

Aspekti primene DryLab® softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda

Jelena Terzić¹, Igor Popović^{1*}, Biljana Jančić-Stojanović²

¹ Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Vojvode Stepe 458,
11221 Beograd, Srbija

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

*autor za prepisku: Igor Popović; Tel: +381 11 3951 146; e-mail: igor.popovic@alims.gov.rs

Kratak sadržaj

U preglednom radu prikazani su aspekti primene DryLab® softvera u tečnoj hromatografiji. Literaturni pregled pokazuje široku primenu softvera u fazi postavljanja nove hromatografske metode, optimizaciji, kao i u proceni robusnosti metode. Ranije verzije DryLab® softvera omogućavale su istovremeno praćenje uticaja dva faktora na odabrani odgovor sistema, dok unapređene verzije softvera daju značajno veće mogućnosti. Novije verzije DryLab® softvera omogućavaju ispunjavanje zahteva određenih *Quality by Design* (QbD) konceptom kroz sistematičan prilaz razvoju hromatografske metode, kao i kroz konstruisanje 3D kocke kojom se omogućava vizuelni prikaz *Design space*-a. Pored toga, u rutinskoj primeni metoda tačne hromatografije softver može biti koristan „alat“ za optimizaciju u cilju skraćivanja retencionih vremena i trajanja analize, kao i olakšavanja transfera metoda (podaci dobijeni uz pomoć DryLab®-a se mogu slati elektronskim putem). Na kraju, upotrebom DryLab® softvera dobijaju se korisne informacije o metodi, a uz to može služiti za obučavanje mladih analitičara bez izvođenja eksperimenata, uz istovremenu uštedu vremena, novca i laboratorijske opreme.

Ključne reči: DryLab®, tačna hromatografija, optimizacija, robusnost, QbD

Uvod

U toku razvoja leka javlja se potreba za hromatografskim metodama osetljivim na promenu profila nečistoća leka kandidata usled promena sintetskog puta aktivne supstance i (ili) formulacije leka. Iz tog razloga potrebno je postaviti takvu hromatografsku metodu koja će imati veliku osetljivost i selektivnost čime će se obezbediti odgovarajuće ispitivanje leka tokom svih faza razvoja, proizvodnje i praćenja stabilnosti. U literaturi je opisano više pristupa razvoju hromatografskih metoda. Kod tradicionalnog pristupa razvoju metode poznatog i kao „pokušaj i greška”, specifičnost i robusnost metode tečne hromatografije pod visokim pritiskom (eng. *High Performance Liquid Chromatography Method* – HPLC) zavisi od znanja i sposobnosti analitičara, a razvoj metode je dug i naporan proces čak i za najiskusnije analitičare. Naime, tokom postavljanja nove HPLC metode koriste se kolone različitih karakteristika, različite vrste i udeli organskog rastvarača, kao i različiti dodaci u vodenu fazu kao što su jon-par reagensi, puferi, različite kiseline za podešavanje pH vrednosti mobilne faze, itd. što je zahtevno sa aspekta utroška vremena i resursa. Da bi se poboljšala efikasnost razvoja metode i obezbedila veća količina podataka o njenoj specifičnosti, danas je razvijeno i komercijalno dostupno više softvera [1]. Jedan od tih softvera je DryLab[®] (Molnar Institute, Berlin, Nemačka) koji je u upotrebi od 1986. godine i u ovom radu će i biti opisana njegova primena u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda koje se koriste u kontroli lekova.

DryLab[®] softverski paket koristi se za eksperimentalno modelovanje i podrazumeva predviđanje, tj. simulaciju hromatografskog ponašanja sistema na jednoj stacionarnoj fazi na osnovu malog broja prethodno dobro definisanih eksperimentalnih parametara (način eluiranja – izokratsko ili gradijentno, sastav mobilne faze, protok mobilne faze, temperatura kolone, pH mobilne faze, zatim karakteristike punjenja kolone – dužina i dijametar kolone, kao i dimenzije čestica stacionarne faze). Na ovaj način postiže se ušteda vremena kako pri optimizaciji metoda, tako i u njihovoj rutinskoj primeni uz smanjenje utroška resursa (skupe laboratorijske opreme – instrumenata, kolona, rastvarača...). Pored toga, primena ovog softvera olakšava transfer analitičkih metoda, brzo pruža korisne informacije o efektima promena hromatografskih faktora, ukazuje na to na koje faktore su odgovori sistema osetljiviji od drugih, a koje promene se mogu učiniti bez uticaja na kvalitet metode. Transfer analitičkih metoda između dve laboratorije predstavlja dokumentovan proces koji ima za cilj da pokaže da je laboratorija „primalac” (*the receiving unit*) kvalifikovana za korišćenje analitičke procedure koja potiče iz druge laboratorije (*the transferring unit* ili *the sending unit*). Najnovija primena ovog softvera ogleda se u mogućnosti procene robusnosti metode uz definisanje i vizuelni prikaz *Design Space*-a, kombinaciju značajnih ulaznih i procesnih parametara koji obezbeđuju kvalitet u proceni i optimizaciji metoda, što se danas

smatra posebno značajnim i korisnim sa aspekta uvođenja *Quality by Design* (QbD) koncepta u metode koje se koriste za kontrolu lekova.

Cilj ovog rada je da se prikaže pregled publikovanih radova koji opisuju upotrebu DryLab[®] softverskog paketa u postavljanju hromatografskih metoda od 2000. godine do danas. Pored toga, prikazan je i pregled radova u kojima je opisana primena softvera u proceni robusnosti metoda i novom trendu dizajniranja *Design Space*-a. Do danas je objavljeno preko 180 radova u kojima je uspešno korišćen DryLab[®] softver u različitim naučnim disciplinama. Ovde će biti opisani radovi koji pokazuju uspešnu primenu DryLab[®] softvera za optimizaciju i procenu robusnosti hromatografskih metoda koje se koriste u kontroli lekova.

Teorijska osnova

Teorijsku osnovu DryLab[®] softvera čini proučavanje termodinamičke slobodne energije hromatografskog sistema i definisanje tzv. „solvofobnih retencionih snaga” [2]. Prva teorija koja objašnjava mehanizme retencionog zadržavanja i kako različiti parametri mobilne faze i same supstance utiču na retenciono ponašanje u hromatografiji reverznih faza je solvofozna teorija profesora Csaba Horvath, Yale University. Solvofozna teorija bila je prvi model koji opisuje hromatografsko ponašanje supstanci koristeći principe klasične termodinamike. Prema teoriji, hromatografski proces je predstavljen kao reverzibilno vezivanje molekula analita sa ugljovodničnim ligandima na površini stacionarne faze. Na vezivanje dominantan uticaj ima mobilna faza, pre nego same privlačne sile između analita i liganda, a sila koja je odgovorna za vezivanje je smanjivanje nepolarne površine izložene mobilnoj fazi [3].

Solvofozna teorija se zasniva na sledećem principu: najpre se ceo hromatografski proces podeli na dva procesa, a zatim izračuna retencionu slobodnu energiju $\Delta F_{\text{assoc}}^{\circ}$ kao zbir promene standardne slobodne energije usled procesa solvatacije ΔF_j° , kao i promene standardne slobodne energije usled procesa adsorpcije analita na alkil grupe stacionarne faze $\Delta F_{\text{vdw,assoc}}^{\circ}$ [4].

Proces solvatacije sastoji se iz tri procesa i to:

1. formiranja „šupljina“ u mobilnoj fazi u cilju „prihvatanja” molekula analita $\Delta F_{c,j}$;
2. smanjenja slobodne zapremine i
3. interakcija molekula analita u „šupljinama” sa molekulima rastvarača iz njihove okoline $\Delta F_{i,j}$ [4].

Sve ove interakcije dovode do promene slobodne energije retencionog procesa opisane jednačinom (1.1.):

$$\Delta F_{\text{assoc}}^{\circ} = \Delta F_{\text{vdw, assoc}}^{\circ} + (\Delta F_{\text{c,SL}} + \Delta F_{\text{i,SL}}) - (\Delta F_{\text{c,S}} + \Delta F_{\text{i,S}}) - (\Delta F_{\text{c,L}} + \Delta F_{\text{i,L}}) - RT \ln(RT/P_0V) \quad (1.1.)$$

Iz jednačine (1.1.) izvedena je jednačina (1.2.) za retencioni faktor, merljivi hromatografski parametar:

$$\ln k = A + BD + C\Delta A + D(\kappa^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + \ln(RT/P_0V) \quad (1.2.)$$

Značenje članova u jednačini:

S – analit,

L – ligand,

SL – analit ligand kompleks,

k – retencioni faktor ili faktor kapaciteta,

A i C – konstante koje se određuju eksperimentalno,

BD – elektrostatički izraz ($D \approx 1$),

ΔA – površina solvofobnog kontakta između analita (*solute* - S) i liganada sa površine stacionarne faze (L),

γ – površinski napon,

R – gasna konstanta,

T – temperatura,

P_0 – atmosferski pritisak,

V – molarna zapremina rastvarača,

κ^e – molekularni parametar analita [3].

Jednačina (1.2.) opisuje uticaj različitih faktora na retencioni faktor k i to: uticaj mobilne faze preko površinskog napona γ koji zavisi od sastava mobilne faze, zatim uticaj temperature, uticaj strukture analita i njegovog dipol momenta, vrsta stacionarne faze, uticaj elektrostatskih osobina i slobodnih energija [2].

Solvofobna teorija je kritikovana zbog fokusa na ulogu mobilne faze u retencionom ponašanju, ne uzimajući u obzir osobine stacionarne faze. Da bi se prevazišao pomenuti nedostatak ove teorije, osobine stacionarne faze pažljivo su proučavane i implementirane u DryLab[®] softver.

DryLab[®] softver zasniva se na solvofobnoj teoriji uz primenu egzotermodinamičkih modela koji predstavljaju linearne funkcije zavisnosti $\ln k$ od parametara analita i eksperimentalnih promenljivih koje nisu termodinamičke. Egzotermodinamička zavisnost, koja se odnosi na retenciono zadržavanje analita, predstavljena je tzv. *Linear Free Energy Relationship* – LFER, koju čine:

Ulazni hromatografski podaci za DryLab® softver

Da bi se dobili optimalni uslovi, DryLab® zahteva unos retencionih vremena i površine pikova komponenti uzorka iz inicijalnih hromatografskih analiza. Praćenje pikova (eng. *peak tracking*) je opcija softvera koja predstavlja automatsko prepoznavanje pikova komponenti u dve ili više hromatografskih analiza na osnovu njihove površine. Praćenje pikova se može izvesti jednostavno i tačno uz pomoć površine pikova ukoliko je injekcioni volumen uzorka konstantan pri izvođenju osnovnih eksperimenata (*basic runs*).



Slika 1. Praćenje pikova (Peak Tracking)

(http://molnarinstitute.com/fileadmin/user_upload/images/02_molnar_software_screen_preakmatch_BIG.png)

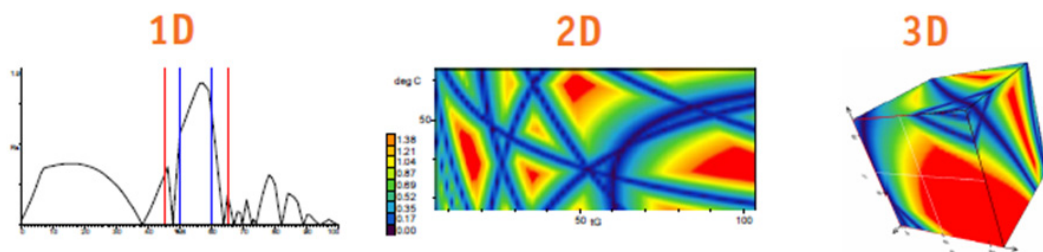
Figure 1. Peak Tracking

(http://molnarinstitute.com/fileadmin/user_upload/images/02_molnar_software_screen_preakmatch_BIG.png)

Na Slici 1. je ilustrovano pomeranje pikova u 4 „run”-a u zavisnosti od hromatografskih uslova, a identifikaciju pikova je moguće izvršiti na osnovu površine koja je označena iznad svakog od pikova. Promena površine ukazuje na moguće preklapanje pikova. Pogrešno prepoznavanje pikova između hromatografskih analiza može rezultirati pogrešnim razumevanjem hromatografskog razdvajanja i ovo

predstavlja najbitniji korak u dobijanju pouzdanih rezultata. Za proces praćenja pikova bitno je odabrati kolonu sa velikim brojem teorijskih platoa. Takođe, od presudne važnosti za praćenje pikova jeste odabir optimalnog detektora. Problemi koji se mogu javiti u procesu identifikacije pikova su: promene u retencionom vremenu, pikovi slične površine, veliki broj komponenti, nepoznati uzorak bez odgovarajućih standarda. Zbog svega navedenog poželjno je injektovati istu zapreminu uzorka u svakom inicijalnom hromatografskom eluiranju i čuvati uzorak u ledenoj vodi između dva injektovanja.

S druge strane, softverski paket DryLab[®] za potrebe generisanja modela, osim retencionih vremena i površine pikova komponenti smeše, zahteva i poznavanje karakteristika hromatografske kolone (dužina, dijametar, veličina čestica stacionarne faze); zatim protoka mobilne faze, temperature, sastava mobilne faze (sadržaj organskog rastvarača i sadržaj vodene faze sa koncentracijom modifikatora, npr. trietilamina ili koncentracija fosfatnog pufera), kao i pH vrednost mobilne faze. Generisani model hromatografskog ponašanja uzorka predstavlja se kritičnom rezolucionom mapom (*Critical Resolution Map* – CRM). Po definiciji kritična rezolucija je najmanja vrednost faktora rezolucije R_s između dva analita koji se najlošije razdvajaju (kritični par). Unosom rezultata inicijalne hromatografske analize softver izračunava kritičnu vrednost faktora rezolucije i predstavlja je grafički u funkciji jednog parametra (1D rezoluciona mapa) gde je vrednost kritične vrednosti faktora rezolucije predstavljena na y-osi, dva parametra (2D rezoluciona mapa) u kojoj je kritična vrednost faktora rezolucije predstavljena površinom odgovarajuće boje na dvodimenzionalnom grafiku zavisnosti dva ispitivana parametra i tri parametra (3D rezoluciona mapa – 3D kocka) gde je kritična vrednost faktora rezolucije predstavljena odgovarajućom bojom kako na površini, tako i u unutrašnjosti „kocke” (Slika 2).



Slika 2. Primer 1D, 2D i 3D mapa kritičnih rezolucija (modela) (http://www.lab-comp.hu/moduledata/foldertree/treeroot/Image_gallery/Termekek/DryLAB_2010_kromatografias_szoftver/DryLab_2010.pdf)

Figure 2. Examples of 1D, 2D and 3D models (http://www.lab-comp.hu/moduledata/foldertree/treeroot/Image_gallery/Termekek/DryLAB_2010_kromatografias_szoftver/DryLab_2010.pdf)

Crvenom bojom označena su polja gde je postignuta odgovarajuća separacija, dok plava boja označava uslove u kojima dolazi do koeluiranja. Iz rezolucionihi mapa mogu se sagledati uslovi za robusnost metode.

Nove mogućnosti softvera

Od 2009. godine sa verzijom DryLab[®] v. 3.9 uvodi se mogućnost istovremene optimizacije tri kritična parametra predstavljena trodimenzionalnim rezolucionihi mapama – 3D kocka (*3D Cube*). Ova pogodnost pokazala se posebno primenjivom za skraćenje vremena izvođenja metoda opisanihi u starijim izdanjima farmakopeja, kao što je to pokazao Schmidt skraćenjem vremena trajanja metode za ispitivanje stepena čistoće ebastina i njegovih farmaceutskih oblika sa 160 minuta na 3 minuta, korišćenjem DryLab[®] 4 softvera i UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) sistema [5].

DryLab[®] se pokazao poslednjih godina kao jako koristan „alat” za inkorporiranje QbD principa u razvoju analitičkih metoda, jer omogućava vizuelni prikaz *Design Space*-a, regiona u kome promene parametara metode neće uticati na njihove rezultate, kako je definisano ICH (eng. *International Conference on Harmonization*) smernicom za kvalitet Q8 (R2) [6].

Aspekti primene DryLab[®] softvera

Odabrani radovi od 2000. godine pa do danas, u kojima je DryLab[®] korišćen u fazi razvoja HPLC metoda za skrining, optimizaciju, procenu robusnosti i definisanje *Design Space*-a prikazani su u Tabeli I.

Tabela I Odabrani radovi sa primenom DryLab® softvera u tečnoj hromatografiji (HPLC i UHPLC)

Table I Selected papers with application of DryLab® software in liquid chromatography (HPLC and UHPLC)

ISPITIVANI FAKTORI	PRIMENA HPLC/UHPLC METODE	CILJ PRIMENE DRYLAB SOFTVERA	REF.
1. tG, T 2. T, %B 3. pH, tG 4. tG, T	1. UHPLC – ispitivanje stepena čistoće etinilestradiola u tabletama 2. UHPLC – kontrola procesa čišćenja u proizvodnji, uzorak od rezidua 7 steroidnih hormona – neutralne supstance 3. UHPLC – ispitivanje stepena čistoće duloksetina u kapsulama – bazne supstance 4. UHPLC – ispitivanje stepena čistoće tableta bikalutamida – polarne neutralne supstance	Optimizacija	[7]
tG, T, pH, %B	HPLC metoda za određivanje moksifloksacina i nečistoća u farmaceutskim oblicima (tableta i infuzija)	Optimizacija	[8]
pH	HPLC metoda za određivanje trimetazidin-dihidrohlorida i nečistoća u tabletama	Optimizacija	[9]
%B, pH	HPLC metoda za određivanje lerkandipina i nečistoća u API i farmaceutskim oblicima	Optimizacija	[10]
tG, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	HPLC metoda za razdvajanje smeše 8 komponenti (aktivna supstanca i 7 nečistoća)	Optimizacija	[11]
T, %B, tG	HPLC	Rešavanje problema neočekivanih hromatografskih rezultata (greške u programiranju gradijenta)	[12]
T, %B, pH i koncentracija pufera	HPLC metoda za razdvajanje smeše 9 organskih kiselina	Optimizacija	[13]
pH, %B	HPLC metoda za razdvajanje abakavira, lamivudina i zidovudina u Trizivir tabletama	Optimizacija	[14]
T, pH	HPLC metoda za razdvajanje roksitromicina od roksitromicina G i drugih srodnih supstanci	Optimizacija	[15]
T, %B	HPLC metoda za razdvajanje smeše supstanci steroidne strukture		[16]

ISPITIVANI FAKTORI	PRIMENA HPLC/UHPLC METODE	CILJ PRIMENE DRYLAB SOFTVERA	REF.
Optimizacija: tG, T, %B, pH Robusnost: tG, T, tC (% 2-propanola u acetonitrilu), protok mobilne faze, %B na početku i kraju gradijenta	UHPLC metoda za ispitivanje stepena čistoće ebastina i farmaceutskih oblika sa ovom aktivnom supstancom	Skrining, optimizacija, procena robusnosti, definisanje <i>Design Space-a</i>	[5]
Optimizacija: tG, T, pH (3D <i>Design Space</i>) koncentracija jon-par reagensa i jonska jačina rastvarača (2D <i>Eluent Design Space</i>) Robusnost: tG, T, pH, protok mobilne faze, %B na početku i kraju gradijenta	HPLC metoda za ispitivanje sadržaja i stepena čistoće pramipeksola	Procena robusnosti i definisanje <i>Design Space-a</i> u svrhu adaptacije farmakopejske metode	[17]
tG, T, pH	UHPLC metoda za ispitivanje stepena čistoće amlodipina	Optimizacija	[18]
tG, pH, T, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	UHPLC metoda za ispitivanje stepena čistoće amlodipina	Optimizacija	[19]
tG, T, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	HPLC metoda za razdvajanje smeše 7 hidrosolubilnih vitamina (B1, B2, B6, B12, C, PABA i PP)	Optimizacija, definisanje <i>Design Space-a</i>	[20]
Optimizacija: tG, T, pH Robusnost: tG, T, pH, protok mobilne faze, %B na početku i kraju gradijenta	UHPLC metoda za istovremeno određivanje sadržaja dve aktivne supstance i njihovih nečistoća u kapima za oči	Optimizacija, Definisiranje <i>Design Space-a</i> i procena robusnosti	[21]
tG, T, pH	HPLC metoda za razdvajanje smeše ftalne kiseline, vanilinske kiseline, izovanilinske kiseline, aspirina, furosemida, doksepina, terbinafina, atorvastatina i klopidogrela	Optimizacija, definisanje <i>Design Space-a</i>	[22]
tG, T, pH, tC (B1/B2 – acetonitril/metanol)	HPLC metoda za razdvajanje smeše 11 supstanci i njihovih nečistoća	Optimizacija, definisanje <i>Design Space-a</i>	[23]

tG – trajanje gradijentnog eluiranja, T – temperatura, tC – sastav trokomponentne mobilne faze (*ternary composition*), %B – udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, pH – pH vodene faze, API – aktivna supstanca (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*), HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography Method*), UHPLC (eng. *Ultra High Performance Liquid Chromatography Method*)

Iz podataka prikazanih u Tabeli I može se zaključiti da su najčešće ispitivani parametri: temperatura kolone, pH vodene faze, vreme trajanja gradijentnog eluiranja, udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi, kao i sastav trokomponentne mobilne faze.

U radovima publikovanim pre pojave nove verzije softvera DryLab[®] v. 3.9 bilo je moguće istovremeno ispitivati najviše 2 faktora, što se i može videti analizom radova [7-16]. U navedenim radovima, softver je korišćen za optimizaciju UHPLC [7] i HPLC metoda [8-16]. U radu [7] prikazan je razvoj 4 UHPLC metode primenom DryLab[®] 2010 softvera, pri čemu su na efikasan način postignuti unapred zadati ciljevi za svaku od metoda. U zavisnosti od metode praćena su po dva različita faktora – za metodu za određivanje nečistoća u tabletama etinilestradiola i za metodu za određivanje bikalutamida praćeni su trajanje gradijenta i temperatura kolone, zatim za kontrolu procesa čišćenja u proizvodnji, gde su praćene rezidue 7 steroidnih hormona, kao faktori praćeni su temperatura kolone i udeo organskog rastvarača, dok je za razdvajanje duloksetina i njegove tri nečistoće praćena pH vrednost mobilne faze i program gradijenta [7]. Za određivanje moksifloksacina i nečistoća u farmaceutskim oblicima u cilju dobijanja 2D rezolucionihi mapa razmatrane su sledeće kombinacije faktora: vreme gradijenta i sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi, vreme gradijenta i temperatura, kao i sastav eluenta i pH [8]. Takođe, mogu se naći radovi gde je posmatran samo jedan faktor, kao što je to u radu [9], gde je pri optimizaciji LC metode za određivanje trimetazidina i njegovih nečistoća kao faktor praćena pH vrednost vodene faze, a na osnovu dobijene rezolucione mape određen je optimalan region, kao i region u kome je metoda robusna. Metoda tačne hromatografije za praćenje lerkanidipina i nečistoća uspešno je optimizirana primenom DryLab[®] 2000 softvera, a praćeni su udeo acetonitrila u mobilnoj fazi i pH mobilne faze [10]. Praćenje trajanja gradijentnog eluiranja i sastava trokomponentne mobilne faze pomoću DryLab[®] 2000 plus v. 3.5 softvera opisano je u referenci [11] koja prikazuje optimizaciju HPLC metode za ispitivanje aktivne supstance i njenih sedam nečistoća. Takođe, publikovan je i rad sa primenom softvera za rešavanje problema neočekivanihi hromatografskih rezultata (greške u programiranju gradijenta) [12], kao i za rangiranje parametara prema uticaju na selektivnost metode [13] uz istovremeno praćenje po dva odabarana hromatografska faktora. U radovima [14-16] potvrđena je uspešna primena softvera za optimizaciju HPLC metoda za razdvajanje abakavira, lamivudina i zidovudina u tabletama [14],

zatim roksitromicina, njegovog homologa i srodnih supstanci [15], kao i za razdvajanje smeše steroidne strukture [16].

Navedeni radovi jasno govore u prilog uspešnoj primeni softvera tokom razvoja hromatografske metode, a potvrđuju i da se do optimalnih uslova može doći izvođenjem relativno malog broja eksperimenata. Osnovni nedostatak starijih verzija softvera ogledao se u činjenici da analitičar uvek mora da odabere dva faktora, a ostale da održava na konstantnom nivou, jer je mogućnost softvera bila samo u kreiranju 2D grafikona. Novi regulatorni zahtevi, koji se primarno ogledaju u ICH Q8 smernici koja nameće zahtev da se odgovarajućom strategijom kvalitet ugradi u sam proizvod, imali su uticaj i na pristup u razvoju metoda. Da bi metoda koja se koristi za praćenje proizvoda bila odgovarajućeg kvaliteta i davala reproduktivne i pouzdane rezultate potrebno je da i ona sama bude u skladu sa QbD konceptom. Upravo u tom pravcu je i išao dalji razvoj softvera čija je nova verzija potvrdila mogućnost razvoja metoda koje su u skladu sa QbD konceptom uz istovremenu mogućnost definisanja *Design Space* kao završni korak uspešnog razvoja metode. Nove mogućnosti softvera već su opisane u referenci [5], ali se potvrda uspešne primene nalazi i u referencama [17-23].

U radu [5] opisano je inkorporiranje *QbD* principa primenom DryLab® 4 softvera u razvoju UHPLC metode za ispitivanje stepena čistoće ebastina i njegovih farmaceutskih oblika. Primenom softvera omogućen je vizuelni prikaz *Design Space*-a, a studijom je potvrđeno da je postavljeni model za *Design Space* tačan sa relativnom greškom u predviđanju od svega 0,6 %. Pored značajnog smanjenja trajanja analize sa 160 minuta na 4 minuta pokazalo se da je postavljena metoda pogodna i za ispitivanje stabilnosti kako aktivne supstance, tako i odgovarajućih farmaceutskih oblika. U radu je softver korišćen za skrining i optimizaciju trajanja gradijenta, temperature, sastava mobilne faze i pH, kao i procenu robusnosti metode (ispitivano je 6 faktora na tri nivoa) [5]. Dalje, nova verzija DryLab® softvera (DryLab® 4) korišćena je između ostalog da bi se pokazale mogućnosti hromatografskog modelovanja u proceni robusnosti farmakopejske metode za ispitivanje stepena čistoće pramipeksola. U radu je iskorišćena nova opcija softvera *Robustness Module* za *in silico* procenu robusnosti metode [17].

U radovima [18, 19] opisana je uspešna primena nove verzije DryLab® softvera - DryLab® 2010 za razvoj hromatografske metode za određivanje amlodipina i nečistoća. Koristeći unapređenu verziju softvera praćena su tri faktora (trajanje gradijenta, temperature kolone i pH eluenta A) čime je omogućeno kreiranje 3D kocke i definisanje *Design Space*. U odnosu na farmakopejsku metodu postignuto je značajno skraćivanje vremena trajanja analize – razdvajanje je postignuto za 2 minuta, a potvrđena je i robusnost razvijene metode.

Uspešno kreiranje *Design Space* primenom softvera opisano je u referenci [20] koja navodi razvoj hromatografske metode za smešu sedam hidrosolubilnih vitamina pri

čemu su praćena tri faktora: vreme gradijenta, temperature kolone i sastav mobilne faze. Primenom softvera uspešno su postignuti definisani ciljevi kao što su maksimalna separacija u najkraćem vremenu uz istovremenu mogućnost primene novorazvijene metode na komercijalno dostupnim preparatima.

DryLab® 2010 v.4.0 softver je korišćen za definisanje *Design Space*-a, optimizaciju i procenu robusnosti UHPLC metode za istovremeno određivanje sadržaja dve aktivne supstance i njihovih nećistoća u kapima za oći [21]. Radna taćka postavljena je na osnovu dva kriterijuma: da se nalazi u centru robusnog regiona koji se na grafićkom prikazu vidi kao region oznaćen crvenom bojom i da mu je najkraće vreme izvođenja analize. Kao faktori praćeni su vreme gradijenta, temperatura kolone i pH vrednost mobilne faze.

Ćetiri kritićna parametra – trajanje gradijentog eluiranja, temperatura, pH vrednost vodene faze (eluenta A) i stacionarna faza, procenjivana su u okviru implementacije *QbD* principa u razvoju HPLC metode za razdvajanje smeše 9 supstanci (ftalna kiselina, vanilinska kiselina, izovanilinska kiselina, aspirin, furosemid, doksepin, terbinafin, atorvastatin i klopidogrel) i definisanje *Design Space*-a uz pomoć softvera za modelovanje i baza podataka o stacionarnim fazama [22]. U ovom radu je *Design Space* podeljen na dva dela *Design Space* kolone i *Design Space* mobilne faze da bi se opisao uticaj stacionarne i mobilne faze na selektivnost. Najpre je odabrana odgovarajuća kolona uz pomoć ColumnMatch® softvera, a zatim je DryLab® korišćen za definisanje *Design Space*-a mobilne faze uz pomoć 3D rezolucione kocke. Došlo se do zakljućka da kolone koje su se pokazale slićnim na osnovu pretraživanja baza, pokazuju i slićan *Eluent Design Space* [22].

Pregled radova u kojima su primenjene nove verzije DryLab® softvera pokazuje uspešnu primenu u dizajniranju *Design Space*. Kako novi trendovi u razvoju metoda nameću potrebu za tzv. naućno-zasnovanom pristupu moće se zakljućiti da je i u primeni samog softvera postignuto znaćajno unapređenje i omogućeno dobijanje velikog broja podataka koji su od znaćaja, a što je i potvrćeno nizom publikovanih radova. S obzirom da se uvođenje *QbD* koncepta sve više nameće kao sastavni deo razvoja, validacije i primene hromatografskih metoda oćekivano je da će primenljivost DryLab® softvera vremenom biti u znaćajnom porastu.

Zakljućak

U radu je prikazana primena DryLab® softvera u tećnoj hromatografiji. Literaturnim pregledom radova od 2000. godine uoćena je sve veća primena softvera, zbog mogućnosti dobijanja znaćajne kolićine podataka (10^6 hromatograma iz svega 12 dobro isplaniranih eksperimenata) uz jako mali utrošak vremena i resursa. Vreme potrebno za razvoj metode korišćenjem DryLab®-a se moće svesti na svega nekoliko dana, ćak i sati, za šta su bili potrebni meseci tradicionalnim pristupom „pokušaja i

greške”. Softver omogućava razvoj fleksibilnih metoda za rutinsku primenu u skladu sa kriterijumima QbD, olakšava transfer metoda i štedi vreme. Modelovanje je potpuno ekološki prihvatljivo, čak i poželjno, s obzirom da štedi energiju i smanjuje količinu otpada.

Literatura

1. Krisko RM, McLaughlin K, Koenigbauer MJ, Lunte CE. Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development. *J Chromatogr A*. 2006;1122(1-2):186–93.
2. Molnár I. Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: Development of DryLab software. *J Chromatogr A*. 2002;965(1–2):175–94.
3. Horváth C, Melander W, Molnár I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J Chromatogr A*. 1976;125(1):129–56.
4. Nikitas P, Papa-Louisi A. Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2009;1216(10):1737–55.
5. Schmidt AH, Molnár I. Using an innovative Quality-by-Design approach for development of a stability indicating UPLC method for ebastine in the API and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;78–79:65–74.
6. ICHQ8 (R2) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q8(R2): Pharmaceutical development (2009). http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2Guideline.pdf.
7. Fekete S, Fekete J, Molnár I, Ganzler K. Rapid high performance liquid chromatography method development with high prediction accuracy, using 5 cm long narrow bore columns packed with sub-2 μm particles and design space computer modeling. *J Chromatogr A*. 2009;1216(45):7816–23.
8. Djurdjevic P, Ciric A, Djurdjevic A, Stankov MJ. Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;50:117–26.
9. Medenica MB, Ivanovic DP, Popovic IB, Malenovic AM, Jancic BS. Computer-assisted optimization and validation of LC analysis of trimetazidine dihydrochloride and its impurities. *J Chromatogr Sci*. 2008;46(5):430–35.
10. Popovic I, Ivanovic D, Medenica M, Malenovic A, Jancic B. LC Determination of lercanidipine and its impurities using DryLab software and experimental design procedures. *Chromatographia*. 2008;67:449–54.

11. Euerby MR, Scannapieco F, Rieger HJ, Molnár I. Retention modeling in ternary solvent gradient elution reversed phase chromatography using 30 mm columns. *J Chromatogr A*. 2006;1121(2):219–27.
12. Rieger HJ, Molnár I. Advanced high performance liquid chromatography method development: discovering unexpected choices in chromatography. *J Chromatogr A*. 2002; 948(1-2):43-9.
13. Jupille TH, Dolan JW, Snyder LR, Molnár I. Two-dimensional optimization using different pairs of variables for the reversed-phase high-performance liquid Chromatographic separation of a mixture of acidic compounds. *J Chromatogr A*. 2002;948(1-2):35-41.
14. Djurdjevic P, Laban A, Markovic S, Stankov MJ. Chemometric optimization of a RP–HPLC method for the simultaneous analysis of abacavir, lamivudine, and zidovudine in tablets. *Anal Lett*. 2004;37(13):2649–67.
15. Chepkwony HK, Kamau FN, Rodriguez E, Roets E, Hoogmartens J. Isocratic liquid chromatographic method for the analysis of roxithromycin and structurally related substances in bulk samples. *Chromatographia*. 2001;54:725–9.
16. Pfeffer M, Windt H. Automatization for Development of HPLC methods. *Fresenius J Anal Chem*. 2001;369(1):36–41.
17. Schmidt AH, Stanic M, Molnár I. In silico robustness testing of a compendial HPLC purity method by using of a multidimensional design space build by chromatography modeling-Case study pramipexole. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;91:97–107.
18. Kormány R, Molnár I, Rieger HJ. Exploring better column selectivity choices in ultra-high performance liquid chromatography using Quality by Design principles. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;80:79-88.
19. Kormány R, Rieger HJ, Molnár I. Application of quality by design principles to a pharmaceutical sample using UHPLC method development with modeling technologies. *LCGC* 2013;31:20-27.
20. Wagdy HA, Hanafi RS, El-Nashar RM, Aboul-Enein HY. Determination of the design space of the HPLC analysis of water-soluble vitamins. *J Sep Sci*. 2013;36(11):1703-10.
21. Monks K, Molnár I, Rieger HJ, Bogáti B, Szabó E. Quality by Design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation. *J Chrom A*. 2012;1232:218-30.
22. Monks KE, Rieger HJ, Molnár I. Expanding the term "Design Space" in high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;56(5):874-9.
23. Molnár I, Rieger HJ, Monks KE. Aspects of the “Design Space” in high pressure liquid chromatography method development. *J Chromatogr A*. 2010;1217(19):3193–200.

Aspects of DryLab® software application in chromatography methods optimization and robustness testing

Jelena Terzić¹, Igor Popović^{1*}, Biljana Jančić-Stojanović²

¹Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Vojvode Stepe 458,
11221 Belgrade, Serbia

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

*corresponding author, Tel: +381 11 3951 146; e-mail: igor.popovic@alims.gov.rs

Summary

In this review article, aspects of DryLab® software application in liquid chromatography are given. Literature survey shows wide application of software for chromatography method development, optimization, as well as for robustness testing. Earlier versions of DryLab® software enabled the simultaneous monitoring of the impact of two parameters on the selected system response, as an upgraded version of the software provides significantly more opportunities. Namely, the new DryLab® software version enables fulfilling requirements given by Quality by Design (QbD) concept through a systematic approach to the development of chromatographic methods, and the construction of a 3D cube which provides the visualization of a Design Space. In addition, when running liquid chromatography methods on a routine basis software can be a useful tool for optimization process in order to minimize retention times and run time, as well as facilitating the transfer of a method (DryLab® data can be sent electronically). Finally, DryLab® software provides useful information about the method and can be applied to training of young analysts without performing experiments, while saving time, money, and laboratory instruments.

Keywords: DryLab®, liquid chromatography, optimization, robustness, QbD
