

Testiranje robusnosti metode tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna

**Irena Kasagić Vujanović¹, Marko Jovanović², Tijana Rakić²,
Biljana Jančić - Stojanović^{2*}, Darko Ivanović²**

¹ Univerzitet u Banjoj Luci - Medicinski fakultet, Katedra za analitiku lijekova,
Ulica Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka

² Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd

Kratak sadržaj

Test robusnosti metode predstavlja deo validacije metode, a izvodi se na kraju razvoja metode ili na početku validacije. Testiranje robusnosti je uvedeno da bi se izbegli problemi u međulaboratorijskim ispitivanjima i da bi se definisali faktori koji imaju najveći uticaj na metodu. Izabrani faktori ispituju se u intervalu koji blago prevazilazi varijacije koje se očekuju kada se metoda prenosi sa jednog instrumenta/laboratorije na drugi. Za testiranje robusnosti korisno je primeniti eksperimentalni dizajn. U ovom radu opisana su dva najčešće korišćena, Plakett-Burman-ov i frakcioni faktorski dizajn. Takođe, opisani su i načini procene značajnosti faktora, zatim načini izračunavanja intervala neznačajnosti za značajne faktore, kao i postupak određivanja parametara za procenu pogodnosti sistema. Ovakav pristup procene robusnosti metode primenjen je na metodu tečne hromatografije za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća B i F. Robusnost je testirana primenom frakcionog faktorskog dizajna, a analizirana su četiri faktora kroz 11 eksperimenata. Sprovodeći i analizirajući sve predložene korake za robusnost procenjen je uticaj faktora na faktore rezolucije kao odgovore sistema, definisani su intervali neznačajnosti i određeni limiti za proveru pogodnosti sistema predložene metode.

Ključne reči: robusnost; frakcioni faktorski dizajn; itrakonazol; nečistoće;
reverzno – fazna tečna hromatografija

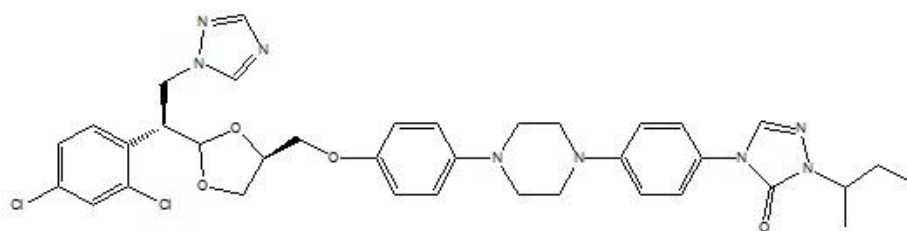
*autor za prepisku: Biljana Jančić Stojanović,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
tel: +381 11 3951 333; e-mail: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs

Uvod

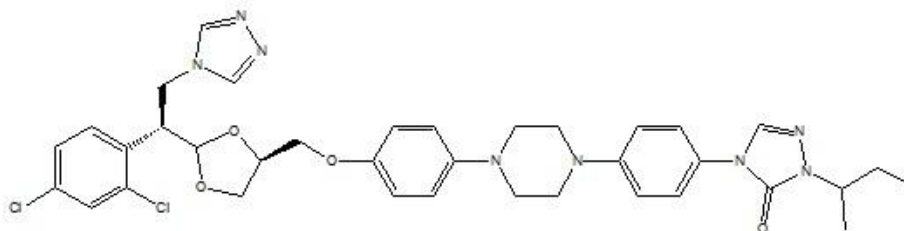
Robusnost metode za farmaceutsku analizu mera je njene sposobnosti da se odupre malim i namernim promenama u eksperimentalnim uslovima metode, a ujedno je i mera pouzdanosti metode tokom rutinske primene [1]. Postoji nekoliko definicija robusnosti koje su veoma slične, ali se u farmaceutskoj analizi danas najviše koristi definicija Međunarodne Konferencije za harmonizaciju tehničkih zahteva za registraciju farmaceutskih proizvoda za humanu upotrebu (eng. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* – ICH). ICH smernice [1], takođe, navode da „jedna od posledica procene robusnosti treba da bude i određivanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema, kako bi se obezbedila pouzdanost analitičke metode kada god se koristi”. Naime, podaci dobijeni iz testa robusnosti mogu se upotrebiti za definisanje graničnih vrednosti parametara za procenu pogodnosti sistema (eng. *System Suitability Tests* – SST). Ovakav način definisanja SST limita na osnovu eksperimentalnih podataka pouzdaniji je i značajniji od arbitrarnog pristupa koji se zasniva na iskustvu analitičara.

Cilj ovog rada je da se prikaže testiranje robusnosti metode reverzno – fazne tečne hromatografije (eng. *Reversed – Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP – HPLC) za određivanje itrakonazola i njegovih nečistoća primenom frakcionog faktorskog dizajna. Pregledom literature ustanovljeno je da nema radova koji opisuju testiranje robusnosti LC metode za analizu itrakonazola i njegovih nečistoća. Takođe, primena eksperimentalnog dizajna u testiranju robusnosti predstavlja relativno nov pristup za koji nema puno podataka u literaturi, a posebno kada je reč o frakcionom faktorskom dizajnu. Struktura analiziranog itrakonazola i njegovih nečistoća označenih kao B i F prikazana je na Slici 1.

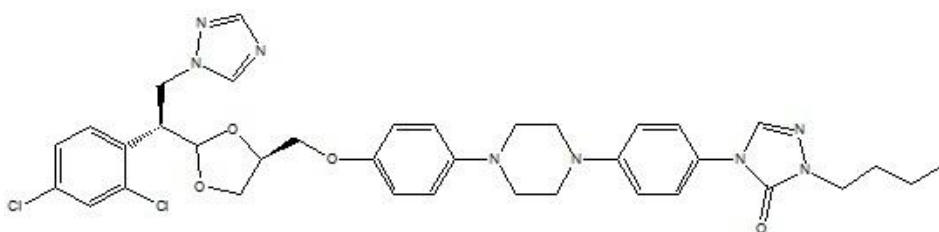
Itrakonazol je antimikotik i kao takav je oficinalan u Ph. Eur. 7, koja za određivanje srodnih supstanci propisuje LC metodu sa gradijentnim eluiranjem u trajanju od 30 minuta uz upotrebu jon par reagensa tetra-butil-amonijum-hidrogenfosfata [2]. Pored toga, u literaturi je opisana optimizacija metode tečne hromatografije za analizu itrakonazola i njegovih 12 nečistoća [3], ali za predloženi postupak nije izvršena procena robusnosti. Metoda tečne hromatografije primenjena je za analizu itrakonazola i drugih azola u kozmetičkim preparatima [4]. Takođe, može se naći veliki broj radova u kojima su prikazane metode za određivanje itrakonazola i njegovog aktivnog metabolita iz biološkog materijala [5–8]. Ekiert i saradnici [9] dali su pregled hromatografskih i elektroforetskih metoda koje su korišćene za analizu različitih triazola, između ostalog i itrakonazola. Pored toga, u literaturi je opisana spektrofotometrijska metoda za određivanje itrakonazola u supstanci za humanu upotrebu i tabletama [10].



Itrakonazol



Nečistoća B



Nečistoća F

Slika 1. Strukturne formule itrakonazola i nečistoća B i F
Figure 1. Structures of itraconazole and impurities B and F

Teorija robusnosti

Za procenu robusnosti metoda koje se primenjuju u farmaceutskoj analizi, mogu se koristiti različite vrste eksperimentalnog dizajna, a kao najčešće korišćeni su Plackett – Burman–ov dizajn [11 – 12]. i *frakcioni faktorski dizajn*. Oba dizajna, kao skrining dizajni, omogućavaju procenu uticaja glavnih faktora, što za procenu robusnosti metode i jeste od najvećeg značaja. S obzirom na to da je u ovom radu primenjen frakcioni faktorski dizajn, o njemu će biti više reči.

Frakcioni faktorski dizajn

Frakcioni faktorski dizajn [13] predstavlja redukovani *pun faktorski dizajn*, pri čemu broj eksperimenata može biti redukovan za 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 itd. Broj eksperimenata koji je potrebno izvesti u ovom dizajnu je k^{n-p} gde n označava broj faktora, p veličinu frakcije, a k broj nivoa faktora (uglavnom je $k = 2$). Frakcioni faktorski dizajn omogućava da se sa relativno malim brojem eksperimenata ispita uticaj velikog broja faktora čime se znatno skraćuje vreme i cena eksperimenata. Primena ovog dizajna pogodna je kada želimo da ispitamo samo uticaj glavnih faktora, što je upravo slučaj u testiranju robusnosti gde se smatra da se uticaji faktorskih interakcija mogu zanemariti.

Analiza frakcionog faktorskog dizajna

Efekti faktora izračunavaju se prema sledećem izrazu [11, 14]:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)-\sum Y(-)}{N/2} \quad (1)$$

gde je E_x efekat odgovarajućeg faktora, $\sum Y(+)$ i $\sum Y(-)$ sume odgovora gde je Y na ekstremnim (+) i (-) nivoima, a N broj eksperimenata definisanog dizajna. Za identifikaciju značajnih faktora koriste se grafičke i statističke metode.

Grafičko tumačenje značajnosti efekata postiže se najčešće primenom *half-normal probability* grafikona [14]. U cilju kreiranja *half-normal probability* grafikona, efekti su rangirani u nizu prema svojim apsolutnim vrednostima. „Neznačajni” faktori su oni čiji su efekti pozicionirani oko nule, dok efekti značajnih faktora znatno odstupaju od te vrednosti. Prema tome, „neznačajni” efekti koji imaju normalnu raspodelu sa središtem oko nule grupisani su oko prave linije, dok značajni efekti od te prave odstupaju [11]. Iako je upotreba *half – normal* grafikona preporučljiva u odabiru statistički značajnih efekata, u nekim slučajevima primena *Pareto* dijagrama takođe može biti korisna i dati dobre rezultate.

S druge strane, za statističku procenu značajnosti E_x koristi se *statistički t test* [11, 14]:

$$t = \frac{|E_x|}{(S.E.)_e} \quad (2)$$

gde je E_x efekat određenog faktora, a $(S.E.)_e$ standardna greška efekta. Izračunata t vrednost se poredi sa tabelarnom vrednošću, t_{tab} . Efekti kod kojih je $t \geq t_{tab}$ su značajni, dok vrednosti za $t \leq t_{tab}$ ukazuju na efekte koji nemaju značajan uticaj.

Iz prethodnog izraza može se izvesti izraz za određivanje kritične vrednosti E ($E_{kritično}$):

$$E_{\text{kritično}} = t_{\text{tab}} (\text{S.E.})_e \quad (3)$$

gde je $E_{\text{kritično}}$ kritični efekat odgovora [10]. Efekti faktora smatraju se značajnim ako je $|E_x| \geq E_{\text{kritično}}$. Vrednost t_{tab} zavisi od broja stepeni slobode (eng. *Degree of Freedom* – D. F.) za (S.E.) i primenjenog nivoa značajnosti α . Greška (S.E.)_e može biti procenjena na različite načine, a ovde će biti opisan i primenjen Dong–ov algoritam.

Dong – ov algoritam [11] podrazumeva da se inicijalna procena greške bazirana na svim efektima dobija iz izraza:

$$s_0 = 1,5 \times \text{medijana } |E_i| \quad (4)$$

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

$$s_1 = \sqrt{m^{-1} \sum E_j^2} \quad (5)$$

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:

$$E_{\text{kritično}} = \text{ME} = t_{(1-\alpha/2, \text{df})} \times s_1 \quad (6)$$

gde je $\text{df} = m$, a $\alpha=0,05$ ili $0,01$. Efekti faktora su značajni ako je vrednost $|E_x| \geq \text{ME}$.

Određivanje intervala u kojem faktor sa značajnim uticajem ne ispoljava efekat

Kada faktor ima značajan efekat na odgovor, postavlja se pitanje u kom intervalu nivoi faktora treba da budu kontrolisani da bi se eliminisao efekat [11]. Ovaj interval definiše do kog stepena je moguće varirati faktore sa značajnim uticajem, a da to ne utiče na odgovor sistema, što je od velikog značaja kod postavljanja metode u rutinskoj analizi. Ovi nivoi se računaju na sledeći način:

$$\left[X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\text{critical}}}{2|E_x|}, X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{\text{critical}}}{2|E_x|} \right] \quad (7)$$

gde su $X_{(0)}$, $X_{(1)}$ i $X_{(-1)}$ stvarne vrednosti faktora za nivoe (0), (1) i (-1).

Definisanje limita za procenu pogodnosti sistema (SST limita)

Na osnovu ICH smernica preporučuje se da se SST limiti određuju upotrebom eksperimenta iz procene robusnosti koji je pokazao najneprihvatljiviji odgovor, tzv. „uslovi sa najgorim odgovorom” [15]. „Uslovi sa najgorim odgovorom” predviđaju se iz izračunatih efekata, tako da u stvari predstavljaju kombinaciju faktora koja rezultuje

najnižim faktorom rezolucije. Da bi se definisali „uslovi sa najgorim odgovorom”, uzimaju se u obzir samo statistički značajni faktori (na $\alpha = 0,05$), a izraz koji se koristi za izračunavanje glasi:

$$Y = b_0 + \frac{E_{F_1}}{2} * F_1 + \frac{E_{F_2}}{2} * F_2 + \dots + \frac{E_{F_k}}{2} * F_k \quad (8)$$

U izrazu (8), Y predstavlja odgovor, b_0 srednju vrednost odgovora dobijenih iz dizajna, E_{F_i} efekat faktora koji se uzima kao eksperiment koji je rezultovao najgorim retencionim parametrima i F_i nivo tog faktora (-1 ili +1). Faktori koji nisu značajni održavaju se na nominalnoj vrednosti ($F_k = 0$). Dobijena vrednost odgovora Y istovremeno predstavlja i SST limit za dati odgovor.

Ekperimentalni deo

Hromatografski sistem. Analiza je vršena na hromatografskom sistemu *Waters Breeze* koji se sastoji iz *Waters 1525* binarne HPLC pumpe, *Waters 2487 UV/VIS* detektora i *Breeze Software, Windows XP* za prikupljanje i obradu podataka.

Reagensi. Za pripremu mobilne faze i rastvora korišćeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (*Sigma Aldrich*, Nemačka), tetrahidrofuran (*J. T. Backer*, Holandija), koncentrovana *orto*-fosforna kiselina (*Merck*, Nemačka) i voda HPLC kvaliteta dobijena sistemom *Millipore*.

Standardi. Itrakonazol, radni standard, *Chemo*, Quimica Sintética, Španija, Nečistoće itrakonazola (B, F), radni standardi, *Chemo*, Quimica Sintética, Španija.

Rastvori. Osnovni rastvor itrakonazola koncentracije 2 mg/mL i nečistoća B i F koncentracije 0,01 mg/mL pripremljeni su rastvaranjem odgovarajuće količine standarda u smeši metanol-tetrahidrofuran 50:50 V/V. Dalja razblaživanja su vršena u smeši ACN – H₂O 70:30, pH 3,5, pri čemu su dobijene koncentracije radnih rastvora za itrakonazol 200 µg/mL, a za nečistoće B i F 1 µg/mL. Mobilne faze za procenu robusnosti pripremljene su prema planu eksperimenata prikazanog u Tabeli I.

Tabela I Plan eksperimenata za testiranje robusnosti i dobijeni rezultati za faktor rezolucije
Table I Plan of experiments for robustness testing

Ekspiriment	A	B	C	D	R ₁	R ₂
1	48	2,3	28	0,9	12,861	2,518
2	52	2,3	28	1,1	11,539	2,405
3	48	2,7	28	1,1	14,193	2,664
4	52	2,7	28	0,9	13,583	2,201
5	48	2,3	32	1,1	12,121	2,381
6	52	2,3	32	0,9	12,906	2,127
7	48	2,7	32	0,9	15,207	2,790
8	52	2,7	32	1,1	11,028	2,008
9	50	2,5	30	1,0	13,597	2,474
10	50	2,5	30	1,0	13,584	2,474
11	50	2,5	30	1,0	13,614	2,476

A – sadržaj acetonitrila (%);

B – pH vodene faze;

C – temperatura (°C);

D – protok (ml/min)

R₁– faktor rezolucije između nečistoće B i itrakonzola;

R₂– faktor rezolucije između itrakonazola i nečistoće F

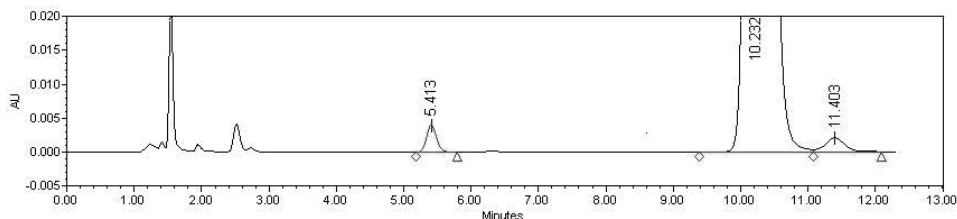
Optimalni hromatografski uslovi. Kolona: Zorbax Eclipse plus XDB – C18 (150 mm × 4,6 mm i 5 μm veličine čestica, mobilna faza smeša acetonitrila – vode u odnosu 50 : 50 V/V, pH mobilne faze 2,5 podešen koncentrovanom *orto*-fosfornom kiselinom. Protok mobilne faze je 1 mL/min, temperatura kolone 30 °C i talasna dužina detekcije 256 nm.

Rezultati i diskusija

Testiranje robusnosti metode predstavlja složen postupak koji se mora sprovesti sistematično u više koraka koji podrazumevaju: izbor faktora koji će biti testirani, definisanje nivoa faktora, izbor eksperimentalnog dizajna, definisanje eksperimentalnog protokola, definisanje odgovora koji će se pratiti, izvođenje eksperimenata i određivanje odgovora metode, izračunavanje efekata, statistička i/ili grafička analiza efekata i izvođenje hemijski relevantnih zaključaka iz statističke analize, a ukoliko je potrebno, preduzimanje mera za poboljšanje metode.

U ovom radu, opisano je sistematično izvođenje testa robusnosti za metodu RP – HPLC za analizu itrakonazola i njegove dve nečistoće B i F. Test robusnosti ranije se

izvodio na kraju postupka validacije, ali kako postoji rizik da se pokaže da metoda nije robusna, u tom slučaju metoda se mora ponovo postaviti i optimizirati, pa je preporuka da se izvodi na samom početku validacije, tj. nakon optimizacije. Za razdvajanje ispitivanih jedinjenja postavljani su optimalni hromatografski uslovi koji su navedeni u eksperimentalnom delu. Hromatogram itrakonazola i njegovih nečistoća pod optimalnim hromatografskim uslovima prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Hromatogram u centralnoj tački frakcionog faktorskog dizajna (nečistoća B ($t_r=5,413$ min), itrakonazol ($t_r=10,232$ min) i nečistoća F ($t_r=11,403$ min)) pri optimalnim hromatografskim uslovima: acetonitril – voda (50:50 V/V), pH vodene faze 2,5, temperatura kolone 30 °C, protok 1 mL/min i talasna dužina detekcije $\lambda = 256$ nm.

Figure 2. Chromatogram in central point of fractional factorial design (impurity B ($t_r=5.413$ min), itraconazole ($t_r=10.232$ min) and impurity F ($t_r=11.403$ min) under the following chromatographic conditions: acetonitrile – water (50:50 v/v), pH of the aqueous phase adjusted to 2.5, column temperature 30 °C, flow rate 1 mL min⁻¹ and $\lambda = 256$ nm

Definisani optimalni uslovi bili su osnova za pravljenje plana za izvođenje testa robusnosti. Za početak, kao faktori koji će se ispitivati u testu robusnosti izabrani su sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi (%), pH mobilne faze, temperatura kolone (°C) i protok (mL/min). S obzirom da testiranje robusnosti podrazumeva proveru ponašanja sistema koje nastaje malim i namernim promenama eksperimentalnih uslova metode, nivoi ispitivanja faktora biraju se tako da imaju mala variranja u odnosu na optimalne uslove. Tako je za acetonitril odabrano variranje ± 2 %, za pH vrednost mobilne faze $\pm 0,2$ pH jedinice, za temperaturu ± 2 °C i za protok $\pm 0,1$ mL/min. Nakon toga, odabran je eksperimentalni dizajn kojim će se ovi faktori testirati. Za odabrana 4 faktora izabran je frakcioni faktorski dizajn 2^{4-1} . Za ovaj dizajn je potrebno izvesti 8 eksperimenata, ali u cilju provere linearnosti ponašanja odgovora, potrebno je dodati i određeni broj ponavljanja u centralnoj tački. U ovom slučaju urađena su tri ponavljanja tako da je izvedeno ukupno 11 eksperimenata. Plan eksperimenta, kao i faktori i njihovi nivoi prikazani su u Tabeli I. Na ovaj način definisan je eksperimentalni protokol. Sledeći korak podrazumeva izbor odgovora koji će se pratiti. Kako faktor rezolucije (R) najbolje definiše hromatografsko razdvajanje komponenti, samim tim je najbolji

pokazatelj ponašanja nekog hromatografskog sistema, to je on odabran kao odgovor koji će se pratiti.

Kada su definisani faktori, njihovi nivoi, plan eksperimenta i odgovor sistema koji će se pratiti pristupilo se izvođenju eksperimenata prema planu datom u Tabeli I. Eksperimenti su izvedeni randomizirano – nasumično čime je izbegnut uticaj nekontrolisanih faktora koji postoje u svakom sistemu. Dobijeni rezultati za R_1 i R_2 dati su u Tabeli I.

Nakon toga, ispitan je uticaj faktora i to primenom statističke (Dong–ov algoritam) i grafičkih metoda (Pareto dijagrami i *half – normal probability* grafikoni).

Značajnost uticaja faktora najpre je procenjena primenom Dong–ovog algoritma. Načini izračunavanja i odgovarajući obrasci dati su u teorijskom delu uvoda, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli II.

Tabela II Efekti faktora i rezultati za $E_{kritično}$

Table II Factor effects and results for $E_{critical}$

Faktori	R_1	R_2
A	-1,33	-0,4
B	1,15	-0,058
C	-0,23	-0,12
D	-1,42	-0,044
$E_{kritično}$ ($\alpha=0,05$)	3,153	0,258

A – koncentracija acetonitrila (%);

B – pH vodene faze;

C – temperatura (°C);

D – protok (ml/min)

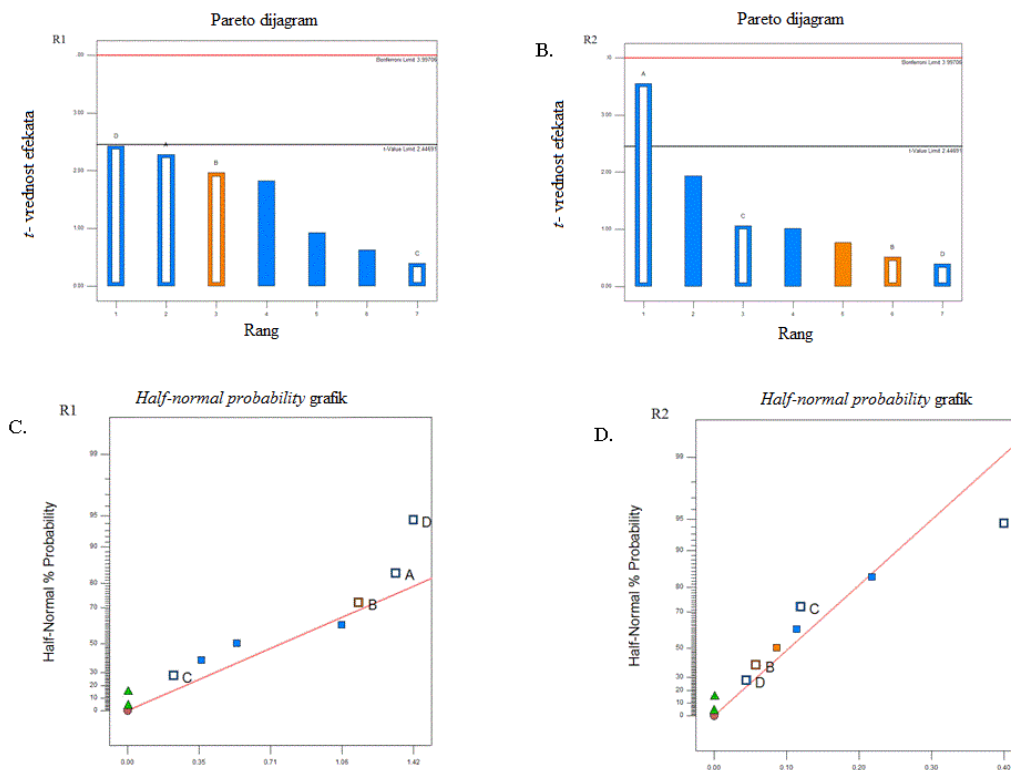
R_1 – faktor rezolucije između nečistoće B i itrakonzola;

R_2 – faktor rezolucije između itrakonazola i nečistoće F

Statistička procena efekata pokazuje da se odgovor R_1 ponaša robusno u ispitivanom opsegu, tj. sve vrednosti efekata imaju niže vrednosti od $E_{kritično}$ za verovatnoću 0,05 što pokazuje da uticaj ispitivanih faktora nije značajan. S druge strane, uticaj sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi je značajan (vrednost efekta veća je od kritične vrednosti) za odgovor R_2 dok je odgovor robusan na promene ostalih ispitivanih faktora.

Postoji preporuka da se procena uticaja faktora uvek vrši na više načina, tj. najmanje primenom dve vrste metoda (statističkih i grafičkih). Zato je ovde izvršena

procena faktorskih efekata primenom Pareto dijagrama i *half – normal probability* grafikona koji su prikazani na Slici 3.



Slika 3. A. Pareto dijagram za faktor rezolucije R₁; B. Pareto dijagram za faktor rezolucije R₂; C. *half – normal probability* grafikona za faktor rezolucije R₁; D. *half – normal probability* grafikona za faktor rezolucije R₂
Figure 3. A. Pareto diagraphs for resolution factor R₁; B. Pareto diagraphs for resolution factor R₂; C. *half-normal probability* graph for resolution factor R₁; D. *half-normal probability* graph for resolution factor R₂

Sa Slike 3 (A i B) može se zaključiti da je prema Pareto dijagramu odgovor R₁ robustan, tj. vrednosti efekata faktora su niže od odgovarajućeg *t* – limita. Za odgovor R₂ faktor A je identifikovan kao značajan. S druge strane, *half – normal probability* grafikoni (Slika 3 C i 3 D) pokazuju da je odgovor R₁ osetljiv na promene faktora A i D, dok je odgovor R₂ osetljiv na promenu faktora A i C.

Upotrebom Dong–ovog algoritma izveden je zaključak da je osetljiv samo odgovor R₂ na faktor A.

Dobijeni različiti rezultati analizom robusnosti iz dva grafička pristupa i jednim statističkim pristupom (*Dongovim* algoritmom) u skladu su sa načinom na koji različiti prisuti procenjuju kritičan efekat. Naime, *Dongov* algoritam meri odstupanja efekata

faktora od većine efekata koje su pokazali ostali faktori. Sa druge strane, tumačenje značajnosti faktora primenom grafičkih metoda može biti prilično arbitrarno, stoga je preporučljivo da se oni koriste kao potvrda statističke interpretacije, ali ne i kao jedini pouzdani način za identifikaciju značajnih faktora. U slučaju odgovora R_1 , može se primetiti da većina faktora ima ujednačen efekat na odgovor, stoga Dongovim algoritmom nijedan faktor nije identifikovan kao značajan. Pareto dijagram je dao saglasne rezultate. *Half-normal probability plot* je identifikovao faktore A i D kao potencijalno značajne, ali kako njihovo odstupanje od prave linije nije drastično veliko, može se smatrati da oni imaju nešto veći uticaj u odnosu na ostale faktore, ali da se ne moraju smatrati značajnim. Stoga je zaključeno da je odgovor R_1 robusan na ispitivane faktore. Kada je reč o odgovoru R_2 , Dongov algoritam i Pareto dijagram identifikovali su faktor A kao značajan. *Half-normal probability plot* je potvrdio značajnost faktora A, ali je ukazao i na potencijalnu značajnost faktora C. Zbog već naglašene subjektivne interpretacije rezultata ovim pristupom, izveden je zaključak da se kao definitivno značajan faktor za odgovor R_2 može smatrati faktor A.

Prednost pristupa testiranju robusnosti primenom eksperimentalnog dizajna ogleđa se i u mogućnosti izračunavanja intervala u kojem faktori sa značajnim uticajem ne ispoljavaju efekat. Upotrebom Dong-ovog algoritma izveden je zaključak da je osetljiv samo odgovor R_2 na faktor A, u skladu sa čime je prema izrazu 7 izračunat dati interval koji iznosi 48,71 – 51,29. To znači, da se faktor A može menjati u naznačenom intervalu, a da se pri tome odgovor R_2 ne menja značajno i da je u okviru njega metoda robusna.

Potom je određen SST limit. U Tabeli III, prikazani su nivoi faktora na kojima je dobijen najneprihvatljiviji rezultat za posmatrane odgovore sistema. Izračunate su vrednosti SST limita i prikazane u Tabeli III.

Tabela III Faktorski nivoi za „najgori slučaj” i SST limiti

Table III Factor levels for „the worst case experiment” and SST limits

Faktori	Odgovori	
	R_1	R_2
A	+1	+1
B	+1	+1
C	+1	+1
D	+1	+1
SST limiti	13,112	2,211

- A – sadržaj acetonitrila (%);
- B – pH vodene faze;
- C – temperatura (°C);
- D – protok (ml/min)
- R₁– faktor rezolucije između nečistoće B i itrakonzola;
- R₂– faktor rezolucije između itrakonazola i nečistoće F

Na ovaj način izvršena je procena robusnosti metode tečne hromatografije za analizu itrakonazola i njegovih nečistoća. Takođe, iz istog seta podataka dobijene su i vrednosti intervala u kojem faktori sa značajnim uticajem ne ispoljavaju efekat, kao i odgovarajući limiti za procenu pogodnosti sistema. Pristup koji uključuje eksperimentalni dizajn omogućio je da se iz rezultata dobijenih iz relativno malog broja dobro isplaniranih eksperimenata dobije veliki broj podataka koju su značajni za postavljenu RP – HPLC metodu.

Zaključak

U radu je opisan sistematičan pristup testiranju robusnosti metode RP – HPLC za analizu itrakonazola i njegove dve nečistoće B i F. Izabrani faktori ispitivani su primenom frakcionog faktorskog dizajna 2^{4-1} a robusnost postavljene metode procenjena je primenom statističkih i grafičkih postupaka. Prema Pareto dijagramima metoda je robusna na promene faktora u ispitivanom opsegu, dok je analiza *half – normal probability* grafikona pokazala veću osetljivost metode na ispitivane faktore. Konačna procena robusnosti urađena je primenom Dong–ovog algoritma koji je pokazao da je posmatrani odgovor sistema (faktor rezolucije) osetljiv na promenu sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi. Na osnovu dobijenih rezultata definisan je interval u okviru kojeg se može menjati sadržaj acetonitrila a da to nema značajan uticaj na odgovor sistema. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata definisan je parametar za proveru pogodnosti sistema (rezolucija između itrakonazola i nečistoće F treba da bude najmanje 2,2).

Zahvalnica

Autori zahvaljuju Ministarstvu za prosvetu i nauku za finansiranje istraživanja u okviru projekta 172052.

Literatura

1. 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.
2. European Pharmacopoeia, 7th edition, 2011, European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Council of Europe, Strasbourg
3. Dumarey M, Sneyers R, Janssens W, Somers I, Vander Heyden Y. Drug impurity profiling: Method optimization on dissimilar chromatographic systems: Part I: pH optimization of the aqueous phase. *Anal. Chim. Acta* 2009; 656: 85–92.
4. [Gagliardi L](#), [De Orsi D](#), [Chimenti P](#), [Porra' R](#), [Tonelli D](#). HPLC determination of imidazole antimycotics in antidandruff cosmetic products. *Anal. Sci.* 2003; 19: 1195–1197.
5. Srivatsan V, Dasgupta AK, Prashant, Datla RR, Soni S, Patel P, Patel R, Mavadhiya C. Simultaneous determination of itraconazole and hydroxyitraconazole in human plasma by high – performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2004; 1031: 307–313.
6. Koksa CHW, Sparidansb RW, Lucassenb G, Crommentuyn KML, Beijnen JH Selective high – performance liquid chromatographic assay for itraconazole and hydroxyitraconazole in plasma from human immunodeficiency virus – infected patients. *J. Chromatogr. B* 2002; 767: 103–110.
7. Chena W, Gua B, Wangb H, Pana J, Lua W, Houb H. Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles. *Intern. J. Pharmaceut.* 2008; 362: 133–140.
8. Wong JW, Nisar UR, Yuen KH. Liquid chromatographic method for the determination of plasma itraconazole and its hydroxy metabolite in pharmacokinetic/bioavailability studies. *J. Chromatogr. B: Anal Technol Biomed Life Sci* 2003; 798: 355–360.
9. Ekiert RJ, Krzek J, Talik P. Chromatographic and electrophoretic techniques used in the analysis of triazole antifungal agents – a review. *Talanta* 2010; 82: 1090–1100.
10. Parikh SK, Patel AD, Dave JB, Patel CN, Sen DJ. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of Itraconazole bulk drug and pharmaceutical formulation. *Inter. J. Drug. Develop. Res.* 2011; 3: 324–328.
11. Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers–Verbeke J., Vandeginste B.G.M., Massart D.L.: Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 24: 723–753.
12. Mašković M, Jančić-Stojanović B, Malenović A, Ivanović D, Medenica M. Assessment of liquid chromatographic method robustness employing Plackett-Burman design. *Acta Chromatogr.* 2010; 22: 281–296.
13. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström A, Petterson J, Bergman R. Experimental desing and optimization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1998; 42: 3–40.
14. Dejaegher B, Dumarey M, Capron X, Bloomfield MS, Vander Heyden Y. Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Anal Chim. Acta* 2007; 595: 59–71.
15. Vander Heyden, Y., Jimidar, M., Hund, E., Niemeijer, N., Peeters, R., Smeyers – Verbeke, J., Massart, D.L., Hoogmartens, J.: Determination of system suitability limits with a robustness test. *J. Chromatogr. A*, 1999; 845: 145–154.

Robustness testing of liquid chromatographic method for determination of itraconazole and its impurities applying fractional factorial design

**Irena Kasagić Vujanović¹, Biljana Jančić Stojanović^{2*}, Tijana Rakić²,
Marko Jovanović², Darko Ivanović²**

¹ University of Banja Luka, Faculty of Medicine, Department of Drug Analysis,
Save Mrkalja 14, 78000 Banja Luka, Republic of Srpska

² University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

* Corresponding author: jancic.stojanovic@pharmacy.bg.ac.rs; tel.: +381 11 3951 333;
fax.: +381 11 3972 840; University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Drug
Analysis, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

Test of robustness is a part of the method validation and it is carried out in the end of the method development or in the beginning of the method validation. The purpose of robustness testing is to avoid problems in interlaboratory studies and to define parameters with the greatest impact on the method. The chosen factors are investigated within the range that slightly exceeds the expected variations when the method is transferred from one instrument/laboratory to another. The application of experimental design is recommended to perform robustness testing and two most often utilized - Plackett-Burman and fractional factorial design - are described. Furthermore, the manners of evaluation of factor significance, the methods for calculation of the range of insignificance for significant factors and the procedure for determination of system suitability test parameters are described. Such an approach of robustness testing was applied to the high performance liquid chromatographic method for determination of itraconazole and its impurities B and F. The robustness is tested by using fractional factorial design and 4 factors in 11 experiments were analyzed. After the application and the analysis of all the suggested steps for robustness, the impact of factors on the system responses was evaluated, insignificance ranges were defined and system suitability test limits for suggested method were determined.

Key words: Robustness; fractional factorial design; itraconazole; impurities;
liquid chromatography
