

Razvoj metode titracije po Karl Fišeru primenom tzv. *Quality by Design* koncepta

Biljana S. Jančić Stojanović, Ana M. Vemić, Tijana M. Rakić, Nađa M. Kostić, Anđelija M. Malenović

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Beograd, Srbija

Izvod

Savremeni zahtevi u industriji, posebno farmaceutske, postavljeni su na konceptu ugrađivanja kvaliteta u metodu tokom njenog razvoja (eng. *Quality by Design* – QbD koncept). Ovo podrazumeva da razvoj metode započinje definisanjem cilja metode i prikupljanjem odgovarajućih podataka, nastavlja se procenom rizika, a konačna potvrda pouzdanosti metode dobija se njenom validacijom. Ovakav pristup uspešno je primenjen na metodi Karl Fišer-ove titracije za određivanje sadržaja vode u klindamicin-fosfatu. Dobijeni rezultati su u skladu sa postavljenim QbD konceptom i predstavljaju značajan napredak u primeni metode titracije po Karl Fišer-u u farmaceutske industriji.

Ključne reči: kulometrijska titracija po Karl Fišeru; *Quality by Design* koncept; klindamicin-fosfat.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

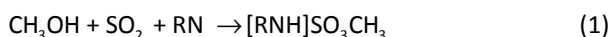
UDK 543.551.4

Hem. Ind. 66 (5) 659–665 (2012)

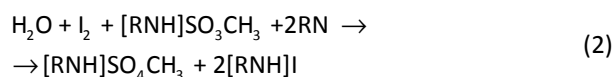
doi: 10.2298/HEMIND120120030J

Prisustvo vode ima veoma značajnu ulogu u fizičkoj i hemijskoj stabilnosti aktivnih farmaceutskih supstancija i farmaceutskih preparata jer može dovesti do njihove degradacije. Takođe, prisustvo vode olakšava mikrobiološku kontaminaciju, a to dovodi do smanjenja bezbednosti leka [1]. Zbog toga je određivanje sadržaja vode veoma čest test u specifikacijama, bilo u samoj farmaceutske supstanciji ili u farmaceutske preparatu. Najčešći način određivanja vode u farmaceutske supstanciji i farmaceutske preparatu je titracija po Karl Fišeru (KFT). Tačno određivanje sadržaja vode je važno ne samo za karakterizaciju i procenu kvaliteta farmaceutske supstancije i gotovog proizvoda, već je i ograničavajući faktor za tačnost određivanja sadržaja aktivne farmaceutske supstancije, računato na anhidrovanu supstanciju ili slobodnu bazu [2]. To znači da promenljivost rezultata dobijenih KFT direktno utiče na vrednost dobijenog sadržaja vode, ali i sadržaja aktivne farmaceutske supstancije definisane specifikacijom.

U osnovi, KFT se zasniva na modifikovanoj Bunsen-ovoj reakciji u kojoj voda stehiometrijski reaguje s jodom u odgovarajućem rastvaraču (npr. anhidrovanom metanolu) u prisustvu organske baze (npr. piridina, RN) [2]. Prvi korak ove složene reakcije jeste nastajanje piridinium metan-sulfonata ($[\text{RNH}]\text{SO}_3\text{CH}_3$):



U anhidrovanom metanolnom rastvoru joda, KF reakcija postaje:



Brzina reakcije, a time i preciznost određivanja završne tačke titracije, zavisi, u većini slučajeva, od tipa korišćene baze. Baza mora imati odgovarajući puferski kapacitet, tokom reakcije nastaju proizvodi kiselih osobina koje baza mora neutralisati zadovoljavajućom brzinom. Danas se umesto piridina koristi imidazol, ili neki drugi primarni amin, jer se pokazalo da piridin nema dovoljan puferski kapacitet, kao i da je određivanje završne tačke titracije nepouzdan. Takođe, piridin se izbegava zbog svojih toksičnih i kancerogenih efekata.

Postoje dve osnovne tehnike KFT, volumetrijska KFT (vKFT) i kulometrijska KFT (kKFT). Pored ove dve titracione tehnike, moguće je Karl Fišerovu titraciju izvoditi i primenom tzv. tehnike isparavanja, odnosno korišćenjem odgovarajuće pećnice (pKFT). Osnovne karakteristike pomenutih vrsta titracija prikazane su u tabeli 1 [3].

Generalno, razvoj metode KFT je posebno osetljiv, s obzirom na to da pored neadekvatnih titracionih uslova, postoji mogućnost odigravanja velikog broja sporednih reakcija. Na primer, kod kKFT farmaceutska supstanca može reagovati i sa jodom i sa jodidom. Takođe, kod svih prikazanih KFT tehnika, farmaceutska supstanca može reagovati i sa KF reagensom. Tako, u reakciji između aldehidne ili keto funkcionalne grupe i metanola iz reagensa nastaje voda koja se takođe titruje što dovodi do pozitivne greške u rezultatu. Ova reakcija može se izbeći korišćenjem reagenasa koji ne sadrže metanol. Veliki broj organskih supstancija može se lako oksidovati (anilini, fenoli, hidrohinoni i sl.) pa se u takvim slučajevima koristi ili kKFT ili pKFT čime se izbegavaju ove konkurentske reakcije [4]. Pored hemijske reaktivnosti, neke supstancije, u zavisnosti od svog kiselog ili baznog karaktera, mogu uticati na promenu

Prepiska: B. Jančić Stojanović, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs

Rad primljen: 20. januar, 2012

Rad prihvaćen: 15. mart, 2012

Tabela 1. Poređenje različitih tipova titracija po Karl Fišeru
Table 1. Comparison of different types of Karl Fischer titrations

Karakteristika	Volumetrijska KFT	Kulometrijska KFT	Pećnica KFT
Princip titracije	Kvantitativna analiza zasnovana je na stehiometrijskoj reakciji između jednog mola joda i jednog mola vode.	Jod se generiše elektrolitičkim putem na anodi i reaguje sa vodom; za nastajanje jednog mola joda potrebno je $2 \times 96485 \text{ C mol}^{-1}$.	Odmereni uzorak se određenim postupkom uparava, a uparena voda titruje. Metoda je pogodna za supstancije koje se ne rastvaraju u rastvaraču za titraciju, ili za uzorke koji sadrže interferirajuće supstancije.
Kalibracija i standardizacija	Potrebna. Reagens nije stabilan kao za kKFT. Titar se određuje neposredno pre upotrebe.	Nije potrebna. Određivanje je zasnovano na Faradejevim zakonima elektrolize	Nije potrebna. Određivanje je zasnovano na Faradejevim zakonima.
Održavanje uređaja	Potrebna je česta promena reagensa; čuvati zaštićeno od vazduha i svetlosti.	Potrebna je promena reagensa; čuvati zaštićeno od vazduha.	Potrebna je promena reagensa; čuvati zaštićeno od vazduha
Rastvorljivost	Uzorak mora biti rastvoran u rastvaraču.	Uzorak mora biti rastvoran u rastvaraču	–
Termostabilnost	–	–	Uzorak treba da bude termostabilan na temperaturi topljenja ili da se, kao sporedni proizvod razlaganja, ne izdvaja voda.
Reagensi	Kratak rok trajanja	Dug rok trajanja	Najduži rok trajanja
Automatizacija	Moguća	Moguća	Moguća
Opseg rada	Od 200 µg do 50 mg	Od 10 µg do 5 mg	Od 10 µg do 5 mg
Tačnost ($m_{\text{H}_2\text{O}} \pm RSD$)	> 5 mg \pm 0,5%	> 400 µg \pm 0,5%	> 400 µg \pm 0,5%
Preciznost ($m_{\text{H}_2\text{O}} \pm RSD$)	> 5 mg \pm 0,5%	> 400 µg približno 1%	> 400 µg približno 1%

pH vrednosti pa je u takvim slučajevima potrebno dodati odgovarajući pufer. Optimalna vrednost pH sredine rastvora za izvođenje titracije je od pH 5,0 do pH 7,0.

Kompleksnost razvoja metode za KFT zahteva sistematičan pristup koji treba da obezbedi adekvatnu procenu optimalnih eksperimentalnih uslova za određivanja sadržaja vode u datoj supstanciji i pruži garanciju da je predložena metoda pouzdana i robusna na uobičajne promene parametara instrumenta. U literaturi je opisano kako se primenom naučnog pristupa i procene rizika vrši razvoj KFT [3] u skladu sa *Quality by Design* (QbD) konceptom koji je definisan ICH Q 8 (R2) smernicom [5].

Cilj ovog rada je razvoj kKFT metoda za određivanje sadržaja vode u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji klindamicin-fosfatu u skladu sa principima QbD koncepta. Primenjena strategija se sastoji iz nekoliko koraka koji započinju analizom fizičko–hemijskih osobina aktivne farmaceutske supstancije i procenom optimalnih uslova titracije, nastavljaju se sistematičnim testiranjem robusnosti metode uz primenu eksperimentalnog dizajna i završavaju se validacijom metode. Na taj način, kvalitet se postepeno ugrađuje u metodu što omogućava ne samo pronalaženje eksperimentalnih optimalnih uslova za određivanje sadržaja vode, već i dizajniranje metode koja će biti robusna i moći da se odupre „izazovima“ dugotrajne primene.

EKSPERIMENTALNI DEO

Aparatura, uzorak i reagens

Eksperimentalno određivanje sadržaja vode u analiziranom uzorku (klindamicin-fosfat, serija C 4352111, rok upotrebe: 01.2015., CeraPharm, Austrija), izvršeno je na aparatu Metrohm 831 KF Coulometer, Switzerland. Kao reagens za titraciju korišćen je Hydranal-Coulomat AG, Fluka, Germany.

Optimalni eksperimentalni uslovi

Optimalni uslovi za izvođenje titracije po Karl Fišerovoj metodi su: minimalna brzina titracije 15 µg/min, relativna vrednost drifta* za zaustavljanje titracije 10 µg/min, relativna vrednost drifta za početak titracije 20 µg/min i masa ispitivanog uzorka 75 mg.

Testiranje robusnosti

Za testiranje robusnosti primenjen je frakcioni faktorski dizajn 2^{4-1} sa uslovima u centralnoj tački koji odgovaraju optimalnim eksperimentalnim uslovima: minimalna brzina titracije 15 µg/min, relativna vrednost drifta za zaustavljanje titracije 10 µg/min, relativna

* Drift – prisutna vlaga u titracionom sistemu koja ne potiče od uzorka i koja se uključuje kod izračunavanja prisutne vlage u uzorku.

vrednost drifta za početak titracije 20 µg/min i masa ispitivanog uzorka 75 mg. Plan eksperimenta prikazan je u tabeli 2.

Validacija metode

Validacija metode za farmaceutsku analizu predstavlja sistematičan postupak kojim se definišu zahtevi za metodu i potvrđuje da odabrana metoda ispunjava postavljene zahteve. U postupku validacije metode ispituje se robusnost, selektivnost/specifičnost, linearnost, opseg, tačnost, preciznost, kao i limiti detekcije i kvantifikacije kako bi se potvrdilo da se postavljenom metodom dobijaju tačni, precizni i pouzdani rezultati. Od namene predložene metode zavisi koji će se parametri ispitivati i procenjivati u postupku validacije. Kod predložene metode testirana je robusnost, specifičnost, linearnost i preciznost čime je i potvrđena pouzdanost predložene metode.

Testiranje specifičnosti metode. 75,0 mg uzorka sušeno je do konstantne mase (71,2 mg) i nakon toga izvedena je kulometrijska titracija po Karl Fišer-ovoj metodi.

Testiranje linearnosti metode. Odmerene su sledeće mase uzorka 25, 50, 75, 100 i 125 mg. Odmereni uzorci titrovani su pod optimalnim uslovima i određen je sadržaj vode u svakom uzorku izražen u mg.

Testiranje preciznosti metode. Odmereno je 6×75 mg uzorka i titrovano pod optimalnim uslovima.

PRIKAZ REZULTATA

Na osnovu skringing eksperimenata, definisani su optimalni uslovi za izvođenje titracije po Karl Fišerovoj metodi: minimalna brzina titracije 15 µg/min, relativna vrednost drifta za zaustavljanje titracije 10 µg/min, relativna vrednost drifta za početak titracije 20 µg/min i masa ispitivanog uzorka 75 mg.

Plan eksperimenta za testiranje robusnosti, kao i dobijeni rezultati određivanja sadržaja vode dati su u tabeli 2.

Parametri validacije metode, kao i dobijeni rezultati za titraciju po Karl Fišerovoj metodi za određivanje sadržaja vode u klindamicin-fosfatu prikazani su u tabeli 3.

DISKUSIJA

U ovom radu prikazan je sistematičan pristup razvoju kulometrijske titracije po Karl Fišerovoj metodi. Kako se poslednjih godina sve veći značaj pridaje fazi koja se odnosi na razvoj metode, to su i ovde primenjeni savremeni koncepti. Naime, Internacionalna konferencija za harmonizaciju je u smernici ICH Q 8 (R2) iz 2009. godine dala osnovni predlog o načinu razvoja farmaceutskog proizvoda, a takav pristup može se primeniti i na razvoj metoda koje se koriste u laboratorijama za kontrolu lekova. Tako se u literaturi mogu naći radovi sa primenom ovog savremenog i novog koncepta za razvoj metode tačne hromatografije [6–8], za određivanje vode primenom Karl Fišerove titracije [3] ili za kontrolu genotoksičnih nečistoća tokom procesa proizvodnje [9].

U ovom radu opisana je primena QbD pristupa za određivanje sadržaja vode u aktivnoj farmaceutskoj supstanciji klindamicin-fosfatu. Kao i kod drugih metoda, polazi se od definisanja cilja metode, kao i procene osnovnih karakteristika ispitivane supstancije/preparata, koje obuhvataju: oblik vode (kristalna, rastvorena ili emulgovana) u ispitivanom uzorku, sadržaj vode definisan u specifikaciji, rezultate određivanja dobijene za više serija ispitivane farmaceutske supstancije i zahteve za kvalitet. Pored toga, potrebno je sagledati mogućnosti potencijalnih korisnika predložene metode kao i opremljenost laboratorije. Odabrana supstancija klindamicin-fosfat oficinalna je prema propisu Ph. Eur 6

Tabela 2. Plan eksperimenta za frakcioni faktorski dizajn 2^{4-1} i dobijeni rezultati; x_1 – minimalna brzina titracije (µg/min), x_2 – relativna vrednost drifta za zaustavljanje titracije (µg/min), x_4 – masa uzorka (mg); prikazane su prave vrednosti faktora, dok su u zagradama date kodirane vrednosti

Table 2. Plan of experiment for fraction factorial design 2^{4-1} and the obtained results

Redni broj eksperimenta	x_1	x_2	x_3	x_4	Sadržaj vode, %
1	5 (–1)	5 (–1)	10 (–1)	50 (–1)	5,20
2	25 (+1)	5 (–1)	10 (–1)	100 (+1)	4,97
3	5 (–1)	15 (+1)	10 (–1)	100 (+1)	4,92
4	25 (+1)	15 (+1)	10 (–1)	50 (–1)	5,09
5	5 (–1)	5 (–1)	30 (+1)	100 (+1)	5,01
6	25 (+1)	5 (–1)	30 (+1)	50 (–1)	4,91
7	5 (–1)	15 (+1)	30 (+1)	50 (–1)	4,96
8	25 (+1)	15 (+1)	30 (+1)	100 (+1)	4,82
9	15 (0)	10 (0)	20 (0)	75 (0)	4,84
10	15 (0)	10 (0)	20 (0)	75 (0)	4,91
11	15 (0)	10 (0)	20 (0)	75 (0)	4,91
12	15 (0)	10 (0)	20 (0)	75 (0)	4,87

Tabela 3. Parametri validacije za titraciju po Karl Fišer-u i dobijeni rezultati validacije metode za određivanje sadržaja vode u klindamicin-fosfatu

Table 3. Parameters of validation for Karl Fischer titration and the results obtained for validation of the method for water content determination in clindamycin phosphate

Karakteristike	Postupci za validaciju	Kriterijumi za procenu	Rezultati validacije metode za određivanje vode u klindamicin-fosfatu
Specifičnost	Osušiti uzorak u kome se određuje sadržaj vode pod određenim uslovima do konstantne mase. Izvoditi titraciju na osušenom uzorku primenom izabrane KFT.	Sadržaj vode u osušenom uzorku ne bi trebalo da ima značajnu vrednost.	0% (metoda je specifična)
Linearnost	Menjati masu uzorka i izračunati parametre kalibracione krive. Kalibracionu krivu konstruisati za 5 tačaka u opsegu od 20 do 150%.	Proceniti koeficijent korelacije i značajnost odsečka na y osi.	$r = 0,9998$ $y = 0,0497x + 0,0725$ $t_b = 2,001$ ($t_{tab} = 2,78$) $p > 0,05$ odsečak nije značajan
Preciznost	Uraditi 6 određivanja sadržaja vode na istom uzorku.	Proceniti preciznost metode na osnovu vrednosti % RSD.	Srednja vrednost sadržaja vode: 5,075% RSD = 0,7%
Tačnost	Proceniti rezultate iz specifičnosti, linearnosti i preciznosti.	Proceniti tačnost metode na osnovu vrednosti % RSD i recovery.	Metoda je tačna.
Robusnost	Sprovede se eksperimenti prema odabranom eksperimentalnom dizajnu.	Rezultati se procenjuju na osnovu postavljenog cilja metode i zahteva u specifikaciji za analiziranu farmaceutsku supstancu.	Metoda je robusna.

[10] i prema zahtevu u monografiji sadržaj vode ne sme biti veći 6,0% sadržan u 0,250 g supstancije. Kako je količina supstancije velika, potrebna je i velika količina titacionog reagensa. Cilj ovog rada je da se optimiziranjem parametara metode i adekvatnim izborom mase uzorka, postavi metoda za određivanje sadržaja vode sa značajno manjom masom.

Nakon definisanja cilja metode, predstoji faza u kojoj se pretragom literature prikupljaju podaci o fizičko-hemijskim osobinama uzorka. Takođe, u ovoj fazi vrši se procena koja metoda je najpogodnija za primenu uzimajući u obzir i podatke dostupne u literaturi. U ovom radu opisana je primena kulometrijske KFT za određivanje sadržaja vode u ispitivanoj farmaceutskoj supstanciji.

U principu, izbor postupka titracije po Karl Fišeru koji će biti primenjen zavisi od sledeća tri glavna faktora: rastvorljivosti aktivne farmaceutske supstancije u anhidrovanom metanolu; kompatibilnosti aktivne farmaceutske supstancije sa reagensima KFT i njene termostabilnosti. U slučajevima kada postoji dilema koji od postupaka titracije primeniti a što primarno zavisi od prirode uzorka koji se analizira, potrebno je sprovesti dodatna istraživanja u laboratoriji [11]. U radu je primenjena kKFT kao ekonomičnija i brža od vKFT a nije bilo faktora koji bi ograničili njenu primenu.

Sledeća faza istraživanja obuhvatila je *skringing* eksperimente sa ciljem procene mogućnosti uspešnog izvođenja titracije sa manjom količinom analiziranog uzorka koji je u ovoj fazi istraživanja bio faktor koji se ispituje. Ispitivanjem uticaja različitih parametara me-

tode došlo se do zaključka da se adekvatni rezultati za količinu uzorka od 75 mg mogu dobiti pri sledećim eksperimentalnim uslovima: minimalna brzina titracije 15 $\mu\text{g}/\text{min}$, relativna vrednost drifta za zaustavljanje titracije 10 $\mu\text{g}/\text{min}$ i relativna vrednost drifta za početak titracije 20 $\mu\text{g}/\text{min}$.

Nakon što se konačno izabere metoda koja će biti primenjena (kKFT), potrebno je izvršiti odgovarajuću procenu rizika koja uglavnom uključuje primenu eksperimentalnog dizajna. U ovoj fazi se zapravo ispituje koji faktori i na koji način mogu uticati na rezultat kKFT. Faktori čiji se uticaj ispituje su najčešće: priprema uzorka, parametri titracije (minimalna brzina titracije, relativna vrednost drifta za zaustavljanje titracije, relativna vrednost drifta za početak titracije) i temperatura pećnice (ako se koristi pKFT). Oni se takođe mogu definisati kao oni koji zavise od osobina uzorka, od okoline, kao i od metode i postupka merenja.

U ovom radu je procena rizika izvršena testiranjem robusnosti metode. Robusnost metode za farmaceutsku analizu mera je njene sposobnosti da se odupre malim i namernim promenama u parametrima metode, a ujedno je i mera pouzdanosti metode tokom rutinske primene [12]. Ranije se ovaj test izvodio na kraju validacije metode, ali se pokazalo da je, u slučaju ako metoda nije robusna, potrebno ponovo sprovesti razvoj i optimizaciju metode što zahteva dosta vremena i novca. Danas se test robusnosti smatra delom validacije metode koji se izvodi na kraju razvoja metode ili na početku validacije.

Za izvođenje testa robusnosti uglavnom se predlažu dve vrste eksperimentalnog dizajna, frakcioni faktorski dizajn i Plackett-Burman-ov dizajn koji omogućavaju da se kroz relativno mali broj eksperimenata ispita uticaj relativno velikog broja faktora. U literaturi se može naći detaljan prikaz testiranja robusnosti, uključujući glavne korake i načine izračunavanja efekata [13]. Izbor dizajna koji će biti primenjen zavisi od vrste korišćene metode, broja faktora koji mogu uticati na sistem, kao i od iskustva analitičara. U slučaju primene kKFT za analizu vode u klindamicin-fosfatu procenjeno je da sledeća četiri faktora mogu imati važan uticaj: minimalna brzina titracije (x_1), relativna vrednost drifta za zaustavljanje titracije ($\mu\text{g}/\text{min}$) (x_2); relativna vrednost drifta za početak titracije ($\mu\text{g}/\text{min}$) (x_3) i masa uzorka izražena u mg (x_4). Kao optimalan dizajn izabran je frakcioni faktorski dizajn 2^{4-1} u kome se uticaj četiri faktora analizira kroz 8 eksperimenata. Drugi predloženi dizajn, Plackett-Burman-ov dizajn primenjuje se kada je broj faktora koji se ispituje veći od 4, kao što je slučaj kod hromatografskih metoda [14,15].

Primenjeni frakcioni faktorski dizajn predstavlja redukovani pun faktorski dizajn. Ovaj dizajn uglavnom se primenjuje na 2 nivoa ($k = 2$). Za k nivoa i n faktora prikazuje se kao k^{n-p} eksperimenata, pri čemu je p uvek manje od n . Broj eksperimenata k^{n-p} mora biti veći od n (broj faktora), pri čemu p predstavlja veličinu frakcije, tj. broj kolona koje su proizašle iz punog faktorskog dizajna, a svaka kolona koja je nastala kao proizvod kombinacija kolona iz faktorskog dizajna označava se kao generator dizajna. Za odabrani 2^{4-1} dizajn osnova je pun faktorski dizajn 2^4 za koji je potrebno izvesti 16 eksperimenata, pri čemu se nakon redukcije broj eksperimenata smanjuje za $\frac{1}{2}$ tako da potreban broj eksperimenata iznosi 8 [16]. U cilju provere linearnosti između nivoa -1 i $+1$ dodati su eksperimenti na nultom nivou koji su urađeni u 4 ponavljanja tako da je ukupan broj urađenih eksperimenata 12. Plan za izvođenje eksperimenta sa pravim i kodiranim vrednostima dat je u tabeli 2, kao i dobijene vrednosti za sadržaj vode. Dobijena srednja vrednost sadržaja vode je 4,95% a relativna standardna devijacija (RSD) za svih 12 eksperimenata 2,2% što pokazuje da je metoda u ispitivanim opsezima robusna.

Značaj ispitivanih faktora na odgovor sistema procenjen je statistički primenom Dong-ovog algoritma [17]. Dong-ov algoritam podrazumeva da se inicijalna procena greške zasnovana na svim efektima dobija iz izraza:

$$s_0 = 1,5 \times \text{median} | E_i | \quad (3)$$

gde je E_i vrednost efekta i . Dalje, iz s_0 izračunava se standardna greška s_1 prema izrazu:

$$s_1 = \sqrt{m^{-1} \sum E_j^2} \quad (4)$$

gde je E_j efekat čija je apsolutna vrednost manja ili jednaka $2,5 \times s_0$, a m je broj takvih efekata. Zatim se s_1 koristi za računanje tzv. granice greške (eng. *margin of error* – ME), koja je jednaka kritičnom efektu:

$$E_{\text{kritično}} = ME = t_{(1-\alpha/2, df)} \times s_1 \quad (5)$$

gde je broj stepeni slobode $df = m$, a $\alpha = 0,05$. Efekti faktora su značajni za $\geq ME$.

ME vrednost izračunata za prikazani set podataka iznosila je 0,2697. Kako je vrednost izračunatih efekata za sva četiri ispitivana faktora manja od ME, zaključeno je da nijedan od posmatranih faktora u ispitivanom opsegu nema značajan uticaj na odgovor sistema.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je metoda robusna u ispitivanom opsegu, tj. da promena izabranih faktora u posmatranim intervalima neće značajno uticati na odgovor sistema.

Sa aspekta savremenog pristupa može se reći i da je definisan prostor dizajna (eng. *Design Space*), tj. da promene minimalne brzine titracije u opsegu od 5 do 25 $\mu\text{g}/\text{min}$, relativne vrednosti drifta za zaustavljanje titracije od 5 do 15 $\mu\text{g}/\text{min}$, zatim relativne vrednosti drifta za početak titracije od 10 do 30 $\mu\text{g}/\text{min}$ i mase uzorka od 50 do 100 mg neće značajno uticati na određeni sadržaj vode u ispitivanoj farmaceutskoj supstanci.

Nakon izvođenja testa robusnosti, kroz koji je definisan i prostor dizajna, pristupilo se definisanju ostalih parametara validacije. Osnovni parametri validacije, načini kako se oni testiraju i zahtevi dati su u tabeli 3. Dobijeni rezultati za titraciju po Karl Fišer-u klindamicin-fosfata odgovaraju postavljenim zahtevima i prikazani su u tabeli 3. Na osnovu rezultata dobijenih testiranjem parametara validacije može se zaključiti da će titracija sa masom uzorka od 75 mg biti dovoljno tačna i precizna, čime je značajno smanjen utrošak reagensa, kao i vreme trajanja analize, uz poštovanje savremenih QbD koncepta.

ZAKLJUČAK

U radu je opisan razvoj titracije po Karl Fišer-u (KFT) za određivanje sadržaja vode u aktivnoj farmaceutskoj supstanci klindamicin-fosfatu. Postupak je obuhvatio definisanje cilja metode, izbor tipa KFT metode, procenu rizika testiranjem robusnosti primenom frakcionog faktorskog dizajna, i na kraju, izvođenje ostalih testova validacije. Prikazanim pristupom omogućena je pouzdana primena kulometrijske titracije po Karl Fišer-u za određivanje sadržaja vode u aktivnoj farmaceutskoj supstanci klindamicin-fosfatu korišćenjem veoma malih masa uzoraka, uz utrošak malih količina reagensa, kao i skraćivanje trajanja analize uz poštovanje savremenih QbD koncepta.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj za finansiranje istraživanja u okviru projekta 172052.

LITERATURA

- [1] S. Yoshioka, V.J. Stella, *Stability of drugs and dosage forms*, Springer, 2000.
- [2] D.A. Skoog, *Karl Fischer titration: The principle and procedure of the method*, *Fundamentals of analytical chemistry*. 8th ed, Singapore, Thomson Learning Asia, 2004.
- [3] L. Zhou, J.M. Socha, F.G. Vogt, S. Chen, A.S. Kord, A systematic method development strategy for water determination in drug substance using Karl Fischer titrations, *Am. Pharm. Rev.* **13** (2010) 74–84.
- [4] Q. Chen, Y. Wang, Challenges in the determination of water content by Karl Fischer titration during in-process control, *Am. Pharm. Rev.* **12** (2009) 48–54.
- [5] International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use, ICH harmonized tripartite guideline, 2009, *Pharmaceutical Development Q8 (R2)*.
- [6] P.F. Gavin, B.A. Olsen, A quality by design approach to impurity method development for atomoxetine hydrochloride (LY 139603), *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (2008) 431–441.
- [7] D.A. Bhatt, S.I. Rane, QbD approach to analytical RP-HPLC method development and its validation, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **3** (2011) 179–187.
- [8] P.J. Skrdla, T. Wang, V. Antonucci, T. Dowling, Z. Ge, D. Ellison, J. Curran, G. Mohan, J. Wyvrat, Use of a Quality-by-Design approach to justify removal of the HPLC weight % assay from routine API stability testing protocols, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **50** (2009) 794–796.
- [9] Z. Cimarosti, F. Bravo, P. Stonestreet, F. Tinazzi, O. Vecchi, G. Camurri, Application of quality by design principles to support development of a control strategy for the control of genotoxic impurities in the manufacturing process of a drug substance, *Org. Process Res. Dev.* **14** (2010) 993–998.
- [10] *European Pharmacopoeia*, 6th edition, Council of Europe European (COE) – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), 2007.
- [11] V. Kestens, P. Conneely, A. Bernreuther, Vaporisation coulometric Karl Fischer titration: A perfect tool for water content determination of difficult matrix reference materials, *Food Chem.* **106** (2008) 1454–1459.
- [12] ICH Harmonised Tripartite Guideline prepared within the Third International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), *Text on Validation of Analytical Procedures*, 1994.
- [13] E. Hund, Y. Vander Heyden, M. Haustein, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Robustness testing of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay: comparison of fractional and asymmetrical factorial designs, *J. Chromatogr., A* **874** (2000) 167–185.
- [14] M. Mašković, B. Jančić-Stojanović, A. Malenović, D. Ivanović, M. Medenica, Assessment of liquid chromatographic method robustness by use of Plackett-Burman design, *Acta Chromatogr.* **22** (2010) 281–296.
- [15] A. Malenović, B. Jančić-Stojanović, A. Vemić, D. Ivanović, M. Medenica, Validation of a column liquid chromatographic method for the analysis of pramipexole and its five impurities, *J. AOAC Int.* **93** (2010) 1102–1112.
- [16] S. Wold, M. Sjöström, Chemometrics, present and future success, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44** (1998) 3–14.
- [17] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24** (2001) 723–753.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF KARL FISCHER TITRATION METHOD USING QUALITY BY DESIGN CONCEPT

Biljana S. Jančić Stojanović, Ana M. Vemić, Tijana M. Rakić, Nađa M. Kostić, Anđelija M. Malenović

University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Modern trends in drug quality control are moving toward incorporating quality into the method during its development. That course is in accordance with Quality by Design (QbD) concept defined by ICH Q 8 (R2) guideline. This implies that the method development begins by defining the method goals and collecting the relevant data, *i.e.*, analyzing the properties of a given active pharmaceutical ingredient and evaluating the optimal experimental conditions. It is followed by a risk assessment defined by systematic robustness testing with the application of experimental design, while the final confirmation of the method reliability is done through the complete validation tests. In this paper, development of Karl Fischer titration for water determination in active pharmaceutical substance clindamycin phosphate is presented. Karl Fischer titration (KFT) is a widely used method in the pharmaceutical industry for determination of water content. For the analyzed substance, the European Pharmacopoeia suggests a relatively large amount of samples for the determination of water, so the objective of this study is to confirm the applicability of the developed method for the determination of water in small amount of samples applying QbD approach. According to QbD rules, detail development of coulometric Karl Fischer titration for water determination in clindamycin phosphate was done. For robustness testing, fractional factorial design 2^{4-1} was successful applied and confirmed that the method was robust. Robustness was evaluated using statistical and graphical methods. Also, design space was defined so the region in which factors could be changed without significant changes in water content was defined. At the end, other validation parameters were determined and it was proven that the analytical test system was capable of providing useful and valid analytical data.

Keywords: Coulometric Karl Fischer titration • Quality by Design concept • Clindamycin phosphate