

# A Quality by Design elv folyadékkromatográfias alkalmazása

KORMÁNY Róbert\*

Egis Gyógyszergyár Zrt., Keresztúri út 30-38., 1106 Budapest, Magyarország

## Bevezetés

Napjainkra a folyadékkromatográfia számos területen nélkülözhetetlen analitikai módszerre vált. Ez különösen igaz a gyógyszeripar minden ágára, ezen belül az új gyógyszermolekulák kutatására, fejlesztésére, a belőlt nyert termékek előállítására és a minőségbiztosításra is.

Folyadékkromatográfias vizsgálati módszerek fejlesztése a gyógyszermolekulák (Active Pharmaceutical Ingredient, API) és szennyezőik elválasztására meglehetősen összetett feladat. A feladat bonyolultságát jelzi, hogy egyszerre lehet jelen az API-hoz hasonló és eltérő szerkezetű szennyező és bomlástermék egyaránt. Az egyes komponensek elválasztását biztosító kromatográfias körülmények meghatározása, amelyet módszerfejlesztésnek nevezünk, sokparaméteres. Ennek az a következménye, hogy nagy idő- és költségárfordítást igényel. A folyadékkromatográfias töltetek eltérő szelektivitásából következően így is sokszor előfordul, hogy a módszert nem lehet egyik laborból a másikba változtatlan paraméterek mellett átvinni. Külön kiemelendő, hogy az eltérő gyártási helyről származó, de a hivatalos besorolás alapján azonos kategóriába tartozó állófázisoknál is problémát jelent a kolonnáról-kolonnára történő adaptálás. Ennek oka, hogy a folyadékkromatográfiasban az elválasztás sok paramétertől függ. A szelektivitást, amely döntően befolyásolja az elválasztást, megszabják az állófázis fizikai-kémiai tulajdonságai.

A gyógyszeripari hatóságok elvárásaiban előírás, hogy a gyártásnál és a folyamatok ellenőrzésénél minden olyan paramétert, amely az eredményeket befolyásolja, a tudományos ismeretek alapján előre kell jelezni. Ezt a megközelítést nevezik Quality by Design (QbD) elvnek.<sup>1,2</sup> Ez vonatkozik a gyártást ellenőrző analitikai eljárásokra is, így a legtöbbet alkalmazott hagyományos nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) és a modernebb ultranagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) módszerekre is.

A QbD alkalmazására a folyadékkromatográfiasban az intelligens előrejelző és módszerfejlesztést segítő számítógépes programok alkalmazása szükséges. Ezek közül a DryLab egy széleskörűen használható kísérlettervező és módszeroptimalizáló program, melyben háromdimenziós modell segítségével egyszerre tudjuk előrejelezni a legfontosabb kromatográfias paraméterek hatását a felbontásra.<sup>3</sup>

Természetesen a DryLab-on kívül rendelkezésre állnak más kísérlettervező és módszeroptimalizáló szoftverek is. Valós modelleken alapuló modellezést tesz még lehetővé a Fusion és az Osiris szoftver vagy az ACD Lab LC szimulátora. A

szoftverek másik nagy csoportja pedig a molekulaszkelet alapján végzett előrejelzéseket, pl. ChromSword vagy ACD. Érdekes megközelítés a szelektivitás és felbontás optimalizálása az állófázis oldaláról, erre ad lehetőséget a POPLC szoftvercsomag.

## 1. QbD alapelvek a folyadékkromatográfiasban

A QbD elvű folyadékkromatográfias módszerfejlesztés alaplépései a következők:<sup>4</sup>

- Pontosan definiálni kell a vizsgálati módszer célját. A folyadékkromatográfias módszerfejlesztésben a legfontosabb cél a kritikus csúcspár alapvonalas elválasztása. A kritikus csúcspárra leggyakrabban az  $R_{s,skm} > 1,5$  feltételt szabjuk meg, ezt tekintjük alapvonalas elválasztásnak.
- Kockázatelemzés alkalmazása, amely során meghatározzuk, melyik változónak van negatív hatása a módszer alkalmazhatóságára, vagyis melyik mérési paraméter rontja a felbontás értéket a kritikus csúcspárra nézve.
- Annak kísérleti értékelése, hogyan befolyásolják a kritikus változók a módszer alkalmazhatóságát. Ez szisztematikus multifaktoriális módon elvégezhető a kísérletek tervezésével (Design of Experiments, DoE). A kísérletek eredményeként tervezési tér (Design Space, DS) készíthető, amely leírja a paraméterek azon tartományát, melyen belül a módszer kezdetben megszabott céljai teljesülnek.
- Amikor a végső módszer elkészült a fent leírt lépések alapján, egy robusztussági vizsgálatot is el lehet végezni annak becsülése, hogy a módszer céljait (kritikus felbontás) mennyire befolyásolja a megállapított módszer paraméterek beállított értékei.
- A robusztusság vizsgálat eredményei segítik, hogy a módszerhez vagy a kritikus elválasztáshoz szabályozó stratégiát alakítsunk ki, ez a QbD elvű módszerfejlesztés következő fontos lépése.
- Mivel az alapkísérletek meg lettek határozva, a beállítások könnyen elvégezhetőek, ha megismételjük a kísérleteket és megkeressük az aktuális DS-t. Normál esetben csak kis eltérések lesznek. A DS-en belül a változók módosítása a szabályozó hatóságok szerint nem minősül „változtatásnak”, ezért a módszert nem kell újrapvalidálni.

## 2. A DryLab szoftver

30 évvel ezelőtt, 1986-ban DryLab név alatt elindult egy számítógépes folyadékkromatográfias módszermodellezés<sup>5</sup>, amely kezdetben a retenciók idő ( $t_r$ ), a retenciók tényező ( $k$ ) és a kritikus felbontás ( $R_{s,skm}$ ) egydimenziós számításából

\* e-mail: kormany.robert@egis.hu

indult, közben kromatogramokat vizualizálva, negyed századdal később a modell eljutott a három mért és nyolc számított dimenzióig.<sup>6</sup> A számított dimenziók magukban foglalják az állófázis, a mozgófázis és a készülék legfontosabb paramétereit, úgy mint kolonnahossz és -átmérő, töltet szemcseméret, eluens kiindulási- és végső összetétel, térfogatáramlási sebesség, késleltetési- és kolonnán kívüli térfogat. A szakirodalom ezt a háromdimenziós modellt „cube”-nak, vagyis kockának nevezi. A szoftver a Horváth Csaba és munkatársai által kidolgozott szolvofób elméleten alapszik, mely a víz fontos, retenciót szabályozó szerepét magyarázza fordított fázisú körülmények között.<sup>7</sup>

$$\ln k = A + B\varepsilon + C\gamma + D(\kappa - 1)V^{2/3} + E + \ln(RT/P_0 V)$$

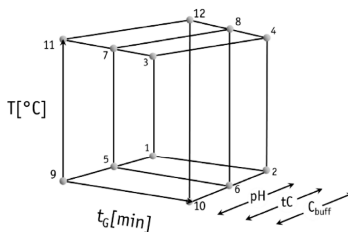
Az egyenletben az A, B, C, D és E kísérletileg meghatározható konstansok,  $\varepsilon$  az oldószer statikus dielektromos állandója,  $\gamma$  a felületi feszültség,  $\kappa$  az energia, amely ahhoz szükséges, hogy a megfelelő üreg kialakuljon a kötőhely felületén, V az oldószer molekulák térfogata,  $P_0$  az atmoszférikus nyomás. Az elmélet szerint, a víz a nagy lipofóbicitású (dibenzantracénnel igazolva C8 tölteten  $k_{\text{vizben}} \sim 4000$ ,  $k_{\text{acetonitrilben}} \sim 1$ ), felületi tenzióját szerves oldószerekkel, pl. metanolal (MeOH) és acetonitrillel (AcN) lehet csökkenteni. Az elmélet szerint nagy energia szükséges ahhoz, hogy az apoláris molekulák oldódjanak a sokkal polárosabb vízben, ezért a visszatartás nagymértékben a víznek köszönhető. Gradiens módszer esetén csökkentve a felületi tenziót, egyre kisebb energia szükséges a molekulák oldódásához, aminek eredményeként csökken a visszatartás.

### 2.1.1. A DryLab kocka

A DryLab kocka felépítése (1. Ábra) a modell alapú kísérlettervezés első szakasza (DoE). A faktorok a gradiens idő ( $t_G$ ), a hőmérséklet (T), a pH vagy termer mozgófázis összetétel ( $t_C$ ). Két típusú kocka elkészítésére van lehetőség. A  $t_G$ -T-pH kocka protonfunkciós csoportot tartalmazó (savas vagy bázikus karakterű) komponensek elválasztásánál ad fontos információt a komponensek retenciójának  $t_G$ , T és pH függésére, míg a  $t_G$ -T- $t_C$  kockával a termer elegy szelektivitást befolyásoló hatását vizsgálhatjuk a  $t_G$  és T mellett.

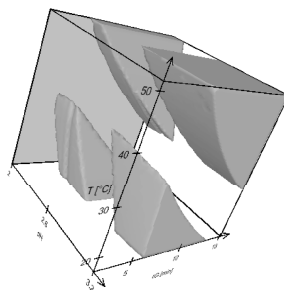
A  $t_G$ -t és T-t elegendő két szinten vizsgálni, mert feltételezzük a lineáris kapcsolatot, a pH és  $t_C$  esetében három szint kijelölése szükséges. Így alakul ki a kockánkénti 12 kísérlet. A kísérletek kiértékelt kromatogramjait átvisszük egy elektronikus exportáló file típusba, amelyet a DryLab program be tud olvasni. Ezt követi a megfelelő kromatográfias csúcsok egymáshoz való illesztése, amelyet legkönnyebben a csúcsterületek alapján tudunk megtenni.<sup>8</sup>

Az 1. Ábrán lévő körök a kocka sarkain, illetve élein jelzik a mérési pontokat. Az 1, 5, 9, 3, 7 és 11 pontok tartoznak a rövid, míg a 2, 6, 10, 4, 8 és 12 pontok a hosszú gradiens időhöz ( $t_G$ -hez). A három különböző pH-jú vagy termer összetételű ( $t_C$ ) mozgófázishoz három különböző, ún.  $t_G$ -T-sík tartozik. Az azonos pH-hoz/ $t_C$ -hez tartozó  $t_G$ -T-síkok a következők: 1-2-3-4, 5-6-7-8 és 9-10-11-12. A szoftver a három mért  $t_G$ -T-sík mellé kiszámít további 97-et, ami által a kocka teljessé válik és megkapjuk a 2. ábrán látható felbontási térképet (Resolution Map).



1. Ábra. A kocka modelljének felépítése, ahol az egyes pontok az alakromatogramokat szimbolizálják.

A kockában minden pont reprezentál egy kromatogramot (kockánként nagyságrendileg  $10^6$  pont képzelhető el). Miután minden egyes kromatogram különböző komponens retenciót mutat, így a kockával a szelektivitás változásokat kitűnően lehet tanulmányozni.



2. Ábra. DryLab kocka az  $R_{s, \text{min}} > 1,5$  tartományokkal.

A QbD nevezéktanának megfelelően az egész kocka a tudástér (Knowledge Space, KS), ahol információknak van a különböző faktorok hatásairól. A kockában lévő szabálytalan alakzatok jelölik azokat a paraméter tartományokat (Design Space, DS), ahol a kiindulási feltételeknek megfelelő értéket kapunk a kritikus csúcspár felbontására. Az alakzatok szélei a módszer alkalmazhatóságának alsó határai (Method Operable Design Region, MODR), ahol ugyan még teljesülnek a megfelelőségi kritériumok, de már nagy valószínűséggel nem lesz robusztus a rendszer.

A gyakorlatban úgy határozzuk meg a mérési paramétereket, hogy a legkevésbé visszatartott komponensnek is legyen megfelelő retenciója, illetve a leginkább visszatartott komponens is eluálódjon mind a 12 kísérletben. Ezeket a feltételeket úgy tudjuk meghatározni, hogy kiválasztjuk az alacsonyabb hőmérsékletet és itt végzünk néhány kísérletet.

Amennyiben harmadik dimenzióként a pH-t választottuk, célszerű az alacsonyabb és magasabb pH-n is elvégezni ugyanazokat a kísérleteket, mert a komponensek protonáltsági/deprotonáltsági viszonyai nagymértékben befolyásolják a retenciót. Előfordulhat, hogy egy bázikus csoportot tartalmazó molekulának magasabb pH-n még megvan a megfelelő visszatartása, de a pH csökkentésével

megnövekszik az ionizáltsági foka és csökken a retenciója, vagyis már nem teljesíti azt. Fordított értelemben ugyanez mondható el savas csoportot tartalmazó molekuláról, vagyis a pH növelésével növekszik az ionizáltsági fok és csökken a retenció. A fenti szabályokat alkalmazhatjuk az utolsóként eluálódó komponensre is, vagyis úgy válasszuk meg a pH-t és a gradiens összetételét, hogy az összes komponens eluálódjon. Amennyiben kiválasztottuk a kiindulási pontot (1. Ábra, 1-es pont), akkor néhány egyszerű szabály betartásával könnyen meghatározhatjuk a többi kísérleti pontot is.

Első szabály: a hosszabb  $t_G$  maximum háromszorosa legyen a rövidebb  $t_G$ -nek és ugyanazzal a mozgófázis összetétellel kezdődjön és érjen véget.

Második szabály: A két hőmérséklet között ne legyen 30°C-nál nagyobb különbség.

Harmadik szabály: a  $\Delta pH \leq 0,6$  legyen.

Hasonlóan kell eljárni, ha harmadik dimenzióknak a terner összetétel ( $t_G$ ) választjuk. Itt az előkísérletek során a pH helyett a szerves módosítóra kell helyezni a hangsúlyt. A megfelelő visszatartás teljesülését az AcN-t tartalmazó rendszerben kell biztosítani, mivel az AcN erősebb eluens, mint a MeOH, vagyis a komponensek korábban eluálódnak. Ugyanezen okok miatt a gradiens idejét és meredekségét a MeOH-t tartalmazó rendszerben kell meghatározni.

## 2.2. $t_G$ -T- $t_G$ modell

Sok esetben a terner mozgófázis összetétel eltérő szelektivitást eredményez a folyadékkromatográfiában, mintha külön-külön alkalmaznánk a módosítókat. Tipikus terner mozgófázis a víz/puffer-AcN-MeOH különböző arányú elegye, de sok esetben segíthet kis mennyiségű tetrahidrofuran vagy izopropil-alkohol hozzáadása is a víz/puffer-AcN vagy víz/puffer-MeOH tartalmú elegyekhez, hogy megváltoztassuk a szelektivitást.

Az első DryLab kocka is terner mozgófázis összetétel optimalizálására született meg, ahol a  $t_G$  és T tengelyek mellett egy harmadik, ún. terner koncentrációs tengelyt ( $t_G$ ) vezettek be, amely a szerves eluénst variálta, amennyiben AcN és MeOH között keverékeket mért, illetve ábrázolt. Ez azt jelenti, hogy a puffer pH-ja („A” eluens) állandó marad, ugyanakkor a szerves rész („B” eluens) összetételét változtatjuk.<sup>9</sup>

Az alpmérések kivitelezésénél célszerű úgy eljárni, hogy az első  $t_G$ -T síkhoz (1. Ábra 1, 2, 3 és 4 pontok) tartozó méréseknél AcN-t, a második  $t_G$ -T síkhoz (1. Ábra 5, 6, 7, és 8 pontok) tartozó méréseknél AcN/MeOH=50/50(v/v) arányú elegyét, a harmadik  $t_G$ -T síkhoz (1. Ábra 9, 10, 11 és 12 pontok) tartozó méréseknél pedig MeOH-t választunk szerves módosító oldószernek.

## 2.3. $t_G$ -T-pH modell

A  $t_G$ -T-pH elnevezés egy másik fajta kockára utal, amikor a gradiens idő ( $t_G$ ) és a hőmérséklet (T) mellett a pH értékek (mint alternatívák a  $t_G$ -hez) optimalizálása történik.<sup>10</sup> A  $t_G$  illetve a szerves módosító (%B) hatása a

fordított fázisú folyadékkromatográfiában hatalmas. A víz eluensben lévő mennyiségének van a legnagyobb befolyása a szelektivitásra, illetve az egyes anyagok retenciójára. Amennyiben a vizsgálandó anyagok valamelyike rendelkezik protonfunkciós csoporttal (savas vagy bázikus karakterrel), akkor a mozgófázis pH-ját állandó értéken kell tartani, hogy a molekuláris formák egyensúlya és ezáltal a retenció idő ne változzon. Ezt a pH állandóságot tudjuk biztosítani megfelelő puffer oldatok alkalmazásával. A szelektivitás változtatása szempontjából viszont jól tudjuk használni ezt a paramétert, hiszen ha a protonfunkciós csoporttal rendelkező anyag  $pK_{a2}$  értéke körül állítjuk be a pH-t, akkor a retenció pH-függő lesz. Ezáltal a szelektivitás és a felbontás szabályozható, a pH által pontosan beállítható lesz. Fontos megemlíteni, hogy minél nagyobb arányban van jelen az ionvisszaszorított molekuláris forma, annál nagyobb retenciót várhatunk.

## 2.4. Robusztusság vizsgálat

A robusztusság vizsgálat a módszervalidálás része, amely arra ad választ, hogy a módszer paramétereinek kismértékű, tudatos megváltoztatása mennyiben befolyásolja a mérési eredményeket, hogyan változik a szelektivitás és a felbontás. Ha az eredményekre a változtatás nincs vagy csak alig van hatással, azt mondjuk, hogy a módszer robusztus.

Az alkalmazott módszertől függ, hogy melyik kromatográfiás paramétert változtassuk. Változtatható kromatográfiás paraméterek lehetnek például: pH, puffer koncentráció, oszlop hőmérséklet, eluens összetétel, áramlási sebesség, illetve gradiens módszer esetén a gradiens ideje és meredeksége. Ennek a módszernek nagy hátránya, hogy időigényes és a különböző faktorok egymásra gyakorolt hatását nem tudjuk vizsgálni.

A DryLab szoftver legújabb verziója (DryLab4) lehetővé teszi a tervezett módszer szimulált robusztusság vizsgálatát, ahol a gradiens elúcióban leggyakrabban alkalmazott körülmények hatásait lehet modellezni. Ezek lehetnek a  $t_G$ , T, pH vagy  $t_G$  térfogat-áramlási sebesség, induló és végső mozgófázis összetétel. A szoftver robusztusság vizsgáló modulja a hat mérési paraméter három szinten (-1, 0, +1) vizsgálja és kombinálja azokat, vagyis 3<sup>6</sup> teljes faktoros terv szimulációját végzi el, ez 729 szimulált kromatogramot eredményez.<sup>11</sup>

A szimulált robusztusság vizsgálat megbízható, emellett gyorsabb és sokkal több információval szolgál, mint a hagyományosan alkalmazott, egyszerre egy faktor változtatásával mért módszer. A gyorsaság mellett előnye, hogy igyelembe veszi a kromatográfiás paraméterek egymásra gyakorolt hatását.

## 3. Esettanulmány

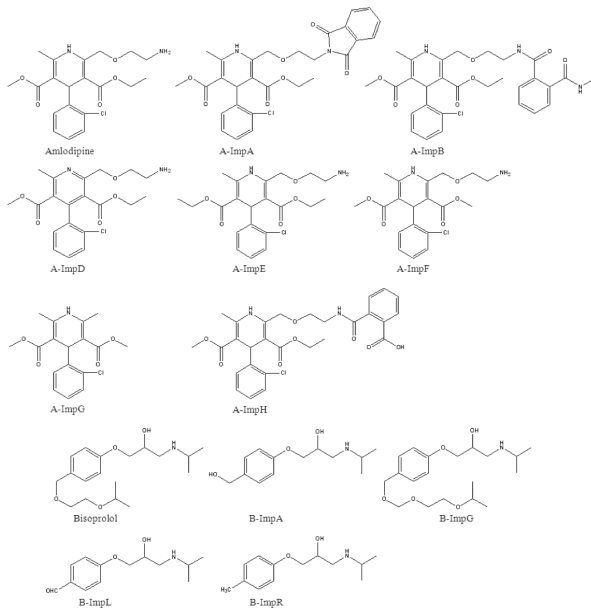
### 3.1. Modellvegyületek

Ebben az esettanulmányban konkrét mérésekkel bizonyítjuk a DryLab kísérlettervező és módszeroptimalizáló szoftver gyakorlati alkalmazhatóságát, illetve, hogy mennyire megbízhatóak az általa számított és modellezett eredmények.<sup>12</sup>

A kísérletekhez az amlodipin-bisoprolol hatóanyag kombináció és azok Európai Gyógyszerkönyvi (Ph.Eur.) szennyezői (3. Ábra) lettek kiválasztva.

Az amlodipin ún. lassú kalcium-csatorna blokkoló, míg a bisoprolol a béta-blokkoló csoportjába tartozik. Az amlodipin-bisoprolol kombináció napi alkalmazását II-es stádiumú esszenciális hipertóniában hatásosnak,

biztonságosnak és jól tolerálhatónak tekintik. A kombinációban szereplő mindkét gyógyszert egyébként önmagában is használják. A kombinációban vérnyomás csökkentő hatásaik összeadódnak. A fix dózisos kombinációs tabletták adását az indokolja, hogy így el lehet kerülni azokat a bonyolult gyógyszeradagolási sémákat, melyeket a betegek nem képesek követni. Az amlodipin-bezilát és a bisoprolol-fumarát fix kombinációját Concor AMLO néven hozzák forgalomba.<sup>13</sup>



3. Ábra. Az esettanulmányban szereplő molekulák szerkezeti képletei.

Kromatográfias szempontból persze sokkal inkább fontos a molekulák szerkezete, mint az élettani funkciója. A vizsgált molekulák között található szerkezetileg nagyon hasonló (pl. amlodipin és A-ImpE) és nagyon eltérő (pl. A-ImpA és B-ImpA). A modellvegyületek mindegyike tartalmaz protonfunkciós csoportot. Ez azt jelenti, hogy a molekuláris formák arányát állandó értéken kell tartani, hogy a retenciójuk ne változzon, vagyis pH kontroll alkalmazása szükséges.

A bisoprolol<sup>14</sup> és szennyezői poláris molekulák, folyadékromatográfias vizsgálatuknál magas víztartalmú induló mozgófázis összetétel szükséges ahhoz, hogy meglegyen a megfelelő retenció a legkevésbé visszatartott komponensre (B-ImpA) nézve is. A molekulák szekunder amino csoportot tartalmaznak ( $pK_a > 10$ ), vagyis fordított fázisú körülmények között ionizált formában vizsgálhatóak. A bisoprolol-fumarátban jelenlévő fumarát a karboxil csoportban jelenlévő kettős kötések miatt szintén jelet ad a kromatográfias rendszerben, illetve van megfelelő visszatartása is, ezért ezt is szelektíven el kell választani

a többi szennyezőtől. A molekula két karboxil csoportot tartalmaz, ami miatt savas karakterű ( $pK_{a1} = 3,03$ ,  $pK_{a2} = 4,44$ ), így fordított fázisú körülmények között a teljesen ionvisszaszorított formától a teljesen ionizált formáig vizsgálható.

Az amlodipin<sup>15</sup> és szennyezői kevésbé polárisak, az A-ImpA szennyező pedig kifejezetten apoláris jellegű, ezért folyadékromatográfias vizsgálatuknál magas szerves oldószertartalmú végső mozgófázis összetétel szükséges ahhoz, hogy a legjobban visszatartott komponens is eluálódjon az elemzés során. Az amlodipin, az A-ImpD, az A-ImpE és az A-ImpF szerkezetileg nagyon hasonlítanak egymásra, további közös tulajdonságuk, hogy primer amino csoportot tartalmaznak ( $pK_a > 10$ ), vagyis fordított fázisú körülmények között ionizált formában vizsgálhatóak. Az A-ImpH komponens az aromás rendszerhez kapcsolódó szabad karboxil csoport miatt savas karakterű ( $pK_a \sim 4$ ), ezáltal fordított fázisú körülmények között a teljesen ionvisszaszorított formától a teljesen ionizált formáig vizsgálható.

### 3.2. A kromatográfias rendszer

A minta 10 µg/mL koncentrációban tartalmazta az elválasztani kívánt komponenseket.

A mérések kivitelezéséhez bináris pumparendszerrel rendelkező ultranagy-hatékosságú folyadékkromatográfot (Acquity UPLC) és 50×2,1 mm Acquity CSH C18, 1,7 µm állófázist használtunk. A teljesen porózus szemcsés állófázis hibrid szilikából épül fel és pozitív felületi töltéssel rendelkezik. A felület C18-as alkil láncsal és utószilánizálással módosított. A gyártó elsősorban bázikus vegyületek elválasztásához ajánlja ezt a típusú töltetet.

A mozgófázis „A” komponense 30 mM-os Na-foszfát puffert tartalmazott, melynek pH-ját 2,0 és 3,2 közé állítottuk be. Alacsony pH-n az állófázis szabad szilanol csoportjai ionvisszaszorított állapotban vannak, így nem alakul ki erős kölcsönhatás a bázikus csoportot tartalmazó molekulák és az állófázis felülete között, ami szimmetrikus csúcsokat eredményez.

A mozgófázis „B” komponense acetonitril volt, mely a vízzel dipól-dipól kölcsönhatásra képes, így a biner elegy viszkozitása az összetétel függvényében lapos görbe mentén alakul, vagyis nyomásesés szempontjából kedvezőbb, mint a víz-alkohol elegyek.

A módszerfejlesztés során sokkal egyszerűbben lehet dolgozni, ha a mozgófázis „B” komponense nem tartalmaz semmilyen adalékanyagot. Igaz, ilyenkor az oldószér gradiens mellett kialakul egy koncentráció gradiens is, de mérési tapasztalatok szerint ennek nincs befolyása az elválasztás minőségére.<sup>16</sup> A fejlesztett módszerek nagyon jól reprodukálhatók. Előnye, hogy az eluens gyorsan elkészíthető, az „A” önmagában nem minősül veszélyes hulladéknak, a „B” más mérésekhez is felhasználható.

A mozgófázis térfogat-áramlási sebessége 0,5 mL/perc, az injektálási térfogat 1 µL, a detektálás hullámhossza 230 nm volt.

### 3.3. Kísérlet tervezése és kivitelezése

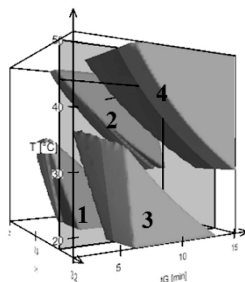
Az összes komponens tartalmazó mintaoldatot injektálva, a 3.1. pontban leírtak alapján lett felépítve a kocka, amihez az egyes mérési pontokhoz tartozó paramétereket az 1. Táblázat tartalmazza.

A 4. Ábrán látható a kész kocka. Mivel nem teljes a kocka, nem felel meg minden körülmény az elválasztásnak, vagyis vannak olyan paraméter ( $t_G$ -T-pH) kombinációk, ahol nem teljesül a korábban megfogalmazott  $R_{S,krit.} > 1,5$  feltétel a kritikus csúspárra. A 4. Ábrán négy olyan tartományt találunk, ahol kijelölhetjük a mérés paramétereit, vagyis meghatározhatjuk a munkapontot. Az 1-es és 2-es tartományok alkalmasak lehetnek a mérés kivitelezésére, de pH~2 körül az állófázis élettartama rövidebb az alkil láncok hidrolízise miatt. A 3-as tartomány szintén megfelelő lenne a munkapont kijelöléséhez, viszont a kritikus csúspárhoz tartozó felbontás nagyobb a 4-es tartományban, így a munkapont kijelölésére a 4-es tartományban került sor. A munkapont kijelölésének szempontja volt, hogy az elemzési idő rövid legyen, és az távol legyen az MODR-től.

1. Táblázat. DryLab mérési paraméterek

Mérési pont	$t_G$ (perc) 10%B→90%B	T (°C)	pH
1	3,0	20	2,0
2	9,0	20	2,0
3	3,0	50	2,0
4	9,0	50	2,0
5	3,0	20	2,6
6	9,0	20	2,6
7	3,0	50	2,6
8	9,0	50	2,6
9	3,0	20	3,2
10	9,0	20	3,2
11	3,0	50	3,2
12	9,0	50	3,2

A 4. Ábrán látható a kész kocka. Mivel nem teljes a kocka, nem felel meg minden körülmény az elválasztásnak, vagyis vannak olyan paraméter ( $t_G$ -T-pH) kombinációk, ahol nem teljesül a korábban megfogalmazott  $R_{S,krit.} > 1,5$  feltétel a kritikus csúspárra. A 4. Ábrán négy olyan tartományt találunk, ahol kijelölhetjük a mérés paramétereit, vagyis meghatározhatjuk a munkapontot. Az 1-es és 2-es tartományok alkalmasak lehetnek a mérés kivitelezésére, de pH~2 körül az állófázis élettartama rövidebb az alkil láncok hidrolízise miatt. A 3-as tartomány szintén megfelelő lenne a munkapont kijelöléséhez, viszont a kritikus csúspárhoz tartozó felbontás nagyobb a 4-es tartományban, így a munkapont kijelölésére a 4-es tartományban került sor. A munkapont kijelölésének szempontja volt, hogy az elemzési idő rövid legyen, és az távol legyen az MODR-től.



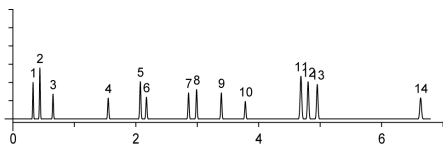
4. Ábra. DryLab kocka a munkaponttal.

A munkapont koordinátái a következők:  $t_G=10$  perc (10%B→90%B), T=45 °C, pH=3,0.

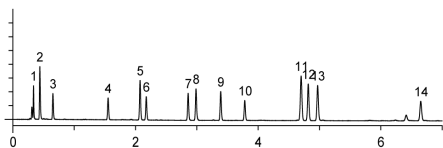
A kiindulási kísérleteknél 3 és 9 perces alapkísérletek szerepeltek, de a szoftver megbízható extrapolációja miatt a 10 perces  $t_G$ -nél is tudunk dolgozni. Az így kapott gradiens meredekség értéke 8 %B/perc. A munkaponthoz tartozó szimulált kromatogramról (5. Ábra) megállapítható, hogy

az elemzéshez szükséges idő 7 perc. Ez azt jelenti, hogy nem kell megvárni a 10 perces elemzési időt 90 %B-ig, elég, ha 10 %B-ról indulunk és hozzáadjuk a 7 perc\*8 %B/perc=56 %B eluens összetételt.

Az ilyen körülmények között elvégzett szimuláció és a mért kromatogram jó egyezést mutatnak egymással (5. és 6. Ábra). A szimulált és mért felbontás értékek is nagyon hasonlóak. A számszerű értékeket a 2. Táblázat tartalmazza.



5. Ábra. Szimulált kromatogram. Retenciói sorrend: fúmársav, B-ImpA, B-ImpL, B-ImpR, bisoprolol, B-ImpG, A-ImpD, A-ImpF, amlodipin, A-ImpE, A-ImpG, A-ImpB, A-ImpH, A-ImpH



6. Ábra. Mért kromatogram. Retenciói sorrend: fúmársav, B-ImpA, B-ImpL, B-ImpR, bisoprolol, B-ImpG, A-ImpD, A-ImpF, amlodipin, A-ImpE, A-ImpG, A-ImpB, A-ImpH, A-ImpH

2. Táblázat. A munkapont szimulált és mért  $t_R$  és  $R_S$  értékei

	Szimulált $t_R$ (perc)	Mért $t_R$ (perc)	$t_R$ különbség (perc) ( $t_{R, \text{mért}} - t_{R, \text{szimulált}}$ )	Szimulált $R_S$	Mért $R_S$
Fumársav	0,33	0,34	0,01		
B-ImpA	0,44	0,44	0,00	4,45	4,91
B-ImpL	0,65	0,65	0,00	8,06	8,34
B-ImpR	1,55	1,55	0,00	29,63	30,53
Bisoprolol	2,07	2,07	0,00	15,31	15,75
B-ImpG	2,17	2,18	0,01	2,96	3,01
A-ImpD	2,86	2,86	0,00	20,30	20,13
A-ImpF	2,99	2,99	0,00	3,86	3,70
Amlodipin	3,39	3,39	0,00	11,90	11,35
A-ImpE	3,78	3,78	0,00	11,24	10,73
A-ImpG	4,69	4,70	0,01	21,72	21,49
A-ImpB	4,80	4,82	0,02	2,55	2,52
A-ImpH	4,95	4,97	0,02	3,48	3,47
A-ImpA	6,63	6,65	0,02	36,09	34,54

### 3.4. Szimulált robusztusság vizsgálat

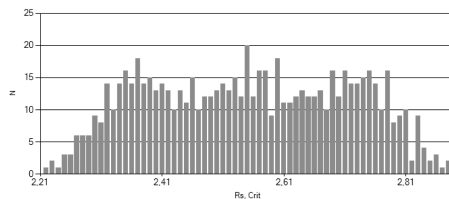
A fejlesztett módszer szimulált robusztusság vizsgálatának elvégzéséhez be kell állítani az elválasztást befolyásoló paraméterek tolerancia szintjét, vagyis hogy mennyi eltérést engedünk meg az eredeti módszerhez képest. Egyszerre hat változó hatását tudjuk vizsgálni (3. Táblázat), vagyis a szoftver  $3^6$  teljes faktoros terv szimulációját végzi el. A gyakorlatban a megengedett eltéréseket az elemzés megbízhatóságához érdemes igazítani.

3. Táblázat. Kromatográfás paraméterek és megengedett eltéréseik

Paraméterek	Értékek	± Eltérés
$t_G$ (perc)	10,0	± 0,1
T (°C)	45	± 1
pH	3,0	± 0,1
Áramlási sebesség (mL/perc)	0,500	± 0,005
Induló %B	10,0	± 0,5
Végző %B	90,0	± 0,5

A 7. Ábrán látható az összes,  $3^6=729$  db szimuláció  $R_{S, \text{krit}}$  értékének eloszlása a felbontás függvényében. Az ábráról leolvasható, hogy minden kísérlet teljesíti a korábban megfogalmazott  $R_{S, \text{krit}} > 1,5$  feltételt ( $R_{S, \text{krit, min}} = 2,21$ ,  $R_{S, \text{krit, max}} = 2,88$ ).

A szimulált robusztusság vizsgálat előnye a gyorsaság mellett, hogy figyelembe veszi a paraméterek egymásra gyakorolt hatását. A modell pontosságának igazolásához lehetetlen mind a 729 kísérlet elvégezni, ezért négy jellegzetes pont lett kiválasztva a szimulált eredmények pontosságának ellenőrzéséhez.



7. Ábra. A 729 mérés  $R_{S, \text{krit}}$  eloszlása, egy ■ jelképez egy mérési paraméterhez tartozó  $R_{S, \text{krit}}$  értéket.

Első mérési pont: az eredeti mérési paraméterek, ami a munkapontnak felel meg (Eredeti módszer). Ezek az eredmények a 2. Táblázatban is szerepelnek.

Második mérési pont: a legkisebb  $R_{S, \text{krit}}$  értékhez tartozó paraméterek (Minimum  $R_{S, \text{krit}}$ )

Harmadik mérési pont: a  $-1$ -hez tartozó paraméterek (Alacsony paraméterek), a paraméterek csak negatív irányba térnek el.

Negyedik mérési pont: a  $+1$ -hez tartozó paraméterek (Magas paraméterek), a paraméterek csak pozitív irányba térnek el.

Mind a négy pont mérési paramétereit tartalmazza az 5. Táblázat.

4. Táblázat. Mérési pontok a szimuláció jóságának megítéléséhez

Paraméterek	Eredeti módszer	Minimum $R_{S,kit}$	Alacsony paraméterek	Magas paraméterek
$t_{ij}$ (perc)	10,0	9,9	9,9	10,1
T (°C)	45	44	44	46
pH	3,0	3,1	2,9	3,1
Áramlási sebesség (mL/perc)	0,500	0,495	0,495	0,505
Induló %B	10,0	9,5	9,5	10,5
Végző %B	90,0	90,5	89,5	90,5

Az 5. Táblázat tartalmazza a robusztusság vizsgálat során kapott szimulált és mért  $t_{R}$  és  $R_{S,kit}$  értékeket. A retenciók közötti különbség gyakorlatilag elhanyagolható, a legnagyobb eltérés 0,03 perc. A kritikus felbontás értékek

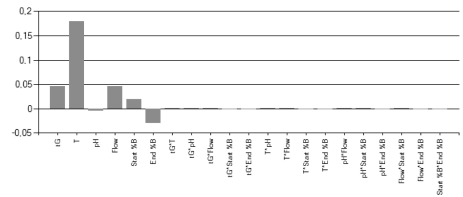
5. Táblázat. Az eredeti és robusztus paramétereken végzett kísérletek  $t_{R}$  és  $R_{S,kit}$  szimulált és mért értékei

	Eredeti módszer		Minimum $R_{S,kit}$		Alacsony paraméterek		Magas paraméterek	
	Szimulált $t_{R}$ (perc)	Mért $t_{R}$ (perc)	Szimulált $t_{R}$ (perc)	Mért $t_{R}$ (perc)	Szimulált $t_{R}$ (perc)	Mért $t_{R}$ (perc)	Szimulált $t_{R}$ (perc)	Mért $t_{R}$ (perc)
F.sav	0,33	0,34	0,33	0,34	0,36	0,35	0,30	0,30
B-ImpA	0,44	0,44	0,48	0,48	0,47	0,46	0,41	0,43
B-ImpL	0,65	0,65	0,72	0,71	0,70	0,68	0,60	0,63
B-ImpR	1,55	1,55	1,63	1,63	1,59	1,60	1,51	1,52
Bisop.	2,07	2,07	2,15	2,14	2,11	2,11	2,02	2,04
B-ImpG	2,17	2,18	2,25	2,24	2,21	2,21	2,12	2,14
A-ImpD	2,86	2,86	2,93	2,92	2,89	2,89	2,81	2,82
A-ImpF	2,99	2,99	3,05	3,04	3,03	3,02	2,93	2,94
Amlo.	3,39	3,39	3,45	3,44	3,42	3,42	3,33	3,35
A-ImpE	3,78	3,78	3,84	3,82	3,81	3,81	3,72	3,75
A-ImpG	4,69	4,70	4,72	4,72	4,74	4,76	4,61	4,64
A-ImpB	4,80	4,82	4,83	4,82	4,85	4,89	4,73	4,77
A-ImpH	4,95	4,97	4,97	4,96	5,01	5,03	4,86	4,91
A-ImpA	6,63	6,65	6,65	6,63	6,67	6,69	6,56	6,61
$R_{S,kit}$	2,55	2,52	2,22	2,19	2,29	2,29	2,81	2,84

közötti különbségeknél is 0,03 vagy kisebb eltérések tapasztalhatók. A kritikus csúcspár mind a négy esetben az A-ImpG–A-ImpB.

A kapott eredményekből megállapítható, hogy a szimulált robusztusság vizsgálat megbízható, gyorsabb és sokkal több információval szolgál, mint a hagyományosan alkalmazott, egyszerre egy faktor változtatásával mért módszer. Így a robusztusság vizsgálat ideje lecsökkenthető több napról néhány percre.

A 8. Ábra ad felvilágosítást arról, melyik paraméter vagy paraméter kombináció van legnagyobb hatással a kritikus csúcspár felbontására. Ebben az esetben a hőmérséklet a legfőbb befolyásoló tényező. Hőmérséklet változtatás hatására az A-ImpB és A-ImpG komponensek sorrendje megváltozik. Alacsonyabb hőmérsékleten az A-ImpB, míg magasabb hőmérsékleten az A-ImpG eluálódik korábban. A gradiens ideje ( $t_{ij}$ ), az áramlási sebesség, az induló és végző eluens összetétel kis mértékben befolyásolják az elválasztást, ezen a paraméterek változtatása nincs hatással a szelektivitásra. Szintén nincs hatással a szelektivitásra a pH a munkapontonál, viszont a pH csökkentésével, pH~2,5 körül a fumársav és a B-ImpA retenciója felcserélődik. A mérési paraméter kombinációja fontos információval szolgálhat az elválasztás minőségére. Itt a kombinált hatásoknak elenyésző szerepük van az elválasztásra.



8. Ábra. A kromatográfiai paraméterek hatása a felbontásra.

## Összefoglalás

A közleményben ismertetett eredmények igazolják, hogy a rendelkezésre álló számítógépes szimulációs szoftver nagymértékben hozzájárul a hatékony, gyors és költségkímélő folyadékkromatográfiai módszerfejlesztéshez. A szimuláció megbízható eredményeket szolgáltat a vizsgálati módszerről. Természetesen ezt a szoftvert csak akkor lehet hatékonyan alkalmazni, ha mögötte ott van az analitikus tudása és tapasztalata. Az UHPLC technológia előretörésével a módszerfejlesztés még gyorsabbá válhat. A gyors és robusztus folyadékkromatográfiai módszerekkel mára elérkeztünk ahhoz a határhoz, amikor nem a mérés időtartama, hanem a mintaelőkészítés gyorsasága szabja meg az elemzés idejét.

## Hivatkozások

1. ICH Guidance for industry Q8(R2), 2009.
2. ICH Guidance for industry Q11, 2012.
3. Kormány, R.; Molnár, I.; Fekete J. *LCGC Europe* **2014**, 27/5, 240–248.
4. Molnár, I.; Rieger, H.-J.; Schmidt, A.; Fekete, J.; Kormány, R. *The Column* **2014**, 10/6, 16–21.

5. Snyder, L. R.; Dolan, J. W.; Lommen, D. C. *J. Chromatogr.* **1989**, *485*, 65-89.
6. Molnár, I.; Monks, K. E. *Chromatographia* **2011**, *73*, 5-14.
7. Horváth, Cs.; Melander, W.; Molnár, I. *J. Chromatogr.* **1976**, *125*, 129-156.
8. Molnár I.; Rieger, H.-J.; Monks, K. E. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3193-3200.
9. Eurby, M. R.; Schad, G.; Rieger, H.-J.; Molnár I. *Chromatography Today* **2010**, December, 13-20.
10. Monks, K. E.; Rieger, H.-J.; Molnár I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 874-879.
11. Monks, K. E.; Molnár I.; Rieger, H.-J.; Bogáti, B.; Szabó, E. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1232*, 218-230.
12. Kormány, R.; Molnár, I.; Fekete, J.; Guillarme, D.; Fekete, Sz. *Chromatographia* **2014**, *77*, 1119-1127.
13. Public Assessment Report of Concor AMLO Amlodipine/ Bisoprolol, HU/H/0237/001-004/DC **2012**.
14. European Pharmacopoeia 8.0 *Bisoprolol* **2014**, *01/2012:1710*, 1678.
15. European Pharmacopoeia 8.0 *Amlodipine* **2014**, *04/2012:1491*, 1547.
16. Kormány, R.; Molnár, I.; Rieger, H.-J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *80*, 79-88.

## Quality by Design principle in liquid chromatography

In the last decade, an important technical evolution has occurred in pharmaceutical analysis with numerous innovative supports and advanced instruments that have been proposed to achieve fast or ultra-fast separations in liquid chromatography (LC) with an excellent sensitivity and ease of operation. Among the proposed strategies to increase the throughput, the use of short narrow-bore columns packed with sub- $5\ \mu\text{m}$  core-shell and porous sub- $2\ \mu\text{m}$  particles have emerged as the gold standards. Moreover method development is also of great importance, since in many cases it is the most time consuming step of drug development. The profiling of impurities and degradation products of active pharmaceutical ingredients (API) is one of the most challenging tasks in high performance liquid chromatography (HPLC), because of the requirements for both high-resolution and trace analysis, in addition to stringent regulatory and reporting guidelines. Finding the appropriate chromatographic conditions and then transferring the method is often challenging since it is influenced by many experimental parameters. As a consequence, the time and cost needs are high. It may happen that the method can not be transferred directly from one laboratory to another or using an alternative column is often problematic. The reasons are that selectivity and separation in LC depend on various parameters. Furthermore interactions can occur among these parameters. One of the most important requirements of modern liquid chromatography in the pharmaceutical development is that analysis time has to be as short as possible in order to improve analytical throughput. In the present paper, I focused on the application of experimental design and modeling software (DryLab) for method development. Computer modelling softwares can be applied to improve the throughput as well as to maximize information about method selectivity during the method development process. HPLC method development, robustness and Quality by Design (QbD) play an important role in the global economy, where pharmaceutical and chemical products are distributed worldwide and the method transfer process has been running for the same product in different countries and in different laboratories. Regulatory authorities (FDA, ICH, EMA, etc.) nowadays are promoting and requesting the application of QbD principles to ease the exchange of complex information about chromatographic selectivity and resolution to support method control, including method development, transfer and robustness testing. By applying QbD approaches, a better understanding and tuning of the method can be performed to ensure a requested separation in a Design Space (DS). This QbD concept has to be applied for in-process control including old conventional HPLC and as well as state-of-the-art ultra-high performance liquid chromatographic (UHPLC) separations.

The Q8(R2) and Q11 guideline of International Conference on Harmonization (ICH) clearly define the directions for API and finished product development. This means that during production and process controlling each parameter that can affect the results must be predicted.

Modeling in liquid chromatography began in 1986 when DryLab appeared, which calculated retention times ( $t_R$ ), retention factors ( $k$ ) and critical resolution ( $R_{S,crit}$ ) in one dimensional computing. After twenty-five years, it is now possible to predict the effect of three measured and eight calculated variables on the separation. This three dimensional model is often called as the „cube“. The retention modeling of DryLab is mostly based on the solvophobic theory developed by Csaba Horváth and the linear solvent strength model. These theories explain the importance and role of water in reversed phase conditions.

The setup of the DryLab cube is the first step of model based experimental design. The independent variables - in most cases - are the temperature (T), the gradient time ( $t_G$ ), and the mobile phase pH or the composition of the ternary mixture ( $t_c$ ). Two types of cube can be prepared. The  $t_G$ -T-pH cube gives information about the pH dependence of the components' retention, while the influence of the ternary mixture on the selectivity and the achievable resolution can be examined with the  $t_c$ -T- $t_G$  cube.

The main part of our research focused on the use of DryLab modeling and optimizing software. Its gain and possibilities in method development and reliability of predicted resolution were studied. Efforts were made on its implementation to every-day practice in order to increase analytical throughput and to apply QbD strategy in the field of pharmaceutical development. AS representative model compounds amlodipine and bisoprolol active pharmaceutical ingredients were selected, and their impurities from the European Pharmacopoeia (Ph.Eur.), so that the advantages of computer assisted method development can be demonstrated. Besides method development a so called "simulated robustness testing" approach was also applied. The analysis time of conventional pharmaceutical methods were drastically shortened (down to the analysis time range of 5-7 minutes). The verification of prediction accuracy showed excellent agreement between calculated and measured retention times and resolutions.

The development strategy finding in the paper is applied successfully in the analytical R&D laboratories of Egis Pharmaceuticals Plc.