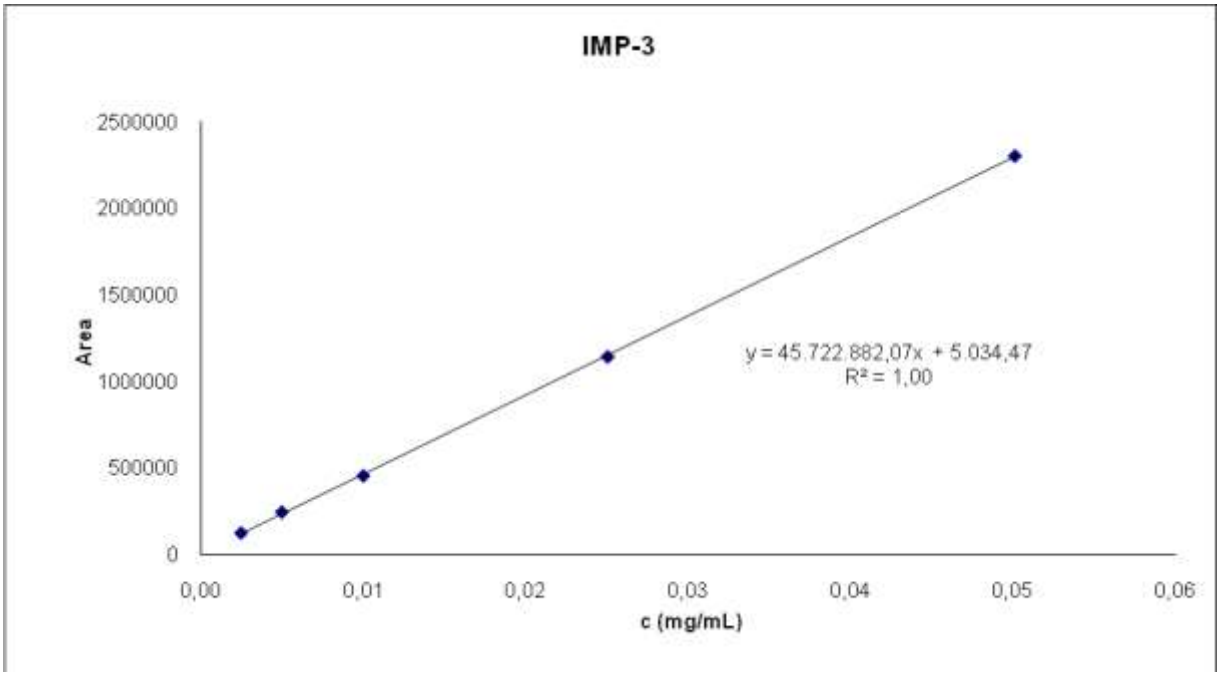
Uzorak	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Površina pika**	**Visina pika**	**Koncentracija uzorka (mg/mL)**	**Faktor odgovora**	**Relativni faktor odgovora (%)**
L1	3,912	3818,65	2707	0,0025	1527702,43	100,9
L2	3,886	7698,53	5403	0,0049	1539951,39	101,7
L3	3,886	15141,67	10096	0,0099	1514408,81	100,0
L4	3,881	37326	22353	0,0249	1493279,01	98,6
L5	3,868	73474,34	36623	0,0499	1469721,89	97,0
Nagib pravca		1465171,69				
Koef. korelacije		1,00				



Slika 16: Graf ovisnosti koncentracije onečišćenja 2 (IMP2) i površine njegovog pika na kromatogramu.

Tablica 12: Tablični prikaz rezultata provjere linearnosti metode za onečišćenje 2 (IMP2).

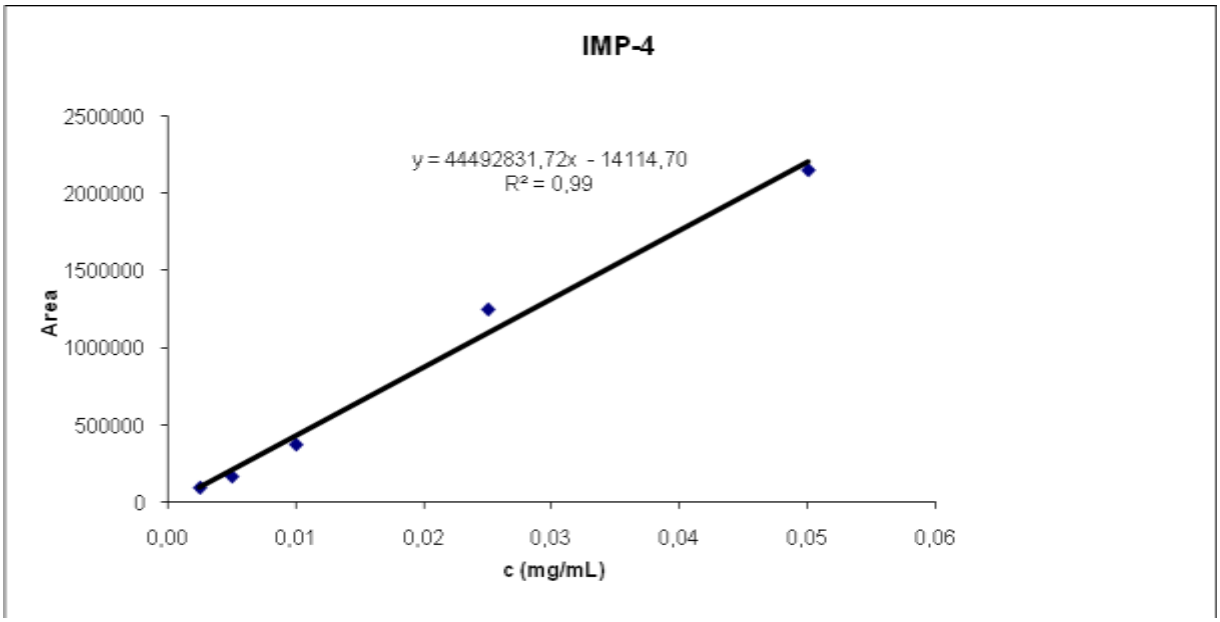
Uzorak	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Površina pika**	**Visina pika**	**Koncentracija uzorka (mg/mL)**	**Faktor odgovora**	**Relativni faktor odgovora (%)**
L1	3,535	2481,14	1326	0,0025	988501,19	109,0
L2	3,5	4822,92	2229	0,0050	960741,04	105,9
L3	3,512	9107,63	4054	0,01	907134,46	100,0
L4	3,583	22868,14	9880	0,0251	911081,08	100,4
L5	3,52	45616,62	18130	0,0502	908697,57	100,2
Nagib pravca		904694,4				
Koef. korelacije		1,00				



Slika 17: Graf ovisnosti koncentracije onečišćenja 3 (IMP3) i površine njegovog pika na kromatogramu.

Tablica 13: Tablični prikaz rezultata provjere linearnosti metode za onečišćenje 3 (IMP3).

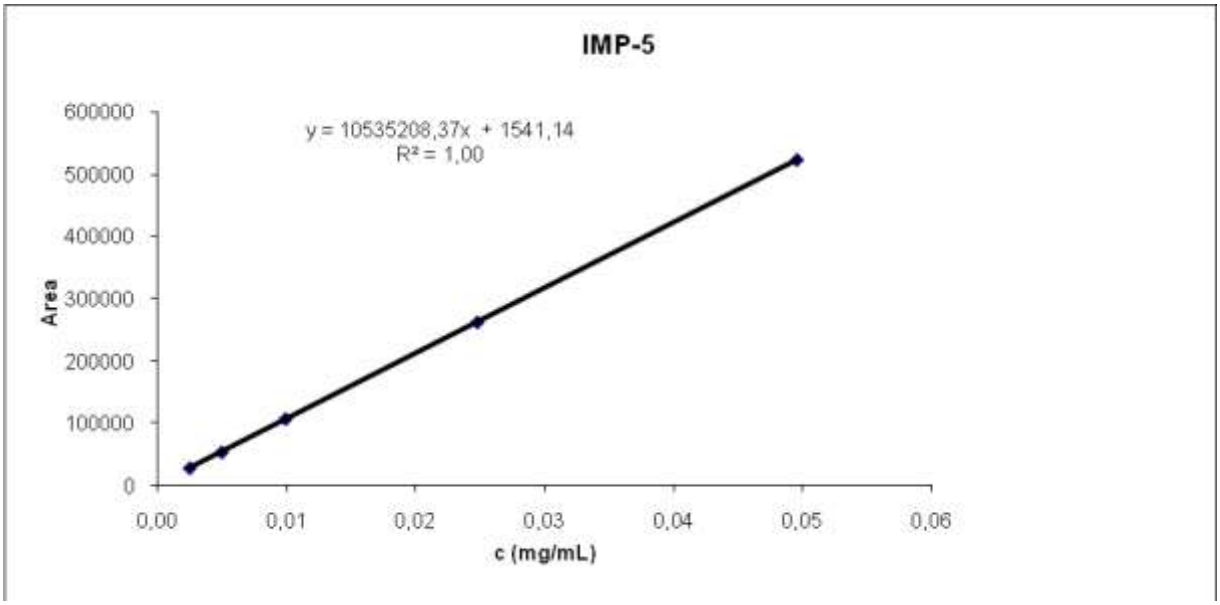
Uzorak	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Površina pika**	**Visina pika**	**Koncentracija uzorka (mg/mL)**	**Faktor odgovora**	**Relativni faktor odgovora (%)**
L1	10,242	123182,2	31812	0,0025	49178473,3	108,6
L2	10,241	244022,7	58243	0,0050	48711013,5	107,6
L3	10,233	453688,2	113386	0,01	45281880,5	100,0
L4	10,239	1140663	301831	0,0250	45539089,3	100,6
L5	10,238	2301103	608084	0,0501	45933868,6	101,4
Nagib pravca		45722882,07				
Koef. korelacije		1,00				



Slika 18: Graf ovisnosti koncentracije onečišćenja 4 (IMP4) i površine njegovog pika na kromatogramu.

Tablica 14: Tablični prikaz rezultata provjere linearnosti metode za onečišćenje 4 (IMP4).

Uzorak	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Površina pika**	**Visina pika**	**Koncentracija uzorka (mg/mL)**	**Faktor odgovora**	**Relativni faktor odgovora (%)**
L1	7,491	98650	8486	0,0025	39434762	89,53
L2	7,479	220367	8487	0,0050	44045211	91,38
L3	7,496	482301	8488	0,01	48199252	100,0
L4	7,493	1235183	8489	0,0251	49375720	102,44
L5	7,489	2182494	8490	0,0502	43621962	90,50
Nagib pravca		44492831,72				
Koef. korelacije		0,99				



Slika 19: Graf ovisnosti koncentracije onečišćenja 5 (IMP5) i površine njegovog pika na kromatogramu.

Tablica 15: Tablični prikaz rezultata provjere linearnosti metode za onečišćenje 5 (IMP5).

Uzorak	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Površina pika**	**Visina pika**	**Koncentracija uzorka (mg/mL)**	**Faktor odgovora**	**Relativni faktor odgovora (%)**
L1	7,298	27629,4	5631	0,0025	11144474,8	103,5
L2	7,304	53208,6	10277	0,0050	10730994,9	99,6
L3	7,286	106792,6	22130	0,0099	10768852,9	100,0
L4	7,293	262573,5	50484	0,0248	10591059,9	98,3
L5	7,298	523900,6	95766	0,0496	10565919,7	98,1
Nagib pravca		10535208,37				
Koef. korelacije		1				

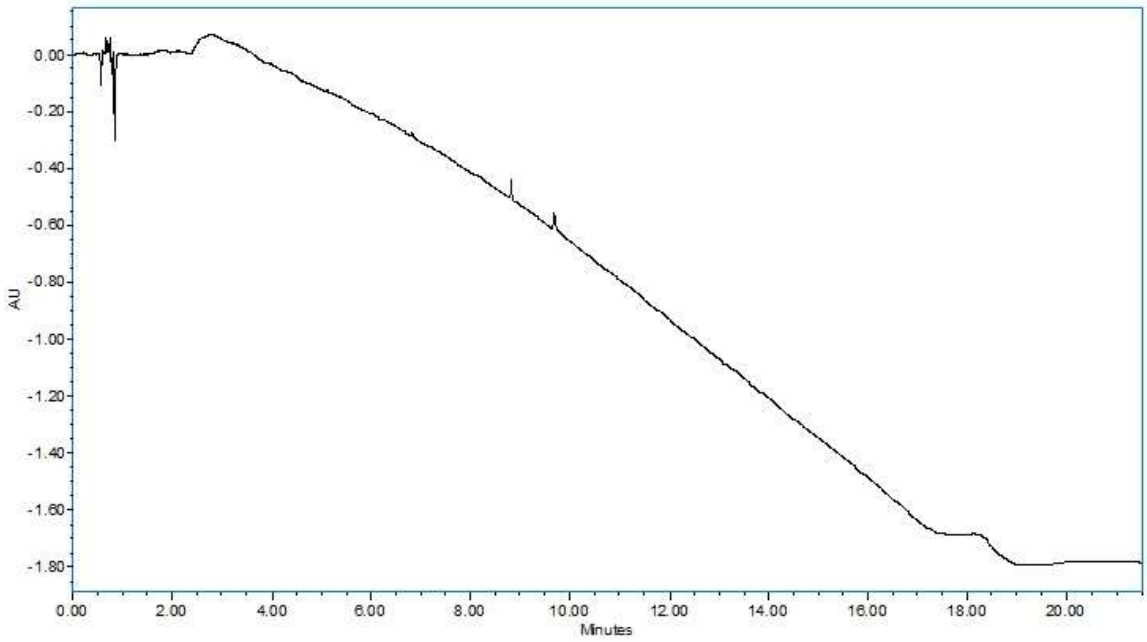
5. Rasprava

5.1. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje onečišćenja od pregabalina

Iako je program procijenio najbolje odjeljivanje sastavnica kod pH vrijednosti ispod 3,5, to u ovom slučaju nije bio najbolji izbor. Kasnijim eksperimentima pokazano je da se najbolji rezultati dobiju s dihidrogenfosfatnim puferom kao mobilnom fazom čija je pH vrijednost 6,1. Grafički prikaz (slika 6) pokazuje da je vrlo uzak pH raspon oko vrijednosti 6,1 bez preklapanja logD vrijednosti, ali se u praksi pokazalo da je odjeljivanje sastavnica zadovoljavajuće u tom pH rasponu.Kolone su dugotrajnije pri nižim pH vrijednostima pa je poželjno u daljnjem istraživanju pronaći pufer s kojim bi se sastavnice uspješno odjelile pri nižoj pH vrijednosti.

5.2. Određivanje optimalnog pufera za odjeljivanje sastavnica

Tri pufera su odabrana na temelju literaturnih podataka i rezultata programa Marvin Beans. Nakon odabrane 3 prikladne pH vrijednosti za odjeljivanje, pronađeni su puferi koji su stabilni, odnosno imaju svojstvo puferiranja u tom pH području. Iako se najbolje odjeljivanje očekivalo s hidrogenfosfatnim (pH 2,5) ili acetatnim puferom (pH 4,3), eksperimenti su pokazali najbolje odjeljivanje s dihidrogenfosfatnim puferom i najvećom pH vrijednosti od tri odabrane. Problem s acetatnim puferom bio je veliki pad bazne linije (slika 20) koji se najčešće događa zbog veće pozadinske apsorbancije acetata od organske mobilne faze (acetonitrila). Porastom udjela organske faze u gradijentu pada pozadinska apsorbancija zbog sve manjeg udjela acetata što se na kromatogramu očituje padom bazne linije. (Wilson, 2001.) Kod hidrogenfosfatnog također dolazi do pada bazne linije, ali u puno manjoj mjeri, no u usporedbi s dihidrogenfosfatnim puferom pikovi su slabije odijeljeni i manje visine.



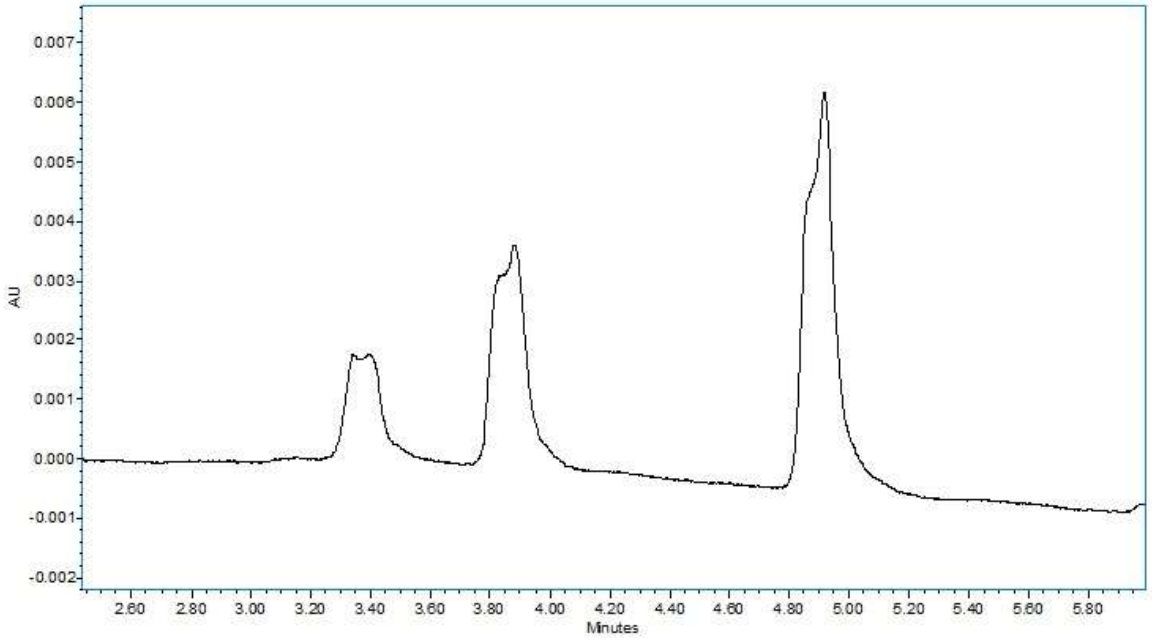
***Slika 20*:** Kromatogram odjeljivanja sastavnica s acetatnim puferom

Korištenje dihidrogenfosfatnog pufera kao vodene mobilne faze pokazalo je dobro odjeljivanje svih sastavnica i zadovoljavajuće izglede svih pikova. Zahtjevi farmakopeje Sjedinjenih Država (USP- Unites States Pharmacopoeia) za razlučivanje između pikova (USP-rezolucija > 1,50) i simetrijski faktor (USP-tailing > 2,0) su zadovoljeni pri gotovo svim ispitivanim uvjetima. Kao što je očekivano, s duljim vremenskim gradijentom i višom temperaturom kolone rezultati su statistički bolji u Fusion programskom paketu, ali u praksi su rezultati zadovoljavajući i pri nižoj temperaturi (30°C) i kraćem vremenskom gradijentu (20 min).

5.3. Određivanje optimalne kolone za odjeljivanje sastavnica

Budući da su sve 4 odabrane kolone vrlo slične, dobiveni rezultati su također vrlo slični. Tri kolone su C-18 i jedna C-8 zato što su te kolone najbolje kod razvoja nove metode. Sve kolone su pokazale bolje odjeljivanje i bolji izgled pikova kod viših temperatura i duljeg vremenskog gradijenta. Vizualnim pregledom kromatograma i pregledom dobivenih rezultata u programskom paketu Fusion, odabrana je Fortis C-18 kolona za daljnji razvoj

metode.Daljnjim optimiziranjem metode došlo je do pada kvalitete pikova, tj. vrhovi pikova počeli su se cijepati (engl. „Peak splitting“). Cijepanje je obično znak degradacije kolone, odnosno njenog punila. Također, relativno visoki pH od 6,1 nije pogodan za kolone od modificiranog silika-gela. Zamjenom kolone cijepanje pikova je nestalo, ali se nakon nekoliko puštanja uzorka ponovno pojavilo. Pokušano je i sa svim ostalim kolonama prethodno ispitanima, ali problem cijepanja pikova se nakon nekoliko uzoraka pojavio na svakoj koloni. Na slici 21 prikazan je jedan od kromatograma gdje je došlo do cijepanja pikova. Uvećano su prikazana prva tri pika koja su eluirana, ali isti izgled su imala i ostala tri pika koja su eluirana kasnije.



Slika 21: Dio kromatograma kod kojeg je došlo do cijepanja pikova.

5.4. Provjera linearnosti metode za određivanje onečišćenja

Određeno je područje u kojem porast koncentracije uzorka linearno prati jakost odgovora detektora. Ispitano je područje koncetracija od 0,0025 mg/mL do 0,05 mg/mL kako za aktivnu supstanciju pregabalin, tako i za ostalih 5 onečišćenja. U tom rasponu su svi uzorci zadovoljili uvjete linearnosti. Određivanje linearnosti je važno jer kod manjih koncentracija može češće doći do greške kod pripreme uzorka, a kod većih koncentracija metoda može izaći iz granica linearnosti. U tablici 16 dane su jednadžbe kalibracijskih pravaca s pripadajućim

uzorcima. Veći nagib pravca znači i veću osjetljivost, a dobre vrijednosti koeficijenta korelacije pokazuju dobru linearnost metode.

***Tablica 16*:** Jednadžbe kalibracijskih pravaca za pregabalin i 5 onečišćenja.

UZORAK	JEDNADŽBA KALIBRACIJSKOG PRAVCA
Pregabalin	y=43620x+138,2
IMP1	y=1465171x+390,5
IMP2	y=904694x+175,49
IMP3	y=45722882x+5034,4
IMP4	y=44492831x-14114,7
IMP5	y=10535208x+1541,1

6. Zaključci

1. Programski paket Marvin Beans koristan je alat za predviđanje najprikladnijeg pH za odjeljivanje supstancija. U ovom slučaju odjeljivanje pregabalina i njegovih 5 odabranih onečišćenja.

2. Ispitana su 3 različita pufera u 3 pH područja. Sva 3 pufera su imala zadovoljavajuću sposobnost odjeljivanja supstancija, ali je problem bio pad bazne linije i manja površina pikova kod acetatnog i hidrogenfosfatnog pufera pa je kao najprikladniji odabran dihidrogenfosfatni pufer.

3. Sve 4 ispitane kolone su dale podjednake rezultate budući da su i sličnog sastava i namjene. Odabrana je Fortis C-18 za koju je programski paket Fusion dao matematički najbolje rezultate.

4. Linearnost metode je zadovoljavajuća za aktivnu supstanciju pregabalin i za svih 5 njegovih onečišćenja.

5. Programski paket Fusion pokazao se vrlo korisnim za razvoj nove analitičke metode, ali eksperimentom dobiveni rezultati nisu uvijek isti onima predviđenim programom.

6.Metoda nije do kraja razvijena i nakon određenog broja ispitanih uzoraka dolazi do pada kvalitete pikova, tj. dolazi do njihovog cijepanja. Potreban je daljnji razvoj metode i njena validacija.

7. Literatura

Cerjan-Stefanović Š, Drevenkar V, Jurišić B, Medić-Šarić M, Petrović M, Šegudović N, Švob V, Turina S. Kromatografsko nazivlje, IUPAC preporuke 1993. i 1998.. Zagreb, Hinus-Sekcija za kromatografiju, 1999.

Dolan J, A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection, http://www.ace-hplc.com, pristupljeno 21.7.2016.

DPT, http://www.dptlabs.com, pristupljeno 21.7.2016.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, 2002.

Impurities in New Drug Substances, 2006a, International Conference on Harmonisation, Q3A(R2)

Impurities in New Drug Products, 2006b, International Conference on Harmonisation, Q3B(R2)

Kasawar GB, Farooqui MN, Development and Validation of HPLC Method for the Determination of Pregabalin in Capsules, U: Indian J Pharm Sci., 2010, 517-519.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, Temeljna i klinička farmakologija, Zagreb, Medicinska naklada, 2011.

Nigović B. Kromatografske tehnike odjeljivanja. U: Analitika lijekova 2. Zagreb, 2014a.

Nigović B. Onečišćenja u lijekovima. U: Analitika lijekova 1. Zagreb, 2013.

Nigović B. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). U: Analitika lijekova 2. Zagreb, 2014b.

Sangshetti JN, Deshpande M, Zaheer Z, Shinde DB, Arote R. Quality by design approach: Regulatory need. *Arabian Journal of Chemistry,* 2014.

Syed Salman Latef and Vinayak, Quality-by-Design Approach to Stability Indicating Method Developmen for Linagliptin Drug Product, Agilent Technologies, USA, 2014.

Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, 2000, International Conference on Harmonisation, Q6A

Waters Corporation, http://www.waters.com, pristupljeno 27.1.2016.

Watson DG, Pharmaceutical analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, 3nd Edition, Elsevier, 2012.

8. Sažetak/Summary

Razvoj UHPLC metode za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn

Ključne riječi: pregabalin, UHPLC, onečišćenja, kvaliteta ugrađena u dizajn (QbD)

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti metodu za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina na UHPLC uređaju. Razvoj metode temeljen je na načelu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD). QbD se sve češće koristi zbog toga što ubrzava razvoj metode i smanjuje potrošnju resursa.

Prvotno je pomoću programskog paketa Marvin Beans određen optimalni pH za odjeljivanje svih supstancija. Za 3 predložene pH vrijednosti odabrana su 3 pufera koji su stabilni u odgovarajućem pH rasponu. Metoda je razvijena korištenjem programskog paketa Fusion koji kreira više metoda s različitim kromatografskim parametrima i kasnije obrađuje dobivene podatke te predviđa parametre za optimalnu metodu. Na temelju dobivenih rezultata odabran je dihidrogenfosfatni pufer s pH vrijednosti 6,1. U razvoju su ispitane 4 različite kolone slične strukture i svojstava koje su najpogodnije za razvoj novih metoda. Sve 4 kolone su dale zadovoljavajuće rezultate, a najbolje rezultata pokazala je Fortis C-18 kolona. U definiranom rasponu razrjeđenja, metoda je linearna za pregabalin i sva onečišćenja. Daljnjim ispitivanjima došlo je do relativno brze degradacije kolone pa je potrebna dodatna optimizacija metode.

Development of UHPLC method for determination of impurities in Pregabalin capsule formulation by QbD approach

Key words: pregabalin, UHPLC, impurities, Quality by Design (QbD)

The aim of this study was to develop UHPLC method for determination of impurities in pregabalin capsule formulation. Method development was based on quality by design approach (QbD). QbD is becoming more common approach because it saves time and reduces resources consumption.

Firstly, optimal pH for separating the components was determined using Marvin Beans software. For 3 suggested pH values, 3 buffers were selected which are stable in appropriate pH ranges. Methods were developed using Fusion software which creates more methods with different chromatographic parameters, process data and later provides the parameters for the optimal method. Based on the results, dihydrogenphosphate buffer was selected with pH value 6,1. 4 columns were tested with similar structure and properties that are most suitable for new method development. All 4 columns gave good results and the best was Fortis C-18 column. For the tested range of dilution, method is linear for both pregabalin and all impurities. Further experiments showed rapid column degradation so further method optimization is needed.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Razvoj UHPLC metode za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn

Blaž Car-Pavlic

SAŽETAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti metodu za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina na UHPLC uređaju. Razvoj metode temeljen je na načelu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD). QbD se sve češće koristi zbog toga što ubrzava razvoj metode i smanjuje potrošnju resursa. Prvotno je pomoću programskog paketa Marvin Beans određen optimalni pH za odjeljivanje svih supstancija. Za 3 predložene pH vrijednosti odabrana su 3 pufera koji su stabilni u odgovarajućem pH rasponu. Metoda je razvijena korištenjem programskog paketa Fusion koji kreira više metoda s različitim kromatografskim parametrima i kasnije obrađuje dobivene podatke te predviđa parametre za optimalnu metodu. Na temelju dobivenih rezultata odabran je dihidrogenfosfatni pufer s pH vrijednosti 6,1. U razvoju su ispitane 4 različite kolone slične strukture i svojstava koje su najpogodnije za razvoj novih metoda. Sve 4 kolone su dale zadovoljavajuće rezultate, a najbolje rezultata pokazala je Fortis C-18 kolona. U definiranom rasponu razrjeđenja, metoda je linearna za pregabalin i sva onečišćenja. Daljnjim ispitivanjima došlo je do relativno brze degradacije kolone pa je potrebna dodatna optimizacija metode.

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

Rad sadrži: 43 stranice, 21 grafički prikaz, 16 tablica i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: pregabalin, UHPLC, onečišćenja, kvaliteta ugrađena u dizajn (QbD)

Mentor: Dr. sc. Biljana Nigović, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: Dr. sc. Biljana Nigović, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ana Mornar Turk, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lidija Bach Rojecky, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of pharmacy and biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

Development of UHPLC method for determination of impurities in Pregabalin capsule formulation by QbD approach

Blaž Car-Pavlic

SUMMARY

The aim of this study was to develop UHPLC method for determination of impurities in pregabalin capsule formulation. Method development was based on quality by design approach (QbD). QbD is becoming more common approach because it saves time and reduces resources consumption.
Development started with literature search. Firstly, optimal pH for separating the components was determined using Marvin Beans software. For 3 suggested pH values, 3 buffers were selected which are stable in appropriate pH ranges. Methods were developed using Fusion software which creates more methods with different chromatographic parameters, process data and later provides the parameters for the optimal method. Based on the results, dihydrogenphosphate buffer was selected with pH value 6,1. 4 columns were tested with similar structure and properties that are most suitable for new method development. All 4 columns gave good results and the best was Fortis C-18 column. For the tested range of dilution, method is linear for both pregabalin and all impurities. Further experiments showed rapid column degradation so further method optimization is needed.

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

Thesis includes: 43 pages, 21 figures, 16 tables i 16references. Original is in Croatian language.

Key words: pregabalin, UHPLC, impurities, Quality by Design (QbD)

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

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

Ana Mornar Turk, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D Associate Professor, University of Zagreb faculty of Pharmacy and Biochemistry

Rad prihvaćen: rujan 2016.