

Razvoj analitičkih metoda za karakterizaciju nove višekomponentne formulacije u liječenju tuberkuloze

Petruševska, Valentina

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:269864>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Valentina Petruševska

**RAZVOJ ANALITIČKIH METODA ZA
KARAKTERIZACIJU NOVE VIŠEKOMPONENTNE
FORMULACIJE U LIJEČENJU TUBERKULOZE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Valentina Petruševska

**RAZVOJ ANALITIČKIH METODA ZA
KARAKTERIZACIJU NOVE VIŠEKOMPONENTNE
FORMULACIJE U LIJEČENJU TUBERKULOZE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Ana Mornar Turk, FBF, Zagreb

Zagreb, 2020



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Valentina Petrussevska

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR
CHARACTERIZATION OF A NEW
MULTICOMPONENT FORMULATION FOR
TREATMENT OF TUBERCULOSIS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: prof. dr. sc. Ana Mornar Turk, FBF, Zagreb

Zagreb, 2020

Zahvala

Od srca zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na ustrajnom vodstvu i podršci te nadasve korisnim savjetima tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Iskreno zahvaljujem kolegama i prijateljima iz PLIVE koji su proteklih godina sa mnom dijelili svoje znanje i iskustvo. Hvala vam što ste omogućili moj stručni i osobni razvoj te podržavali me tijekom izazovnih perioda.

Osobito kolegicama Ivi Krtalić, Andrei Rašić i Korneliji Lasić veliko hvala za sve njihove savjete, ideje i pomoć kod izrade znanstvenih radova. Hvala vam što ste svojim znanjem, vrijednim radom i lijepom riječi olakšale put do ciljne linije.

Na kraju, hvala mojoj obitelji na podršci i strpljenju koje su imali za mene, osobito posljednjih osam godina za vrijeme mog poslijediplomskog studija.

Hvala Z., sve je lakše kad si tu.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Tuberkuloza.....	3
2.2. Liječenje tuberkuloze	6
2.2.1. Fiksne kombinacije lijekova.....	7
2.2.2. Niska bioraspoloživost i nekompatibilnosti aktivnih tvari za liječenje tuberkuloze	7
2.2.3. Isoniazid.....	11
2.2.4. Rifabutin.....	12
2.3. Kompatibilnost sastavnica formulacije.....	16
2.4. Analitičke tehnike za procjenu kompatibilnosti.....	19
2.4.1. Tekućinska kromatografija.....	20
2.4.2. Spektrometrija masa	23
2.4.3. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima	24
2.4.4. In vitro oslobađanje lijeka	27
2.4.5. Validacija analitičkih metoda	28
2.5. Pregled dostupnih analitičkih metoda za određivanje izoniazida i rifabutina	31
2.6. Dizajn eksperimenata u razvoju analitičkih metoda	34
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	37
3.1. Materijali	37
3.1.1. Kemikalije	37
3.1.2. Farmaceutske pomoćne tvari	38
3.1.3. Radni standardi.....	38
3.2. Instrumenti i metode.....	39
3.2.1. Priprema otopina i uzoraka	39
3.2.2. Tekućinska kromatografija.....	39
3.2.3. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima	40
3.2.4. Ispitivanje In vitro oslobađanja	40
3.2.5. Spektrometrija masa	41

3.3. Računalni programi.....	42
3.4. Priprema otopina	43
3.4.1. Priprema vodenih otopina i pufera	43
3.4.2. Priprema otopina za ispitivanje topljivosti	43
3.4.3. Priprema uzoraka za UHPLC određivanje.....	44
3.4.4. Priprema uzoraka za SFC određivanje.....	45
3.4.5. Priprema uzoraka za određivanje kompatibilnosti	46
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	48
4.1. Razvoj UHPLC metode	48
4.1.1. Određivanje topljivosti.....	49
4.1.2. Lipofilnost i koeficijent distribucije D.....	51
4.1.3. Odabir nepokretne faze.....	54
4.1.4. Odabir pokretne faze.....	56
4.1.5. Odabir protoka pokretne faze	57
4.1.6. Detekcija	58
4.1.7. Volumen injektiranja i radna koncentracija	58
4.1.8. Temperatura kolone	59
4.1.9. Dizajn eksperimenata.....	59
4.1.10. Validacija UHPLC metode.....	63
4.1.11. Analize gotovih proizvoda	71
4.1.12. Validacija MS metode za određivanje acetil izoniazida.....	72
4.1.13. Prisilna razgradnja	73
4.2. Razvoj SFC metode.....	78
4.2.1. Odabir otapala.....	78
4.2.2. Odabir nepokretne faze.....	79
4.2.3. Utjecaj modifikatora pokretne faze.....	80
4.2.4. Utjecaj aditiva.....	82
4.2.5. Dodatak vode modifikatoru pokretne faze	82
4.2.6. Dizajn eksperimenta.....	83
4.2.7. Validacija SFC metode	97
4.2.8. Analiza gotovih oblika SFC metodom.....	103
4.2.9. Prisilna razgradnja	104
4.3. Ortogonalnost	109
4.4. Kompatibilnost	111
4.4.1. Određivanje UHPLC metodom.....	111
4.4.2. Određivanje SFC metodom.....	115

4.4.3. Rezultati dugoročne stabilnosti smjese izoniazida i rifabutina.....	119
4.4.4. Određivanje nepoznatih onečišćenja spektrometrijom masa.....	120
4.5. <i>In vitro</i> oslobađanje.....	125
§ 5. ZAKLJUČAK	129
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	133
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	136
§ 8. DODATAK.....	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXVII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RAZVOJ ANALITIČKIH METODA ZA KARAKTERIZACIJU NOVE VIŠEKOMPONENTNE FORMULACIJE U LIJEČENJU TUBERKULOZE

Valentina Petruševska

Pliva Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj generičkih proizvoda, Prilaz baruna Filipovića 25, Zagreb

Terapija tuberkuloze provodi se primjenom više lijekova istovremeno. Iz tog razloga razvijeni su ljevakobiti oblici koji sadrže više aktivnih tvari (engl. *Fixed Dose Combination*, FDC). FDC su jednostavniji za primjenu zbog čega je bolja suradljivost pacijenata te su bolji ishodi liječenja. Imaju manje nuspojave, a uočena je i rjeđa pojava rezistencije. Isoniazid je prisutan u više FDC oblika na tržištu. Za neke od postojećih FDC uočena je nekompatibilnost aktivnih tvari te niža bioraspoloživost lijeka. Rifabutin je na tržištu prisutan u jednokomponentnom obliku. U svrhu razvoja nove FDC formulacije ovaj rad ispituje kompatibilnost isoniazida i rifabutina te utjecaj pomoćnih tvari na stabilnost formulacije. Razvijene su nove analitičke metode ortogonalnim tehnikama fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima i vezanog sustava tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti-spektrometrija masa. Dizajn eksperimenata korišten je u razvoju metoda. Onečišćenja nastala u studiji kompatibilnosti karakterizirana su spektrometrijom masa kako bi se predložila njihova struktura.

(143 + xxviii stranica, 40 slika, 27 tablica, 168 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: isoniazid / kompatibilnost / QbD / rifabutin / SFC / UHPLC / MS

Mentor: prof. dr. sc. Ana Mornar Turk, FBF, Zagreb

Rad prihvaćen:

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Nives Galić, PMF, Zagreb
2. Prof. dr. sc. Biljana Nigović, FBF, Zagreb
3. Prof. dr. sc. Tomislav Bolanča, FKIT, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR CHARACTERIZATION OF A NEW MULTICOMPONENT FORMULATION FOR TREATMENT OF TUBERCULOSIS

Valentina Petruševska

Pliva Croatia Ltd., Research and Development, Prilaz baruna Filipovica 25, Zagreb

Therapy of tuberculosis consists out of several medicines taken simultaneously. Fixed-Dose Combination (FDC) formulations, containing more than one active substances, are available in the world market. FDC forms are simple for usage, patient compliant, treatment outcome is improved, risk of adverse reactions is reduced and the resistance occurrence is lower. Isoniazid is present in several FDCs, although low bioavailability was reported for some due to the incompatibility of the active substances. Rifabutin is present in the market as a single active substance formulation. This doctoral thesis presents compatibility testing of isoniazid and rifabutin for the development of new FDC formulation. Furthermore, the impact of the most commonly used pharmaceutical excipients was examined. For this purpose, new analytical methods were developed utilizing the Design of Experiments. Two orthogonal analytical techniques were employed, supercritical fluid chromatography and tandem ultra high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Incompatibility products were characterized by mass spectrometry to propose their structures.

(143 +xxviii pages, 40 figures, 27 tables, 168 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: compatibility / isoniazid / QbD / rifabutin / SFC / UHPLC / MS

Supervisor: prof. dr. sc. Ana Mornar Turk, FBF, Zagreb

Thesis accepted:

Reviewers:

Prof. dr. sc. Nives Galić, PMF, Zagreb

Prof. dr. sc. Biljana Nigović, FBF, Zagreb

Prof. dr. sc. Tomislav Bolanča, FKIT, Zagreb

§ 1. UVOD

Tuberkuloza (TB) je zarazna bolest uzorkovana bakterijom iz roda *Mycobacterium tuberculosis*. Premda bolest prvenstveno zahvaća pluća, zabilježeno je širenje se i na druge organe. Kroz povijest, tuberkuloza je bila uzrok velikog broja smrtnih slučajeva, a i danas se broj oboljelih broji u milijunima.¹

Dugotrajna upotreba visokih doza antibiotika standardna je terapija tuberkuloze zbog čega se često tijekom liječenja razvija rezistencija na primijenjene lijekove. Upravo je rezistencija na terapiju glavni razlog zašto je ova dugo poznata bolest i danas vrlo prisutna. Liječenje TB nije značajno mijenjano tijekom godina te uključuje četiri osnovna lijeka (izoniazid, rifampicin, pirazinamid i etambutol) u prvoj liniji terapije.¹⁻³ Liječenje samo jednim antibiotikom pokazalo je znatno brži razvitak rezistencije nego što je to slučaj kod primjene kombinacije više aktivnih tvari istovremeno. Stoga je monoterapijski pristup u potpunosti napušten te Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) preporuča istovremenu upotrebu više aktivnih tvari u liječenju, bilo kao liječenje primjenom više jednokomponentnih gotovih oblika ili primjenom jednog višekomponentnog oblika (engl. *Fixed Dose Combination*, FDC).⁴

FDC formulacije imaju niz prednosti: jednostavnije su za primjenu, bolja je suradljivost pacijenata, bolji su ishodi liječenja, rjeđi je razvoj rezistencije te niži trošak razvoja lijeka. Značajna prednost je i smanjenje troškova terapije osobito u slučaju dugotrajnog liječenja kakvo se provodi kod infekcije *M. tuberculosis*.^{4,5}

Jedan od najpouzdanijih i najčešće korištenih antituberkulotika je izoniazid. Djeluje na inhibiciju sinteze mikolinske kiseline koja je važna komponenta bakterijske stanične stjenke. U terapiji se najčešće koristi u kombinaciji s drugim antituberkuloticima i to prvenstveno s antibioticima iz terapijske skupine rifamicina. FDC formulacija, koja sadrži izoniazid i najprimjenjiviji rifamicinski antibiotik rifampicin, prisutna je na tržištu i vrlo se često koristi u terapiji oboljelih od tuberkuloze. Međutim, za rifampicin je prijavljena niska bioraspoloživost zbog nekompatibilnosti s izoniazidom u kiselom mediju.⁶⁻¹³ Slično je prijavljeno i za lijek iz iste skupine antibiotika i slične strukture kao rifampicin, rifapentin.¹⁴

Rifabutin, još jedan od lijekova iz rifamicinske skupine antibiotika, koristi se u antituberkulotskoj terapiji pacijenata zaraženih virusom humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*, HIV). Kliničke studije provedene s rifabutinom pokazuju manju učestalost pojave interakcija s drugim lijekovima u odnosu na rifampicin.^{15,16,17} To je značajna prednost osobito za pacijente koji se istovremeno liječe od tuberkuloze i od HIV-a. Trenutno nema objavljenih podataka o nižoj bioraspoloživosti rifabutina zbog nekompatibilnosti s izoniazidom, te na tržištu ne postoji FDC oblik koji sadrži ove dvije aktivne tvari.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kompatibilnost dviju aktivnih komponenti, izoniazida i rifabutina, za potrebe razvoja nove FDC formulacije te procijeniti utjecaj pomoćnih tvari na stabilnost aktivnih tvari i formulacije. U radu će se koristiti dvije ortogonalne analitičke tehnike; tehnika tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) vezana sa spektrometrijom masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS), za potrebe dodatnog načina detekcije, te tehnika fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC). Primjena ortogonalnih tehnika u analizi značajno povećava vjerojatnost uspješnog određivanja svih analita te mogućnost otkrivanja nekompatibilnosti sastavnica formulacije.^{18,19} Kako bi osigurali pouzdanost i robusnost u razvoju analitičkih metoda primijenit će se principi dizajna eksperimenata (engl. *Design of experiments*, DoE). Računalni programi JMP i DryLab[®] koristit će se za modeliranje promjena različitih kromatografskih parametara te za procjenu utjecaja promjene uvjeta na kritične attribute metode (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA).^{20–22}

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Tuberkuloza

Tuberkuloza je zarazna bolest koju uzrokuje bakterija iz roda *Mycobacterium tuberculosis*. Procjenjuje se da je čak četvrtina svjetskog stanovništva zaražena ovom bakterijom. Rizik obolijevanja od tuberkuloze ovako velikog broja ljudi, ali i činjenica da je tuberkuloza jedan od deset najčešćih uzroka smrti u svijetu, govori u prilog tome da je ova dugo poznata bolest i danas prijetnja javnom zdravstvu.^{1,23}

Tuberkuloza je kao bolest prisutna tisućama godina. Prvi soj bakterija povezan s današnjim uzročnikom pojavio se prije otprilike 20000 godina, a prvi zapisi o bolesti potječu iz Indije prije otprilike 3300 godina.²⁴ Koliko je dugo ova bolest prisutna govori i činjenica da su promjene karakteristične za oboljele od tuberkuloze pronađene na egipatskim mumijama.²⁵ U razdoblju od 17. do 19. stoljeća bolest poprima epidemijske razmjere pa je zabilježeno da je godišnje čak četvrtina stanovništva Engleske umirala od posljedica ove bolesti.³ Bez obzira na proširenost i učestalost javljanja bolesti njen uzročnik nije bio poznat jako dugo vremena. Tek krajem 19. stoljeća, točnije 1882. godine njemački znanstvenik Robert Koch uspijeva izolirati uzročnika, *M. tuberculosis*.²⁶ Od tog trenutka traju naponi znanstvenika da se pronađe učinkovit i siguran lijek te bolest stavi pod nadzor.

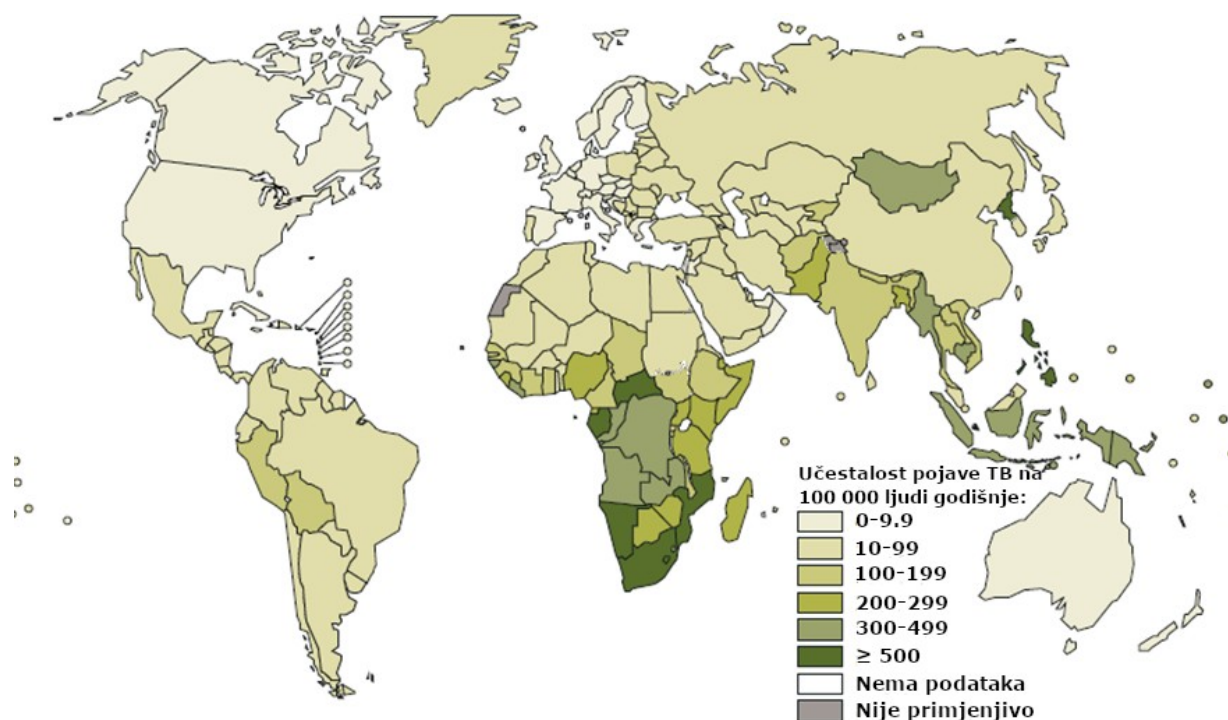
Tuberkuloza uglavnom zahvaća pluća, ali zabilježena je i na drugim organima poput mozga, kože, kostiju, zglobova, grkljana, limfnih čvorova, probavnog trakta, genitalnog i mokraćnog sustava. Prenosi se kapljičnim putem prilikom kihanja, kašljanja ili govora, sa zaražene osobe na zdravu.²⁷ Upravo zbog toga su tuberkuloze pluća i grkljana najzarazniji oblici bolesti.

Primarna infekcija obično nema simptoma. Inkubacijski period traje od 2 do 10 tjedana²⁷ nakon čega izloženost ne mora nužno dovesti do razvitka bolesti. Simptomi bolesti su kašalj, bol u prsima te krv prilikom iskašljavanja. Pacijent često osjeća umor i opću slabost, gubi na težini, a nerijetko razvija simptome poput treskavice, noćnog znojenja i vrućice.³

Većina zaraženih ima latentni oblik bolesti koji nema simptoma, a može se reaktivirati prilikom slabljenja imunološkog sustava. Opće stanje organizma je jako važan čimbenik pa starije osobe oslabljenog imuniteta, mala djeca do 3 godine, HIV-pozitivne osobe, pušači,

ovisnici o drogama i alkoholu te osobe na imunosupresivnoj terapiji imaju najveći rizik od obolijevanja nakon izlaganja bakteriji uzročnika.

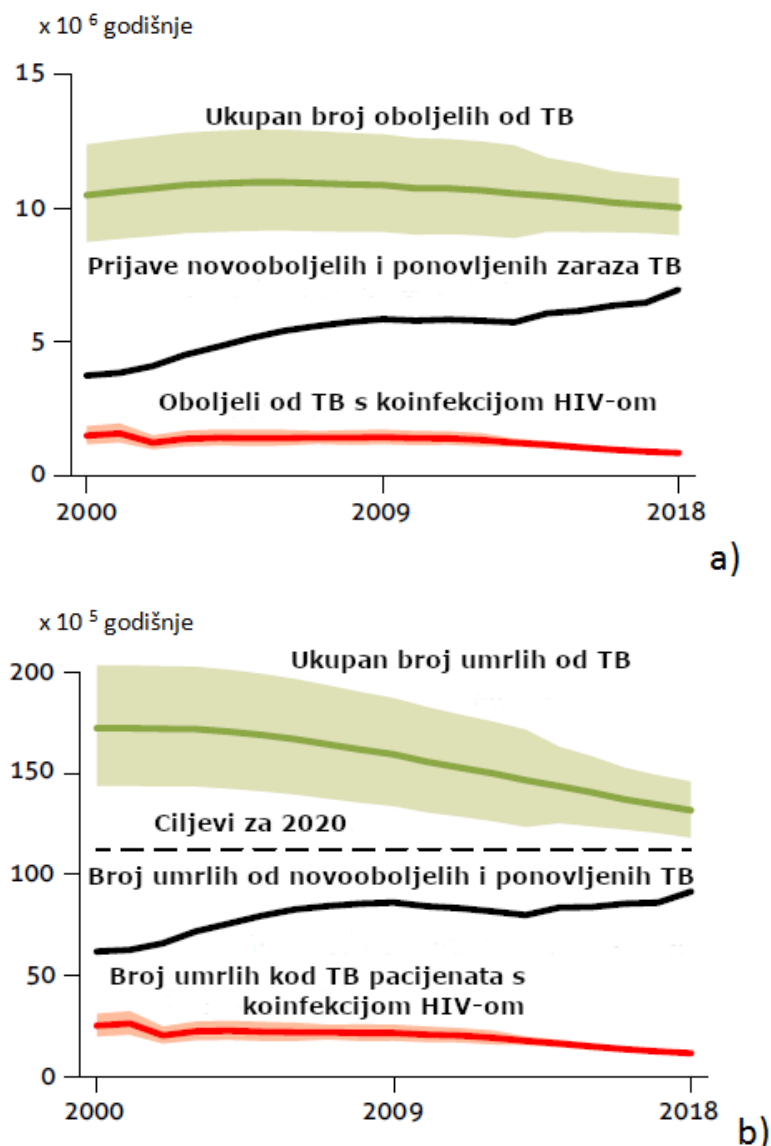
Bolest je osobito raširena na području slabo razvijenih zemalja Azije i Afrike (slika 1).¹ Indija, Kina, Indonezija, Filipini, Pakistan, Nigerija, Bangladeš i Južna Afrika prednjače po broju zaraženih i zabilježenih pacijenata.



Slika 1. Pojava tuberkuloze u svijetu, 2018. godina¹

WHO i Ujedinjeni narodi (engl. *United nations*, UN) ulažu napore i značajna sredstva u zaustavljanje širenja TB i suzbijanje oblika bolesti otpornih na lijekove (engl. *multidrug resistant tuberculosis*, MDR-TB; engl. *extradrug resistant tuberculosis*, XDR-TB) u svijetu. Njihov krajnji cilj je zaustavljanje epidemije tuberkuloze do 2030. godine uz postepeno smanjenje broja oboljelih i umrlih kroz ciljeve postavljene za 2020., i 2025. godinu.¹

Broj novozaraženih od oko 10 milijuna, od čega čak oko milion djece u 2018. godini te broj umrlih od oko 1,5 milijuna ukazuje da ciljevi planirani za 2020. neće biti ispunjeni u potpunosti.^{1,23} Ipak, optimizmu pridonosi lagani trend pada broja zaraženih i umrlih (slika 2).¹



Slika 2. Procijenjeni broj zaraženih (a) i umrlih od tuberkuloze (b) u periodu 2000.-2018.¹, zasjenjeno područje predstavlja interval nesigurnosti dok isprekidana linija predstavlja ciljeve za 2020. godinu

S obzirom da su osobe s oslabljenim imunitetom osobito podložne infekcijama pa tako i infekciji *M. tuberculosis* ne čudi da je tuberkuloza prva oportunistička bolest kod zaraženih HIV-om. Iz istog razloga je TB vodeći uzrok smrti kod HIV pozitivnih pacijenata. Od ukupnog broja umrlih od tuberkuloze čak oko 251 000 je istovremeno bilo zaraženo HIV-om. Ipak, i kod ove populacije uočen je silazan trend broja zaraženih i umrlih.^{1,23}

2.2. Liječenje tuberkuloze

Od otkrića uzročnika krajem 19. stoljeća znanstvenici intenzivno rade na unaprjeđenju terapije. Ipak, prvi lijekovi pojavljuju se tek šezdesetak godina kasnije. Dotad se liječenje pacijenata odvijalo u sanatorijima uz samo djelomično pozitivne rezultate te veliki broj smrtnih slučajeva.²⁸

Četrdesetih godina dvadesetog stoljeća otkriveni su para-amino salicilna kiselina (PAS) i streptomycin.³ Ubrzo je uočeno da oba lijeka osim značajnih nuspojava uzrokuju čestu pojavu rezistencije.²⁸ PAS je kasnije zbog svoje toksičnosti zamijenjen etambutolom koji se i danas koristi u osnovnoj terapiji. Već se tada pokazalo kako je pojava rezistencije manje učestala kod primjene više lijekova istovremeno.

1951. godine proizveden je znatno potentniji lijek, izoniazid. Pacijenti su ga dobro podnosili, a zbog niske cijene bio je široko dostupan. Zbog navedenih prednosti i danas se koristi kao osnova terapije tuberkuloze.³

Otkrićem rifampicina, antibiotika iz terapijske skupine rifamicina, napravljen je još jedan značajan iskorak u terapiji. Ovo otkriće, šezdesetih godina prošlog stoljeća, značajno je skratilo vrijeme liječenja. Klinička primjena rifampicina počela je od 1966. godine.³ Liječenje koje je dotad trajalo i do dvije godine primjenom rifampicina skraćeno je na 9 mjeseci.²⁸

Antituberkulotik pirazinamid, uz izoniazid, etambutol i rifampicin, dodatno je smanjio trajanje liječenja na 6 mjeseci.

Osnovna terapija danas uključuje sva četiri lijeka tijekom prva dva mjeseca liječenja, nakon čega se nastavlja kombinacijom samo izoniazida i rifampicina. Iako se neprestano radi na pronalasku novih lijekova, četverokomponentna terapija se i dalje koristi kod novo oboljelih pacijenata kao prva linija terapije.^{29,30} Kod XDR-TB i MDR-TB koriste se lijekovi drugog izbora: kanamicin, amikacin i kapreocin u obliku injekcija; fluorokinoloni (levofloksacin, gatifloksacin i moksifloksacin); oralni oblici etionamida, protionamida, cikloserina, PAS-a; te noviji lijekovi linezolid, bedakilin i delamanid. Ipak, sve su to lijekovi drugog izbora zbog toksičnosti, niže učinkovitosti ili nedovoljne ispitivosti u odnosu na osnovne lijekove.^{29,31} Propisuju se kada osnovni lijekovi nemaju željeni učinak.

2.2.1. Fiksne kombinacije lijekova

Farmaceutski oblici koji sadrže dvije ili više aktivnih tvari razvijeni su kako bi liječenje tuberkuloze postalo pristupačnije i jednostavnije za pacijente. Kombinirana terapija s više lijekova uvedena je za liječenje tuberkuloze vrlo brzo nakon razvoja prvih antituberkulotika, ali u praksi često nije bila slijeđena u potpunosti. TB pacijenti su obično slabijeg imovinskog stanja iz zemalja u razvoju pa su učestale greške u liječenju bile posljedica nedostupnosti propisanih lijekova ili potrebe pacijenta da štedi na lijekovima. Smatra se da je neprikladno liječenje doprinijelo brzom pojavi rezistencije. Razvojem FDC oblika namjerne ili nenamjerne greške liječenja smanjene su na najmanju moguću mjeru. Dotadašnja terapija s 9 do 16 tableta dnevno zamijenjena je s 2 do 5 pripravaka.³ FDC oblici su zbog toga bolje prihvaćeni od strane pacijenta, a pokazalo se i da je pojava rezistencije niža nego što je to slučaj kod liječenja jednim antituberkulotikom. Nadalje, FDC lijekovi imaju niže troškove razvoja te manje nuspojava uz jednake farmakokinetičke parametre.^{32,33}

FDC oblici najčešće sadrže rifampicin i izoniazid. Dvokomponentna formulacija se često primjenjuje u početnom liječenju prva dva mjeseca uz etambutol hidroklorid i pirazinamid, te kasnije kroz sljedeća četiri mjeseca nastavka terapije. Trokomponentni FDC sadrži kombinaciju rifampicina, izoniazida i pirazinamida, a razvijena je i četverokomponentna FDC formulacija koja sadrži rifampicin, izoniazid, pirazinamid i etambutol hidroklorid.^{34,35}

2.2.2. Niska bioraspoloživost i nekompatibilnosti aktivnih tvari za liječenje tuberkuloze

Veliki broj kliničkih studija proveden je u svrhu istraživanja učinkovitosti antituberkulotske terapije.

Već sedamdesetih godina prošlog stoljeća Acocella i suradnici te Mouton i suradnici ispituju utjecaj izoniazida na koncentracije rifampicina u krvi kada se uzimaju u terapiji zajedno.^{36,37} Zaključci prve studije su da utjecaja nema. Međutim, nekoliko godina kasnije istraživanje koje je proveo Mouton pokazuje da izoniazid nepovoljno utječe na koncentracije rifampicina u krvi.³⁷ Nedostatak navedenih studija je relativno mali broj pacijenata koji su bili uključeni u studiju. Mouton zaključuje da se razlog oprečnih rezultata krije u pristupu studiji i vremenskom razmaku između prikupljenih uzoraka. Češćim uzorkovanjem on je uspio ustanoviti razliku i uočiti nepovoljan utjecaj izoniazida. U studijama nisu primjenjivani FDC oblici pa nije bilo moguće utvrditi da li zaključci vrijede i za FDC formulacije.

Pojavom FDC formulacija osamdesetih godina³⁸ prošlog stoljeća provode se i objavljuju studije koje istražuju učinkovitost njihove primjene u odnosu na terapiju s lijekovima koji sadrže samo jednu aktivnu komponentu. Acocella i suradnici 1988. godine objavljuju dvije studije kojima potvrđuju istovjetnost FDC formulacija sa standardnom terapijom.³⁹ Ipak, par godina kasnije ista grupa istraživača ispituje bioraspoloživost dvokomponentnih i trokomponentnih FDC formulacija različitih proizvođača te uočava čak do 50 % niže serumske koncentracije za neke FDC u odnosu na terapiju standardnim formulacijama⁴⁰.

Fox i suradnici u istraživanju provedenom 1990. ispituju tri trokomponentne formulacije koje sadrže izoniazid, rifampicin i pirazinamid. Studije se istovremeno provode u više klinika, a Fox ističe važnost kontroliranih uvjeta i stručnosti osoblja koje provodi studije. Rezultati pokazuju da je terapija trokomponentnim formulacijama jednaka terapiji s istim lijekovima korištenim u obliku jednokomponentnih formulacija. Nadalje ističu da promjena redoslijeda miješanja aktivnih komponenti u trokomponentnoj formulaciji može uzrokovati nižu apsorpciju rifampicina. Niske serumske koncentracije nekih FDC formulacija iz studije koju je ranije proveo Acocella, Fox pripisuje problemima u proizvodnji takvih formulacija i neprikladnoj kontroli kvalitete proizvoda. Također, autor zaključuje da je važno voditi računa i o polaznim sirovinama te da bi se u terapiji trebali koristiti FDC pripravci samo dobro provjerenih proizvođača čija je bioraspoloživost ispitana u certificiranim i od strane regulative osnovanim ili odobrenim institucijama.⁴¹

Unatoč sumnjama dijela znanstvenika u prihvatljivu bioraspoloživost, od 1994. godine WHO preporuča upotrebu FDC formulacija.^{38,42} Sve češće se počinju koristiti u terapiji. Povjerenje regulatornih agencija u uvođenje jednostavnije terapije te napore da stave bolest pod kontrolu pokazuje osnivanje certificiranih laboratorija zaduženih za provođenje kontroliranih studija bioraspoloživosti i odobravanje kvalitetnih formulacija prije stavljanja na tržište.¹⁰

Ellard i sur. u svojoj studiji iz 1999. godine ne uočavaju gubitak bioraspoloživosti rifampicina. Trokomponentne formulacije su uspoređivane s jednokomponentnim lijekovima na 16 pacijenata, 8 u Hong Kongu i 8 u Singapuru. Značajna razlika dva načina terapije nije uočena.⁴³

Provedene studije razlikuju se u donesenim zaključcima. Nije jednoznačno utvrđena primjerenost FDC oblika. Ipak, čak i mala sumnja u niže bioraspoložive koncentracije lijeka

je zabrinjavajuća kada se uzme u obzir da rifampicin sniženjem koncentracije vrlo brzo ulazi u područje terapijske neučinkovitosti.⁴⁴

Ni posljednjih godina ne prestaje interes za proučavanjem učinkovitosti antituberkulotske terapije. Provođi se niz studija, ali i dalje izostaju jednoznačni rezultati i zaključci.⁴⁵⁻⁴⁹

Usporedno s istraživanjem bioraspoloživosti aktivnih tvari u FDC objavljuju se istraživanja koja upućuju i na probleme sa stabilnošću koja bi mogla biti uzrok ili dio uzroka niske bioraspoloživosti rifampicina u prisustvu drugih antituberkulotika.¹⁰

Stabilnost rifampicina u prisustvu izoniazida istražuju Shisoo i suradnici u svom radu iz 1999. godine. Uočavaju da se rifampicin u kiselim uvjetima hidrolizira pri čemu nastaje 3-formil rifamicin. Koncentracije razgradnog produkta mjere novom specifičnom metodom te primjećuju veću razgradnju u prisutnosti izoniazida. Pokazuju manju stabilnost FDC formulacije u odnosu na formulaciju koja sadrži samo rifampicin.⁶ Ista skupina znanstvenika 2001. godine provodi kliničku studiju na šest pacijenata kojom potvrđuje ranije istaknutu, nisku bioraspoloživost rifampicina u prisustvu izoniazida. Rezultate kliničke studije povezuju s uočenom nekompatibilnosti dva antituberkulotika.¹² Znanstvenici pretpostavljaju da niže koncentracije rifampicina, kojima je pacijent izložen zbog razgradnje, ubrzavaju pojavu rezistencije na rifampicin. Predlažu razvoj formulacije koja bi imala gastrozistentnu ovojnicu te tako onemogućila oslobađanje aktivnih tvari u kiselom mediju želuca. Ovojnica bi dodatno spriječila nadražaj koji se javlja zbog uzimanja lijeka na prazan želudac zbog čega bi lijek bio prihvatljiviji pacijentima.¹²

Gotovo istovremeno, istim pitanjem bave se Singh i suradnici u svojim istraživanjima.^{7,8} Oni objavljuju reakciju razgradnje rifampicina (slika 3). Hidrolizom u kiselom mediju nastaje 3-formil rifamicin koji reagira s izoniazidom formirajući izonikotinoil hidrazon u vrlo brzom reakciji. Moguća je reverzibilna reakcija, no ona je znatno manje brzine. Hidrolizom hidrazona obnavlja se izoniazid pa je gubitak izoniazida zbog razgradnje manji nego što je gubitak rifampicina.^{7,8}

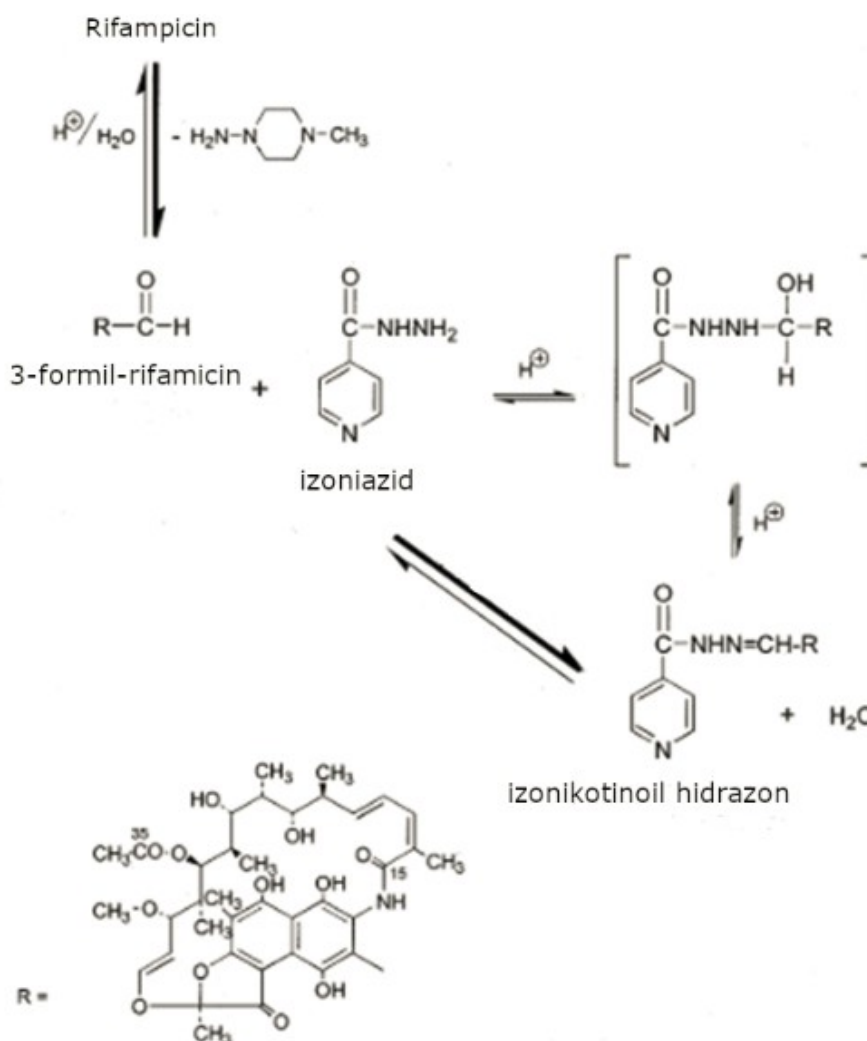
Daljnja istraživanja bila su usmjerena na brzinu raspada rifampicina u kiselom mediju. Ispitivan je raspon pH 1-3 uz prisustvo izoniazida. Kod pH 2, odnosno pH želuca prije uzimanja hrane, brzina razgradnje rifampicina bila je najveća.⁹ Istraživanje na dvije FDC formulacije pokazalo je kako je gubitak rifampicina značajno veći u odnosu na gubitak izoniazida.⁹

2005. godine Bhutani i suradnici ispituju kompatibilnost izoniazida, rifampicina, etambutol hidroklorida i pirazinamida. Uočavaju interakcije između aktivnih komponenti zbog kojih dolazi do kemijskih i fizičkih promjena. Kod smjesa koje su sadržavale izoniazid potvrđeno je prisustvo izonikotinoil hidrazona kao glavnog razgradnog produkta dok je 3-formil rifampicin je bio najznačajniji razgradni produkt kod smjesa koje nisu sadržavale izoniazid. U smjesi rifampicina, etambutol hidroklorida i pirazinamida uočen je i dodatni nepoznati razgradni produkt što uz ranije navedene rezultate ukazuje na nestabilnost anti-TB FDC formulacija.¹³

2006. godine Phrasad i suradnici ispitali su stabilnost rifapentina u kiselim uvjetima i u prisustvu izoniazida. Rifapentin je antibiotik slične strukture kao i rifampicin. Oba imaju nestabilnu hidrazonsku C=N-N skupinu koja nakon hidrolize u kiselom mediju vrlo lako reagira s izoniazidom formirajući izonikotinoil hidrazonski kompleks.¹⁴ Djelomična obnovljivost izoniazida i njegov manji ukupni gubitak rezultat su reverzibilne reakcije.

Povećanje stabilnosti kroz oblaganje formulacije gastrozistentnom ovojnicom, predloženo u ranije navedenim studijama,¹² evaluirano je u studiji iz 2014. U istraživanju su pripremljene pelete izoniazida obložene gastrozistentnom ovojnicom. Ovojnica je onemogućila interakciju između izoniazida i rifampicina, a time i razgradnju zbog nekompatibilnosti.¹¹

Stabilnost formulacije moguće je poboljšati upotrebom aktivnih tvari koji su kokristali dviju komponenti od kojih jedna ili obje mogu biti aktivne. Ovakvo rješenje predlažu Battini i suradnici u studiji iz 2018. godine. Autori istražuju stabilnost antituberkulotskih FDC formulacija u kojima koriste kokristale izoniazida s vaniličnom i kafeinskom kiselinom. Vezanjem aktivne tvari u kokristal onemogućena je interakcija s promotorom razgradnje ovisno o stabilnosti kokristala.⁵⁰

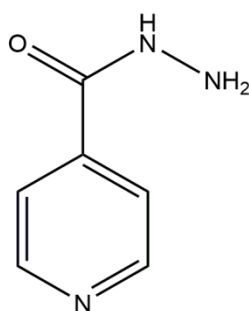
Slika 3. Shema razgradnje rifampicina⁸

Naznake nestabilnosti formulacije i niže bioraspoloživosti lijeka, a time i moguće poddoziranosti pacijenta, upućuju na neprikladnost terapije. Kada se radi o bolesti kao što je tuberkuloza, čije širenje ni usprkos nizu godina istraživanja nije u potpunosti pod kontrolom, osobito je važno imati na raspolaganju lijekove visoke kvalitete.

2.2.3. Isoniazid

Jedan od najpouzdanijih i najčešće korištenih antituberkulotika je isoniazid (slika 4). Jednostavne je strukture s jednim piridinskim prstenom i hidrazidnom grupom. Mehanizam djelovanja mu se zasniva na inhibiciji sinteze mikolinske kiseline, važne komponente bakterijske stanične stijenke. Primjena isoniazida onemogućava stvaranje bakterijske stijenke te tako djeluje bakteriostatski i baktericidno na mikroorganizme uzročnike tuberkuloze.⁵¹

U terapiji je najčešće korišten u kombinaciji s drugim antituberkuloticima i to prvenstveno s rifampicinom. Budući da je na tržištu jako dugo te je kao lijek relativno jednostavan i jeftin, ne čudi da je niz farmaceutskih kompanija razvilo ovaj lijek u obliku tableta, sirupa, injekcija ili praška. Tablete su prisutne na tržištu u dozama od 50 mg, 100 mg i 300 mg; sirup je u obliku otopine koncentracije 50 mg u 5 mL; intramuskularna injekcija je koncentracije 100 mg mL⁻¹, a prašak sadrži 500 mg aktivne tvari.⁵²

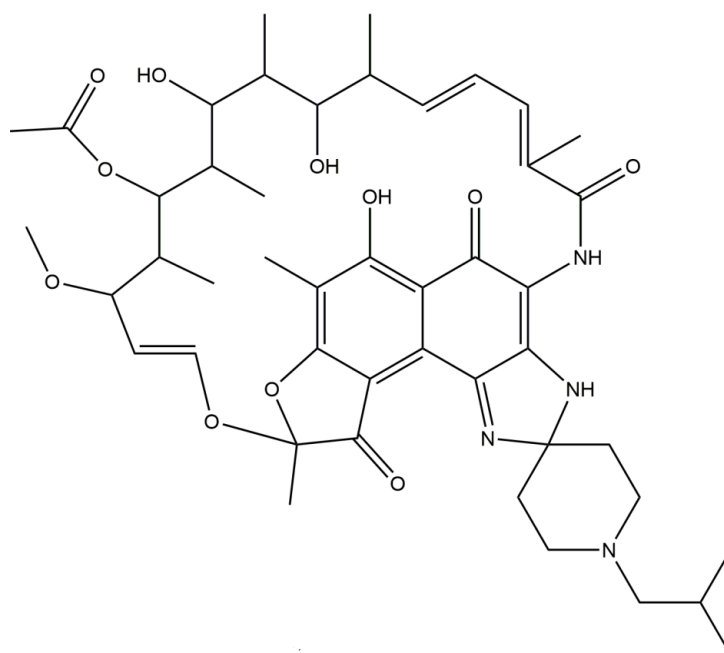


Slika 4. Struktura izoniazida, C₆H₇N₃O

Na tržištu je prisutan i u FDC formulacijama i to u kombinaciji s rifampicinom kao dvokomponentni oblik, zatim s rifampicinom i pirazinamidom kao trokomponentni FDC oblik, te na kraju i kao četverokomponentna formulacija s rifampicinom, pirazinamidom i etambutol hidrokloridom.⁵²

2.2.4. Rifabutin

Rifabutin je antibiotik širokog spektra (slika 5). Djeluje baktericidno protiv gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, a osobito *M. tuberculosis* pa se koristi kao antituberkulotik. Mehanizam djelovanja uključuje inhibiciju DNA-ovisne RNA polimeraze, što dovodi do supresije sinteze RNA i smrti stanice bakterije.

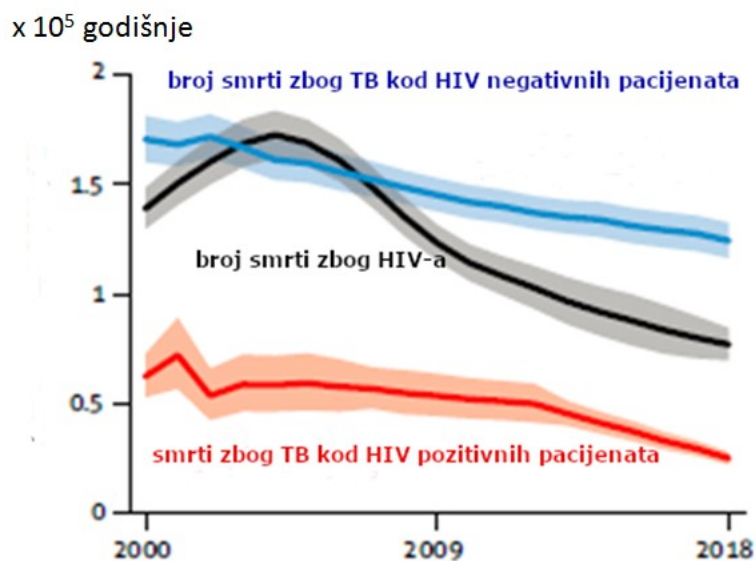


Slika 5. Struktura rifabutina

Rifabutin pripada u terapijsku skupinu rifamicinskih antibiotika kao i ranije spominjani rifampicin i rifapentin. Iako nije na WHO listi esencijalnih anti TB lijekova vrlo često se koristi u praksi te ga pacijenti dobro podnose.^{29,53} Budući da za razliku od drugih rifamicinskih antibiotika značajno manje utječe na metabolizam anti-HIV terapeutika, koristi se pretežno kod pacijenata s koinfekcijama HIV-om.^{15,54} Rifabutin je slabiji induktor enzima CYP P450,^{16,17} a kako CYP P450 sudjeluje u metabolizmu velikog broja lijekova njegovom je indukcijom moguće utjecati na koncentraciju drugih lijekova u krvi, a time i na poddoziranost. S druge strane, pojačan metabolizam drugih lijekova može značiti i veću izloženost toksičnim produktima tih lijekova.¹⁶ Stoga je cilj terapije izbjegavati interakcije s drugim ksenobioticima.⁵³

Na tržištu se rifabutin nalazi u obliku kapsula od 150 mg te zasad nije prisutan u FDC formulacijama.

Tuberkuloza je prva oportunistička bolest HIV-pozitivnim pacijentima. Oni zbog oslabljenog imuniteta vrlo lako obolijevaju od tuberkuloze i predstavljaju veliki udio u ukupnom broju oboljelih i umrlih od tuberkuloze. Ipak, kao i kod ukupnog broja oboljelih od tuberkuloze, uočava se trend pada i kod HIV-pozitivnih pacijenata (slika 6).¹



Slika 6. Grafički prikaz broja umrlih osoba godišnje zbog tuberkuloze i HIV-a¹ u razdoblju od 2000. do 2018. godine, zasjenjena područja predstavljaju odstupanja od procijenjenog broja.

Rifabutin je, kao i drugi lijekovi iz rifamicinske skupine antibiotika, relativno stari lijek. Unatoč tome zanimanje za ovaj lijek prisutno je i danas.⁵⁵ Razlog tome je rezistentnost uzročnika bolesti na terapiju zbog čega je bolest još uvijek dosta rasprostranjena. Zbog toga, osim sustavnog rada na razvoju novih lijekova, preispituju se i dosad poznata liječenja i aktivne molekule.⁵⁶ Studije koje su ranije provedene pregledavaju se s aspekta današnjih zahtjeva farmaceutske regulative. Procjenjuje se njihova vrijednost i provode nove studije izmijenjenog dizajna na temelju modernih spoznaja.

Schwander i suradnici u svojoj studiji na pacijentima s koinfekcijom HIV-om potvrđuju usporednu djelotvornost rifampicina i rifabutina u terapiji s drugim antituberkuloticima prvog izbora.⁵⁷

Grassi i Peona 1996. godine objavljuju studiju na čak 935 pacijenata u kojoj se rifabutin pokazao jednako učinkovit kao i rifampicin. U studiji je ispitana i manja doza rifabutina (150 mg vs. 300 mg rifabutina vs. 300 mg rifampicina) koja se pokazala jednako učinkovitom, no s manje nuspojava. Dodatno, pacijenti koji su već imali simptome MDR-TB također su uspješno liječeni rifabutinom.⁵⁸

Davies i suradnici u svom preglednom radu iz 2007. godine uspoređuju studije provedene u svrhu moguće zamjene rifampicina rifabutinom. Zaključuju da iako je u pet provedenih studija ispitana terapija na 924 pacijenta, studije nisu provedene na prikladan način.

Učinkovitost rifabutina bila je na razini učinkovitosti rifampicina, no ciljana skupina (pacijenti s koinfekcijom HIV-om) nije bila dovoljno zastupljena.⁵⁹

Horne i suradnici u studiji objavljenoj 2012. ističu učinkovitost rifabutina za liječenje tuberkuloze kao zamjene za rifampicin zbog nuspojava uzorkovanih rifampicinom. Naglašavaju da je terapija rifabutinom nešto skuplja nego inicijalna s rifampicinom, ali troškovi su znatno niži nego što bi to bili da se rifamicini u potpunosti izbace iz terapije te liječenje tako produlji na 18 mjeseci.⁵³

Nešto novija studija autora Jo i suradnika potvrdila je mogućnost korištenja rifabutina u slučaju pojave MDR-TB. Studija je provedena na relativno malom broju pacijenta, no dobiveni rezultati upućuju na učinkovitost terapije te je potrebno proširiti istraživanje na veći broj ispitanika.⁶⁰

Sirgel i suradnici su također ispitali učinkovitost rifabutina kod MDR-TB. Uočeno je da mutacije na kodonu 516 gena *rpoB* *M. tuberculosis*, koje su uzrok nastanka rezistencije na rifampicin, imaju neznatan utjecaj na provođenje terapije rifabutinom. Potpuna unakrsna rezistencija nije uočena za dva lijeka što upućuje na to da bi dio pacijenata s MDR-TB ili XDR-TB mogao imati koristi od zamjene rifampicina rifabutinom.⁶¹

Studija Lee i suradnika, objavljena 2017. godine, također potvrđuje primjenjivost terapije rifabutinom u slučaju pacijenata s potvrđenom MDR-TB. Uspoređen je doprinos rifabutina kod skupine koja je primala lijek i skupine koja je primala drugu terapiju bez rifabutina. Bolje rezultate su imali pacijenti koji su u terapiji primali rifabutin.⁵⁶ 81 % pacijenata koji su primali rifabutin imali su pozitivne ishode liječenja što je u skladu sa studijom Jo i suradnika koji su imali 86 % takvih pacijenata u svom istraživanju.⁶⁰

Studija Takayoshi i suradnika, objavljena 2018. godine ispituje upotrebu rifabutina kod TB pacijenata kod kojih je provedena transplantacija srca. Kod ovih pacijenata rifabutin se također pokazao učinkovit zbog manjeg utjecaja na enzim CYP P450 i to specifično kod istovremene terapije ciklosporinom.⁵⁵

Sve navedene studije i upotreba ovog lijeka u standardnoj terapiji upućuju nas na istraživanje prihvatljivosti rifabutina za FDC formulaciju s izoniazidom.

2.3. Kompatibilnost sastavnica formulacije

Poznavanje reakcija do kojih može doći između sastavnica formulacije prvi je korak do stabilne formulacije. Ukoliko postoji potencijal za neželjene interakcije unutar formulacije moguće je na različite načine utjecati na proizvodni proces ili sastav kako bi se očuvala stabilnost proizvoda.⁶²

Promjene koje se događaju uslijed nekompatibilnosti sastavnica mogu se manifestirati kao fizičke promjene, npr. promjena faznog stanja, desolvatacija, gubitak vode; ili kao različite kemijske reakcije.⁶²

Budući da je za antituberkulotske formulacije ranije prijavljivana kemijska nestabilnost,^{6-9,13,14} istraživanja u ovom radu biti će usmjerena na ispitivanje kemijskih procesa zbog interakcija između izoniazida i rifabutina, te na ispitivanje utjecaja najčešće korištenih pomoćnih tvari na stabilnost izoniazida i rifabutina, odnosno formulacije u cijelosti.

Iako su za rifampicin i rifapentin prijavljene nekompatibilnosti s izoniazidom u kiselom mediju^{6-9,13,14} takva studija zasad nije objavljena za kombinaciju rifabutina i izoniazida.

Pomoćne tvari bi trebale biti kemijski neaktivne sastavnice i djelovati na fizičke procese (na primjer kliženje, raspadanje, otapanje, oblaganje, itd.) unutar formulacije. Ipak, niz istraživanja upućuje na negativan utjecaj pomoćnih tvari na stabilnost formulacije,^{62,63} a nerijetko su i onečišćenja pomoćnih tvari razlog nestabilnosti gotovog proizvoda.

Kod suhih oralnih oblika sastavnice su u suhom obliku pa se pretpostavlja da ne bi trebalo biti značajnih interakcija. Međutim čak i male količine nevezane vode, bilo da potječu iz aktivnih ili pomoćnih tvari, mogu pospješiti interakcije povećavajući pokretljivost molekula unutar proizvoda.

Maillardova reakcija jedna je od vrlo čestih reakcija razgradnje kod farmaceutskih proizvoda. Predstavlja niz međusobno povezanih i brzih reakcija koje uz velik broj razgradnih produkata dovode do gubitka sadržaja aktivne molekule. Lijek koji u svojoj strukturi sadrži primarne ili sekundarne amine reagira s reducirajućim šećerima iz pomoćnih tvari kao što su laktoza, zatim škrob i glukoza.^{63,64} One u formulaciji imaju funkciju punila pa su najčešće prisutne u većoj količini.⁶⁵ Slično, s reducirajućim šećerima iz pomoćnih tvari mogu reagirati i hidrazidne grupe ako su prisutne u molekulima.⁶⁶

Vrlo česta pomoćna tvar je i magnezij stearat. Obično se koristi kao lubrikant u suhim oralnim oblicima. Budući da je lužnat, magnezij stearat može utjecati na razgradnju lijekova koji su nestabilni u tom pH području.^{67,68} Stearati mogu reagirati s aminima stvarajući pritom

amidne razgradne produkte, a ion magnezija⁶⁹ može katalizirati pregradnju i nakon toga hidrolizu aktivne tvari.

Poznato je i da kiseline mogu potaknuti razgradne reakcije kada se nalaze u formulaciji kao pomoćne tvari. Nije tako rijedak slučaj da je aktivna komponenta u obliku hidrokloridne soli pa se kod višekomponentnih formulacija može uočiti nekompatibilnost zbog prisustva kloridnih iona.⁷⁰

Dodatno, pomoćne tvari često nisu u potpunosti čiste kemikalije i mogu sadržavati manje ili veće količine onečišćenja. Onečišćenja pomoćnih tvari mogu biti reaktivna te utjecati na stabilnost formulacije. Osobito je to slučaj kod polimernih pomoćnih tvari koji u pravilu sadrže ostatke monomernih ili oligomernih jedinica. Osim toga, neke pomoćne tvari, kao što su povidoni ili polietilen glikoli (PEG), su sklone autooksidaciji pri čemu nastaju reaktivni produkti kao što su vodikov peroksid, formaldehid ili mravlja kiselina.^{71–73} Vodikov peroksid lako uzrokuje oksidaciju,⁷⁴ osobito nastajanje *N*-oksida reakcijom s tercijarnim aminima.⁷⁵ Formaldehid i mravlja kiselina reagiraju s amino grupama aktivne tvari u reakcijama *N*-metilacije i *N*-formilacije.⁷¹ Formaldehid može potaknuti nastajanje dimera aktivnih tvari^{76,77} ili dvije molekule povezati preko metilenskog mosta⁷⁸, a poznat je njegov utjecaj i na premrežavanje želatinskih kapsula. Promjena tvrdoće želatinskih kapsula uzrokuje odgođeno oslobađanje lijeka iz kapsule.^{79,80}

Kod višekomponentnih formulacija zabilježene su reakcije između aktivnih tvari.^{67,81} I u tim slučajevima rezultat je gubitak sadržaja aktivnih tvari i stvaranje razgradnih produkata.

Ovo je samo dio reakcija koje se mogu odvijati unutar formulacije te time utjecati na stabilnost proizvoda. Mogućnost neželjenih interakcija važno je utvrditi što ranije pa se ispitivanje kompatibilnosti aktivnih i pomoćnih komponenti formulacije uobičajeno provodi u početku razvoja lijeka. Takva je studija vrijedan alat čiji rezultati omogućavaju izbor poželjnih sastavnica formulacije te služi za procjenu njene stabilnosti. Kod višekomponentnih formulacija nužno je i ispitivanje kompatibilnosti aktivnih tvari kako bi se osigurala kvaliteta farmaceutskog pripravka.^{13,82–84} Uočavanjem mogućih interakcija koje dovode do gubitka sadržaja aktivnih tvari i porasta razgradnih produkata moguće je uvesti specifične korake u svrhu zaštite kvalitete ljekovitog pripravka. Kontakt dviju nekompatibilnih tvari, a time i njihove međusobne reakcije, moguće je smanjiti promjenom redoslijeda dodavanja tijekom proizvodnje ili umješavanjem u različite faze. Nadalje, podešavanjem pH područja moguće je utjecati na brzinu reakcije razgradnje. Zaštita proizvoda od vlage i svjetla pakiranjem može

biti ključna za očuvanje kvalitete lijeka. Pakiranje otporno na vlagu štiti proizvod od adsorpcije vlage iz okoline čime smanjuje pokretljivost i interakciju molekula unutar formulacije.

2.4. Analitičke tehnike za procjenu kompatibilnosti

Niz je tehnika kojima se danas koriste znanstvenici kako bi procijenili kompatibilnost i interakcije između komponenti smjese.^{85,86} Često se koriste termalne tehnike kao što su diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC), termogravimetrija (engl. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) i izotermalna kalorimetrija. Jednostavnost, brzo generiranje rezultata i mala količina uzorka koja je potrebna za analizu prednosti su termalnih tehnika.⁸⁴ Iako je izotermalna kalorimetrija izrazito osjetljiva tehnika te može detektirati i najmanje promjene, termalne metode su generalno destruktivne metode zbog toga što se koriste visoke temperature.⁸⁷ Nadalje, ove tehnike nisu dovoljno specifične pa je moguće međusobno prekrivanje termalnih događaja ili detekcija termalnih efekata koji nisu rezultat reakcija nekompatibilnosti. Iz tog razloga preporuča se uz termalne tehnike koristiti neku drugu metodu baziranu na drugačijem principu analize.⁸⁸ Jedna od takvih metoda je i mikroskopija na grijanoj ploči (engl. *Hot Stage Microscopy*, HSM). HSM je kombinacija termalne i vizualne metode.⁸⁵ Vizualna komponenta omogućava veću selektivnost u odnosu na termalne tehnike.^{85,86}

Osim HSM, u studijama kompatibilnosti može se koristiti i pretražna/skenirajuća mikroskopija (engl. *Scanning Electron Microscopy*, SEM). SEM detektira promjene u kristalnoj strukturi, ali ne uočava kemijske promjene.⁸⁵

Sljedeća skupina analitičkih tehnika za primjenu u analizama kompatibilnosti obuhvaća spektroskopske tehnike: nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier Transform-Infrared Spectroscopy*, FT-IR), difrakcija X-zraka na prahu (engl. *Powder X-Ray Diffraction*, PXRD).⁸⁵

PXRD mjeri intenzitet difrakcije prema kutu difrakcije (2θ) te tako detektira promjene u kristalnoj strukturi, ali ne i kemijsku razgradnju. FT-IR daje informacije o promjeni u molekularnoj strukturi, analiza je brza, a rezultati pouzdano ukazuju na intermolekularne interakcije.^{85,88,89} NMR je također tehnika s velikim potencijalom kod ispitivanja kompatibilnosti. Zbog promjene u gustoći elektrona detektira pomak signala ugljikovog atoma koji sudjeluje u reakciji. Ima mogućnosti kvantitativne i kvalitativne analize, a nedostaci su joj dugo vrijeme analize i nešto lošija dostupnost zbog visoke cijene instrumenta.⁸⁵

Nadalje, uz termalne, mikroskopske i spektroskopske tehnike, uzorci kompatibilnosti se vrlo često analiziraju kromatografskim tehnikama. Kromatografske metode temelje se na razdvajanju sastojaka smjese, a koriste se kao način detekcije kod izotermalnih stres studija (engl. *Isothermal Stress Testing*, IST). IST podrazumijeva postavljanje uzoraka na uvjete konstantne povišene temperature i/ili vlage kako bi se potaknule reakcije razgradnje i interakcije. Ovakve analize su prilično specifične, ali nedostatak im je dugotrajnost.⁸⁷ Kromatografske metode mogu se koristiti samostalno ili kao dodatna tehnika uz termalne analize.⁹⁰⁻⁹² Kada je potrebno prikupiti što više podataka o strukturi produkata nekompatibilnosti kao dodatni način detekcije nerijetko se koristi i spektrometrija masa. MS ima svrhu identifikacije i karakterizacije nastalih produkata.^{82,87}

Posljednjih godina ispituju se i automatizirani sustavi. Pokazali su se kao pouzdane i robusne zamjene uobičajenom načinu pripreme uzoraka za kompatibilnost.⁹³ Ovakvi sustavi nalaze primjenu kod aktivnih tvari koje su ujedno toksične za zdrave pojedince te omogućuju smanjeno izlaganje ljudi zbog primjene automatiziranog sustava.

2.4.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) danas je najčešće korištena tehnika u kontroli kvalitete lijekova.⁹⁴ Široko je rasprostranjena u farmaceutskoj industriji i to može zahvaliti iznimnim mogućnostima razdvajanja komponenata iz složenih smjesa te vrlo dobroj osjetljivosti. Uglavnom se pod nazivom podrazumijeva tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) iako posljednjih godina tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) postaje nezamjenjiv alat u laboratorijima diljem svijeta. UHPLC omogućava analize pod višim tlakovima na nepokretnim fazama s manjim česticama punila, što rezultira povećanjem djelotvornosti i osjetljivosti te većim mogućnostima razdvajanja.^{95,96} LC se zasniva na principu razdvajanja analita iz smjese na temelju različitog afiniteta prema pokretnoj i nepokretnoj fazi. Za ravnotežno stanje koeficijent raspodjele K , opisan je kao omjer koncentracija u nepokretnoj C_S i pokretnoj fazi C_M (Jednadžba 1).

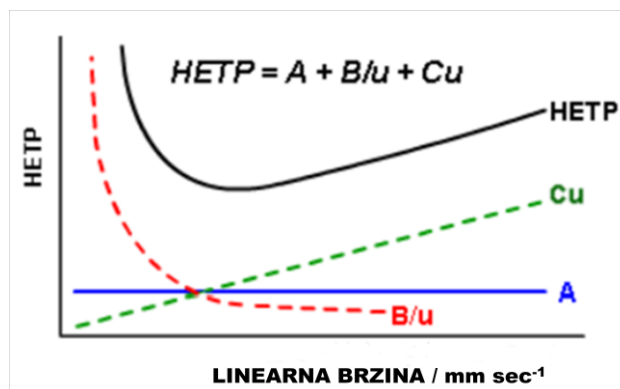
$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (1)$$

Zbog stalnog protoka pokretne faze ravnotežno stanje između faza neprestano se narušava i ponovno postiže. Broj postizanja ravnotežnog stanja za analit opisan je brojem teoretskih tavana (engl. *Plate number*, N), što je N veći, bolja je i učinkovitost razdvajanja.

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{4t_R}{w_b}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (2)$$

N predstavlja kvadrat omjera vremena zadržavanja (t_R) i standardne devijacije (σ). 4σ je jednako širini pika na osnovici w_b .

Kromatografsku učinkovitost i parametre koji na nju utječu najbolje opisuje van Deemterova jednadžba. Jednadžba definira visinu ekvivalentnu teorijskom tavanu (engl. *Height Equivalent to Theoretical Plate*, HEPT ili H) pri čemu se najveća učinkovitost postiže kod najmanje vrijednosti HEPT (slika 7). Iz jednadžbe na slici očigledno je da na HEPT utječe više čimbenika: vrtložna difuzija (engl. *Eddy diffusion*, A), uzdužna difuzija (engl. *longitudinal diffusion*, B), otpor međufaznom prijenosu tvari (engl. *mass transfer resistance*, C) te linearna brzina (engl. *velocity*, u).



Slika 7. Kromatografska učinkovitost opisana van Deemterovom jednadžbom⁹⁷

Čimbenik A opisuje gibanje molekula analita na različit način kroz kolonu i odstupanje od jedinstvenog kretanja svih molekula jednog analita. Što su kolone kvalitetnije s ujednačenijim punilima to je ovaj čimbenik manji, a učinkovitost kolone bolja. B opisuje longitudinalnu difuziju zone analita. Ovaj čimbenik značajnije doprinosi vrijednosti HEPT tek kod niskih protoka pokretne faze.⁹⁴ Čimbenik C predstavlja otpor prijenosu mase između dviju faza.

Doprinos je značajniji kod visokih protoka i velikih čestica punila kolone. Cilj su što niže vrijednosti svakog od tih čimbenika.

HEPT se može izraziti i kao omjer duljine kolone L i broja teoretskih tavana N , iz čega je proizlazi da broj teorijskih tavana, odnosno učinkovitost razdvajanja, ovisna o gore opisanim čimbenicima.⁹⁴

Zbog razlike u afinitetima analita prema pokretnoj i nepokretnoj fazi dolazi do razdvajanja te je razlučivanje R_s , između dva pika definirano omjerom razlike između vremena zadržavanja i srednje širine pika (Jednadžba 3).

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}\right)} \quad (3)$$

S obzirom da razdvajanje pikova ovisi o zadržavanju i širini pojedinog pika, važno je spomenuti da na širinu, a time i razlučivanje između pikova utječe oblik pika. U idealnom slučaju pik analita ima oblik Gaussove krivulje. Dva su parametra kojima se opisuje oblik pika: faktor asimetrije (A_s) i faktor razvlačenja (engl. *tailing factor*, T_f). Oba opisuju odstupanje od idealnog oblika Gaussove krivulje. A_s se definira kao omjer širine od okomice maksimalne visine pika na desno i širine od okomice maksimalne visine pika na lijevo, pri čemu se ta širina mjeri na 10 % visine pika. T_f se računa s vrijednostima izmjerenim na 5 % visine pika, dakle bliže osnovici pika i omjer je ukupne širine pika s dvije širine od okomice maksimalne visine pika na lijevo, f .

$$T_f = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad (4)$$

A_s i T_f su slične vrijednosti pa je dovoljno koristiti samo jednu mjeru asimetrije kod vrednovanja rezultata.

Tekućinski kromatograf sastoji se od pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje (injektora), nepokretne faze i detektora. Pumpa tjera pokretnu fazu kroz otplinjač te nakon otklanjanja otopljenih plinova dalje u kromatografski sustav. Injektor ubrizgava tekući uzorak kojeg pokretna faza nosi preko nepokretne gdje se odvija razdvajanje analita.

Nakon razdvajanja, analiti nošeni pokretnom fazom dolaze do detektora te se bilježi signal za svaki od sastojaka smjese.⁹⁸

S obzirom na način razdvajanja analita razlikuje se normalno fazna kromatografija (engl. *Normal Phase*, NP), obrnuto fazna (engl. *Reverse Phase*, RP), tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC), ionska (engl. *Ion Chromatography*, IC) i kromatografija isključenjem (engl. *Size Exclusion Chromatography*, SEC).

Kod RP-LC nepokretna faza je nepolarnija u odnosu na pokretnu pa se analiti koji su polarni slabije vežu i ranije eluiraju, dok se nepolarni analiti jače vežu za kromatografsku kolonu te tako i dulje zadržavaju. Kod NP-LC princip je obrnut te je pokretna faza nepolarnija u odnosu na nepokretnu fazu.

2.4.2. Spektrometrija masa

Najčešći oblik detekcije kod LC metoda je UV/Vis. Zbog potrebe prikupljanja što više informacija o ispitivanim analitima vrlo često se koristi i MS detektor. Ova vrsta detekcije temelji se na razdvajanju i detekciji iona prema omjeru mase i naboja pa kvalitativno određivanje MS-om služi za određivanje točne molekulske mase analita.⁹⁹ Primjena tandeme MS/MS analize i analiza fragmenata koji nastaju iz molekule daje informacije o strukturi nepoznate molekule, pri čemu na točnost rezultata utječe rezolucijska moć instrumenta. Kod kvantitativnih analiza MS se odlikuje velikom osjetljivošću određivanja.⁹⁸

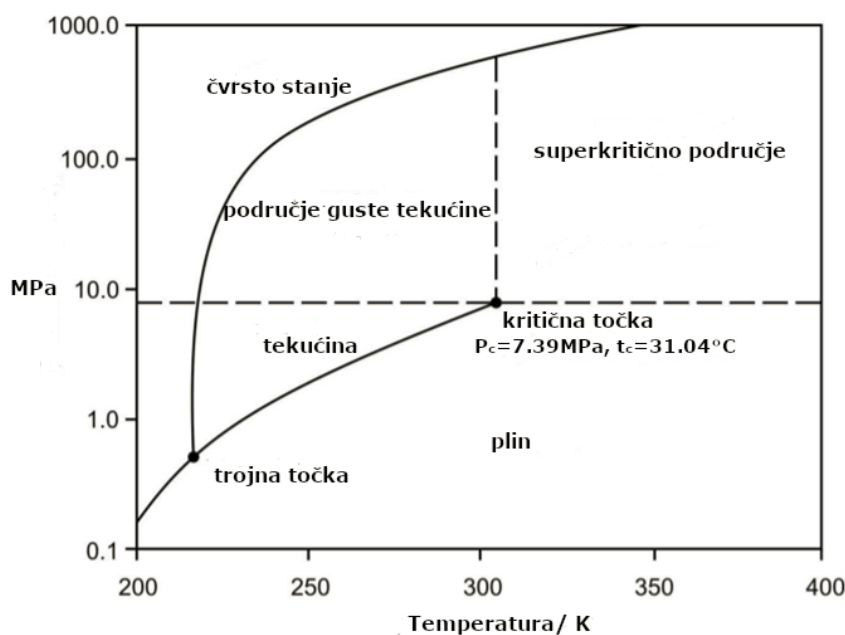
Ioni nastaju primjenom struje visokog napona u dijelu instrumenta koji se naziva ionizator. Postoji više vrsta ionizatora, a s obzirom na energiju koja se ulaže za ionizaciju molekula razlikuju se jaka i blaga ionizacija. U ovom radu će se koristiti ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI), jedan od najblažih oblika ionizacije. Blaga ionizacija osigurava dominantnost signala molekulskog iona. Ionizacija analita se postiže tako da uzorak nošen pokretnom fazom s tekućinskog kromatografa prolazi kroz kapilaru pod visokim naponom te se raspršuje na sitne nabijene kapljice u obliku magle. Otapalo iz kapljica isparava, nabijene čestice su sve bliže i dolazi do izbacivanja iona analita s površine kapljice. Primjenom višeg napona pucaju najslabije veze u molekuli te nastaju fragmenti. Izbačeni molekulski i fragmentni ioni ulaze u analizator masa.

MS instrumentacija danas ima više vrsta analizatora masa. Analizator koji će se koristiti u istraživanju je analizator vremena leta (engl. *Time of Flight*, TOF). Ioni ubrzani električnim

pulsovima ulaze u cijev analizatora te se razlikuju po vremenu putovanja kroz analizator. S obzirom da posjeduju istu kinetičku energiju a različitu masu, imaju različitu brzinu kretanja kroz analizator. Ioni manje mase put do detektora prelaze brže no što to čine veći ioni te dolazi do razdvajanja iona prema prema omjeru mase i naboja. Za TOF instrument karakteristični su reflektori ili ionska zrcala. Reflektori povećavaju put ionima te time osiguravaju iznimnu moć rezolucije.^{98,99} Analiza nastalih fragmentnih iona daje uvid u strukturu analizirane molekule.

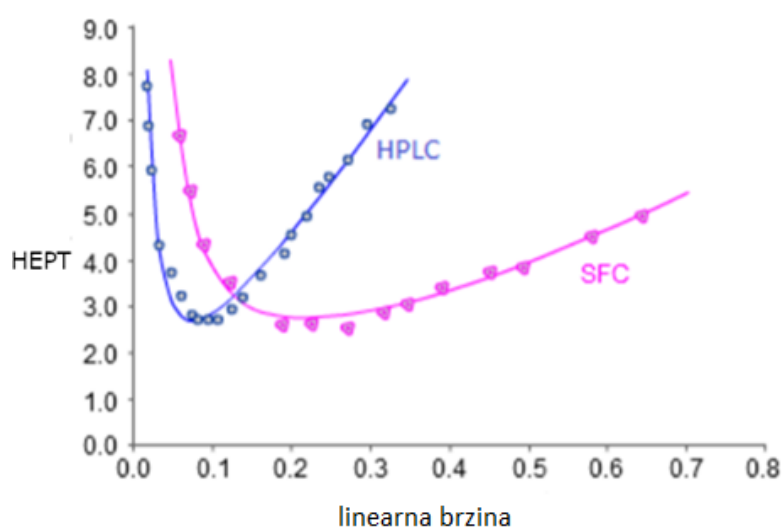
2.4.3. Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima

Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima (SFC) je analitička tehnika za određivanje analita iz smjese. Principi razdvajanja SFC-a su slični kao i kod LC te vrijede jednakosti navedene za tekućinsku kromatografiju u poglavlju 2.4.1. Analiti prolaze kroz kromatografsku kolonu pri čemu se višekratno razdjeljuju između pokretne i nepokretne faze. Različiti afiniteti prema dvjema fazama omogućuju razdvajanje koje onda rezultira različitim vremenima eluiranja s kolone. Razlika u odnosu na LC je u tome što je kod SFC tehnike pokretna faza plin pod visokim tlakom i uvjetima na kojima ta faza poprima karakteristike superkričnog fluida (slika 8).



Slika 8. Fazni dijagram prikazuje uvjete tlaka i temperature pri kojima je CO₂ u čvrstom, tekućem, plinovitom ili superkričnom stanju¹⁰⁰

Prednost superkritičnog fluida u odnosu na tekućinu je znatno manja viskoznost, što omogućava više protoke pokretne faze. Uz više protoke analiza je učinkovitija bez gubitka solvatacijske snage pokretne faze.¹⁰¹ Navedene tvrdnje jasno su vidljive iz van Deemter-ovih krivulja za HPLC i SFC (slika 9). HEPT vrijednosti za ove dvije tehnike otprilike su podjednake, ali se za SFC tehniku te vrijednosti postižu pri nešto većim linearnim brzinama. Dodatno, SFC krivulja poprima optimalne najniže vrijednosti u širem rasponu.



Slika 9. Van Deemterova krivulja za SFC i HPLC tehnike¹⁰²

Od otkrića SFC-a, šezdesetih godina, za analize su korištene različite pokretne faze. Ipak, ugljikov dioksid (CO_2) pokazao se najprikladnijim. CO_2 ima nisku viskoznost, dobru sposobnost difuzije, nisku superkritičnu temperaturu i tlak (slika 8). Kemijski je inertan, slabo zapaljiv te nije lako eksplozivan. Slabo apsorbira u UV/Vis području pa je pogodan i za analize pri niskim valnim duljinama. Nusprodukt je drugih industrija što SFC čini ekološki prihvatljivom tehnikom.

CO_2 je pod visokim tlakom izrazito nepolaran. Njegova je polarnost slična polarnosti organskih otapala heptana i heksana. Stoga je ova otapala moguće koristiti i kao otapala za pripremu uzoraka.¹⁰¹ Kromatografska kolona je kod SFC polarnija faza. Princip razdvajanja povezuje SFC s NP-LC. Redosljed pikova kod SFC je sličan NP-LC pa se SFC smatra ortogonalnom tehnikom RP-LC-u.¹⁰³ Ortogonalnost podrazumijeva drugačije separacijske

mehanizme od onih na kojima se bazira inicijalna tehnika. Primjenom ortogonalnih tehnika u analizi povećava se vjerojatnost određivanja svih analita iz smjese.⁹⁴

Unatoč sličnostima s NP-LC, SFC koristi manje toksične pokretne faze. Na jednom sustavu moguće je kiralno i akiralno eluiranje, a kondicioniranje sustava u usporedbi s NP-LC je jako brzo. Kada su u pitanju polarni analiti, čija je topljivost slaba u organskim otapalima, očekivalo bi se da izrazito nepolarna pokretna faza nema mogućnost njihovog eluiranja s nepokretne faze. Zbog toga se SFC u početku koristila uglavnom za nepolarne analite.¹⁰¹ Ipak, danas se SFC-om mogu analizirati i polarni analiti dodatkom organskih otapala, odnosno modifikatora, u pokretnu fazu tijekom eluiranja.¹⁰⁴ Modifikatori, najčešće metanol, etanol, acetonitril ili 2-propanol, veće su polarnosti u odnosu na superkritični fluid. Važno je da se mogu miješati se sa CO₂.^{105,106} Utjecaj modifikatora je prilično složen. Mijenjaju karakteristike pokretne faze, utječu na njenu gustoću i elucijsku jakost te time i na selektivnost metode.¹⁰⁷ Ovisno o količini modifikatora, temperaturi kolone i tlaku kojim se tlači pokretna faza, kromatografski uvjeti mogu biti na granici superkritičnih ili izaći iz regije superkritičnih svojstava. Unatoč tome, studije pokazuju da to nema utjecaja na kromatografiju ako su uvjeti konstantni.¹⁰⁸ Osim na pokretnu fazu, modifikatori mogu utjecati i na nepokretnu fazu na način da se adsorbiraju na kolonu i mijenjaju njena kemijska svojstva.¹⁰¹

Osim modifikatora u pokretnu fazu dodaju se i aditivi koji poboljšavaju oblik pika analita tako što prekrivaju snažna adsorpcijska mjesta na površini nepokretne faze i onemogućavaju interakciju analita.¹⁰¹ Analiti koji imaju izraziti afinitet prema nepokretnoj fazi neujednačeno se zadržavaju na koloni zbog čega je narušena simetrija pika. Aditivi su najčešće male količine polarnih kemikalija kao što su jake lužine, jake kiseline ili otopine hlapljivih soli kao što je na primjer amonijev acetat. Također, aditivi mogu biti alifatski amini kao što su trietilamin (TEA) ili dietilamin (DEA).¹⁰⁹ Nerijetko se kao aditivi modifikatoru dodaju i male količine vode.¹¹⁰

S druge strane pokretna faza je plin pa se SFC se često uspoređuje s plinskom kromatografijom (engl. *Gas Chromatography*, GC). Ipak za razliku od plina koji je kod GC samo nosač analita, superkritični fluid ima i solvacijsku snagu sličnu organskim otapalima što omogućava razdjeljivanje analita između pokretne i nepokretne faze. Prednost SFC u odnosu na GC je mogućnost analize uzoraka koji su nestabilni na visokim temperaturama kakve se koriste kod GC.

Ono što je ključno kod SFC je gustoća pokretne faze.¹⁰¹ Za razliku od LC, gdje gustoća ne može značajno utjecati na selektivnost, kod SFC o gustoći ovisi elucijska snaga pokretne faze. Tri su glavna čimbenika koji utječu na gustoću pokretne faze: temperatura nepokretne faze, tlak koji se primjenjuje na pokretnu fazu i sastav pokretne faze. Ova tri čimbenika zapravo kontroliraju superkritičnost pokretne faze, a time i njenu gustoću. Utjecaj tlaka je jednostavno objasniti. Povećanjem primijenjenog tlaka, pri konstantnoj temperaturi kolone, povećava se solvacijska snaga pokretne faze te ona ima jaču moć eluiranja zbog čega je zadržavanje analita na nepokretnoj fazi manje. Kada je pokretna faza čisti CO₂ varijacije vremena zadržavanja mogu biti značajne zbog toga što CO₂ ima veliku mogućnost stlačivosti. Dodatkom modifikatora pokretna faza postaje sličnija tekućini pa je ovo svojstvo manje izraženo te je zadržavanje analita robusnije na promjenu tlaka. Ovaj je učinak moguće uočiti kod gradijentnog eluiranja gdje analiti sa slabijim zadržavanjem na nepokretnoj fazi eluiraju s manjom količinom modifikatora.¹¹¹ Njihovo je vrijeme zadržavanja podložnije varijacijama nego što je to slučaj za analite koji eluiraju s boljim zadržavanjem. Temperatura ima znatno složeniji učinak jer je uz promjenu gustoće prisutan i utjecaj promjene tlaka para fluida. Područje temperatura malo iznad kritične temperature značajno smanjuje gustoću pa zadržavanje značajno pada. Daljnjim porastom temperature prevladava utjecaj tlaka para, a promjena gustoće pokretne faze je manja. Značajnim porastom temperature dolazi do boljeg zadržavanja analita.¹¹² Posljedično, temperatura kolone utječe na selektivnost metode.¹⁰¹

Promjena dimenzija ili veličine čestica kolone također može imati utjecaj na gustoću pokretne faze, a time i na selektivnost mjerenja. Ovo je važno imati na umu kod promjene SFC sistema te kod razvoja metode ispitati šire područje vrijednosti parametara kako bi se odabrali robusni uvjeti konačne metode.

Kromatograf je sličan LC instrumentu, sastoji se od pumpe, otplinjača, injektora uzoraka, nepokretne faze i detektora. Dodatno sadrži još i regulator tlaka koji je važan za održavanje pokretne faze pod tlakom na izlazu iz nepokretne faze, a kako bi se osiguralo superkritično stanje u cijelom sustavu (engl. *Automated back-pressure regulator*, ABPR).

2.4.4. *In vitro* oslobađanje lijeka

Ispitivanje *In vitro* oslobađanja lijeka važan je parametar u razvoju formulacije i kasnije u kontroli kvalitete farmaceutskog proizvoda.³⁴ Iako je u početku bilo karakteristično za suhe oralne oblike, danas se koristi i kod polučvrstih proizvoda, ali i kod tekućih formulacija u

obliku suspenzija ili tekućih oblika s produljenim oslobađanjem. Prve metode pojavile su se sedamdesetih godina prošlog stoljeća. Koristile su aparaturu s košaricama danas poznatu kao aparatura 1. Uočeno je kako ova aparatura nije univerzalno prikladna za sve vrste proizvoda te su ubrzano razvijane i druge aparature. U trenutno važećim verzijama Američke i Europske farmakopeje opisane su četiri vrste aparatura za *In vitro* oslobađanje djelatnih tvari iz čvrstih oralnih farmaceutskih oblika.^{34,113}

1) Aparatura 1 (aparatura s košaricom)

Aparatura 1 sastoji se od staklene posude uronjene u vodenu kupelj koja održava temperaturu medija u posudi stalnom na $37 \pm 0,5$ °C. Iznad staklene posude je mješač koji završava s košaricom izrađenog od nehrđajućeg čelika. Uzorak se postavlja u košaricu nakon čega se mješač zajedno s košaricom spušta u posudu u kojoj se nalazi medij u kojemu se odvija analiza. Pokretanjem analize pokreće se i rotacija mješača koji ima zadatak miješanja medija dok se aktivna tvar oslobađa iz uzorka u košarici.

2) Aparatura 2 (aparatura s lopaticom)

Aparatura 2 slična je Aparaturi 1. Razlikuje se u izgledu mješača koji, umjesto s košaricom kao kod aparature 1, završava s lopaticom. Mješač ima ulogu miješanja medija u posudi, a uzorak se unosi direktno u posudu s medijem.

3) Aparatura 3 (aparatura s uranjajućim cilindrom)

Cilindrične staklene posude kod aparature 3 imaju ravno dno, za razliku od konusnih posuda kod prethodnih aparatura. Uzorak se unosi u stakleni cilindar koji ima mogućnost pomicanja po vertikalnoj osi i uranjanja u posude s medijem. Uranjanjem, cilindar potiče miješanje medija pa nije potreban dodatni mješač.

4) Aparatura 4 (protočna ćelija)

Kod aparature 4 uzorak se unosi u protočnu ćeliju od inertnog i prozirnog materijala. Oslobađanje se odvija u medij koji pumpa tjera odozdo prema gore. Pulsirajući način rada pumpe omogućava miješanje medija.

2.4.5. Validacija analitičkih metoda

Validacija analitičke metode je niz eksperimenata kojima se potvrđuje prikladnost metode za ciljanu namjenu. Uobičajeno se unutar validacije metode validiraju sljedeći parametri: točnost, preciznost, linearnost, selektivnost, radno područje, stabilnost otopina i robusnost. Kod metoda za određivanje onečišćenja nužno je odrediti i granicu određivanja (engl. *Limit of*

Quantitation, LOQ) za kvantitativno određivanje, te granicu dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) kod limit test metoda. Kada se kod pripreme uzorka koriste filteri preporuka je ispitati zadržavanje analita na filteru kroz filter studiju.

Selektivnost je svojstvo metode da selektivno određuje ciljani analit. Ispituje se mjerenjem otopine uzorka, otopine placeba, otapala te drugih tvari koje bi mogle utjecati na određivanje analita. Kod analize onečišćenja analiziraju se sva dostupna onečišćenja i prati njihovo međusobno razdvajanje kao i razdvajanje od aktivnih tvari. Za validacije stabilitetno indikativnih metoda provodi se i studija prisilne razgradnje kao potvrda selektivnosti metode. Uzorak se izlaže rigoroznim uvjetima kako bi se potakla njegova razgradnja. Izlaganjem uzorka kiseline, lužini i vodikovom peroksidu, potiču se reakcije kisele i lužnate hidrolize te oksidacije. Razgradni produkti nastali u prisilnoj razgradnji trebaju biti međusobno odvojeni kako bi se mogli odrediti, a njihova količina mora biti u skladu s padom koncentracije aktivne komponente. Uvjeti prisilne razgradnje obično se postavljaju ovisno o aktivnoj molekuli koja se pokušava razgraditi. Cilj je postizanje 5-20 % razgradnje barem za neke od uvjeta. Nije preporučeno poticati preveliku razgradnju jer bi to moglo značiti gubitak ravnoteže između količine nastalih razgradnih produkata i pada sadržaja aktivne komponente.

Linearnost metode ispituje se mjerenjem različitih koncentracija otopina analita. Mjeri se odaziv i procjenjuje proporcionalnost odaziva promijeni koncentracije otopine. Ispitivanje se provodi u očekivanom rasponu koncentracija za analit.

Granica određivanja je najniža koncentracija koju je moguće sa sigurnošću odrediti. Obično se određuje mjerenjem visine pika analita koja mora biti deset puta veća od šuma bazne linije (engl. *signal to noise ratio*, $s/n \geq 10$).

Točnost analitičke metode je sposobnost metode da s visokom sigurnošću daje ispravne rezultate. Prikazuje se kao analitički povrat između izmjerenih rezultata i stvarnih vrijednosti. Obično se provodi na minimalno tri koncentracijska nivoa, a otopine se pripremaju u triplicatu.

Preciznost je mogućnost metode da ponovljeno generira istovjetne rezultate za isti uzorak neovisno o analitičaru, instrumentu ili laboratoriju. Predstavlja raspršenost mjerenja oko srednje vrijednosti, a ispituje se na tri načina: ponovljivost, intermedijska preciznost i reproducibilnost ili obnovljivost. Ponovljivost se evaluira na jednom sistemu, od strane jednog analitičara, u jednom danu ponavljanjem analize uzorka šest puta. Intermedijska preciznost podrazumijeva ponavljanje istog postupka od strane drugog analitičara, na drugom

sustavu, drugi dan. Ovom analizom mjeri se utjecaj slučajnih promjena na rezultate, slično kako i kod obnovljivosti koja dodatno podrazumijeva i promjenu laboratorija.

Radno područje metode je koncentracijski raspon analita u kojem je potvrđena linearnost, točnost i preciznost metode.

Robusnost je sposobnost metode da producira točne rezultate prilikom i unatoč malim slučajnim promjenama parametara metode. Parametri koji se ispituju unutar robusnosti ovise o metodi koja se validira. Rezultati prikupljeni uz promjenu nekog od parametara metode uspoređuju se s rezultatima analize koja nije uključivala promjenu.

Stabilnost otopina je procjena dozvoljenog vremena između pripreme uzorka i ispitivanja. Mjeri se ponovljenom analizom otopina kroz vrijeme i praćenjem razlike odgovora za pojedine analite.

Filter studija ima za cilj pokazati da filteri koji se koriste u metodi ne utječu na rezultate analize. Provodi se tako da se dio uzorka filtrira kroz filter pri čemu se skupljaju frakcije filtrata. Rezultati frakcija se uspoređuju s centrifugiranim dijelom uzorka te izražavaju kao analitički povrat u odnosu na centrifugiranu frakciju.

2.5. Pregled dostupnih analitičkih metoda za određivanje izoniazida i rifabutina

Monografije za izoniazid i rifabutin aktivne tvari dostupne su u važećim verzijama Europske (Ph.Eur.) i Američke farmakopeje (USP). Europska farmakopeja propisuje određivanje količine izoniazida titracijom s kalijevim bromatom te onečišćenja tekućinskom kromatografijom. Određivanje onečišćenja provodi se HPLC tehnikom na C18 nepokretnoj fazi uz gradijentno eluiranje puferom pH 6,9 i metanolom.¹¹³ USP propisuje određivanje sadržaja i onečišćenja izoniazida HPLC tehnikom uz eluiranje puferom pH 6,9 i metanolom na C8 nepokretnoj fazi.³⁴ Određivanje rifabutina i onečišćenja prema Ph.Eur. provodi se također tekućinskom kromatografijom primjenom C8 nepokretne faze te elucijom s pokretnom fazom pH 6,5.¹¹³ Slične uvjete kromatografske metode za određivanje aktivne tvari rifabutina i njegovih onečišćenja, ali na nepokretnoj fazi C18, propisuje i USP.³⁴

Gotovi farmaceutski pripravci koji sadrže aktivne tvari izoniazid ili rifabutin također imaju važeće USP monografije. Za tablete izoniazida, USP propisuje određivanje sadržaja izoniazida na C8 koloni, eluiranjem sa smjesom pufera pH 6,9 i metanola.³⁴ Određivanje onečišćenja nije propisano, ali monografija sadrži ispitivanje oslobađanja u 900 mL 0,01 mol L⁻¹ klorovodične kiseline (HCl) na aparaturi 1 uz 100 okreta po minuti.³⁴ Za kapsule rifabutina određivanje sadržaja aktivne tvari i onečišćenja provodi se kromatografskom metodom za rifabutin, a oslobađanje se ispituje u 900 mL 0,01 mol L⁻¹ HCl, na aparaturi 1 uz 100 okreta po minuti.³⁴

Osim toga, i FDC oblici koji sadrže izoniazid imaju važeće monografije. Tri su važeće monografije: za FDC formulaciju koja sadrži izoniazid i rifampicin, zatim za FDC formulaciju koja sadrži izoniazid, rifampicin i pirazinamid, te za FDC koji sadrži izoniazid, rifampicin, pirazinamid i etambutol hidroklorid. Sve tri monografije propisuju metode za određivanje sadržaja aktivnih tvari, ali ne i određivanje onečišćenja.³⁴

Kako se ove aktivne tvari niz godina koriste u liječenju tuberkuloze ne čudi izniman broj objavljenih analitičkih metoda određivanja u raznovrsnim matricama.^{114–117} Budući da se više antituberkulotika koristi istovremeno u terapiji, ili je slučaj da se uz ove lijekove koriste i druge terapije, vrlo su česte metode za istovremeno određivanje više aktivnih komponenti.^{118–120} Metode za istovremeno određivanje više aktivnih tvari primjenjuju se za analize iz bioloških matrica u svrhu kontrole učinkovitosti terapije i kliničkih studija, ali isto tako i za ispitivanje kvalitete višekomponentnih formulacija.^{121–124} Ipak, s obzirom na čestu pojavu

rezistencije na terapiju, analitičke metode iz bioloških matrica prevladavaju u dostupnoj literaturi. Brzo uočavanje nedostatnog odgovora na propisanu terapiju omogućava promjenu terapije i veću vjerojatnost uspješnog izlječenja u konačnici.

Kim i suradnici 2015. godine objavljuju brzu sveobuhvatnu LC-MS/MS metodu za određivanje čak 20 antituberkulotika iz plazme kod pacijenata s MDR-TB.¹²⁵ Kako bi što ranije otkrili pacijente s lošim odgovorom na terapiju, Gerona i suradnici predlažu metodu za određivanje 11 antituberkulotika iz kose. Ističu da je prednost kose kao matrice mogućnost mjerenja dugoročne izloženosti lijeku, a postupak uzimanja uzorka nije invazivan kao u slučaju uzoraka iz drugih bioloških matrica.¹²⁶

Osim uz druge ksenobiotike dostupne su i metode određivanja antituberkulotika i bioloških molekula. Ermolenko i suradnici predlažu metodu kapilarne elektroforeze za simultano određivanje rifabutina i humanog serumskog albumina (HSA).¹²⁷ HSA se koristi u formulacijama kao stabilizator, funkcionalna pomoćna tvar ili sredstvo koje s aktivnom komponentom stvara konjugat, time pridonoseći boljim svojstvima formulacije.

Otkriće međusobne nekompatibilnosti više antituberkulotika u prošlom stoljeću također je popraćeno razvojem prikladnih analitičkih metoda. Glavna zadaća u tom slučaju je uočavanje interakcija i detekcija razgradnih produkata. Shishoo^{6,12} koristi HPTLC metodu, a Singh⁷ i Sankar⁹ HPLC metodu za detekciju izoniazida, rifampicina te produkata razgradnje zbog nekompatibilnosti ovih aktivnih tvari.

Interakcije četiri antituberkulotika prve linije terapije, izoniazida, rifampicina, etambutol hidroklorida i pirazinamida ispituju LC-MS/MS metodom u svom radu Bhutani i suradnici. Potvrđuju ranije uočene nekompatibilnosti aktivnih komponenti, ali i negativan utjecaj pomoćnih tvari na stabilnost formulacije. Naglašavaju važnost ispitivanja kompatibilnosti pomoćnih tvari kako bi se osigurala kvalitetna i stabilna konačna formulacija.¹³

Wollinger u svom radu iz 2016. objavljuje razvoj metode za određivanje izoniazida i njegovih razgradnih onečišćenja izonikotinamida i izonikotinske kiseline. HPLC metoda je razvijena za potrebe ispitivanja interakcija u formulaciji tableta izoniazida. Nestabilnost je uočena kod prisustva visoke količine vlage u formulaciji i pomoćnih tvari koje sadrže aluminijev hidroksid.⁹⁰

Pretraživanjem literature utvrđeno je da je uz veliki broj primjena objavljenih analitičkih metoda dostupan čitav niz različitih analitičkih tehnika koje se koriste za određivanje izoniazida i rifabutina. Od spektroskopskih metoda^{115,123}, preko kapilarne elektroforeze¹²⁷ i

tankoslojne kromatografije^{6,12,121} do često korištene tekućinske kromatografije.^{90,114,116,122,128,129} Posljednjih godina sve su češće u primjeni metode koje koriste sustav tekućinske kromatografije vezan sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS). Unatoč visokoj cijeni prednost metoda koje koriste ovu tehniku je iznimna osjetljivost i selektivnost.^{125,126,130–132} Uz LC-MS/MS metode dostupne su i metode na vezanom sustavu fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima sa spektrometrijom masa. Prajapati i suradnici 2014. godine objavljuju metodu za određivanje izoniazida i pirazinamida ekološki prihvatljivom tehnikom SFC-MS/MS, a samo godinu dana kasnije i aplikaciju za razgradna onečišćenja izoniazida, izonikotinsku kiselinu i izonikotinamid.^{124,133}

Unatoč velikom broju dostupnih metoda za određivanje antituberkulotika iz farmaceutskih proizvoda i bioloških matrica, nisu pronađene analitičke metode kojima bi se istovremeno određivao sadržaj aktivnih tvari i onečišćenja iz FDC formulacije koja sadrži izoniazid i rifabutin. Također, u dostupnoj literaturi nema informacija o kompatibilnosti dviju aktivnih tvari i njihovoj prikladnosti za FDC formulaciju, iako se obje koriste u terapiji tuberkuloze, a izoniazid je prisutan i u dostupnim FDC formulacijama.

2.6. Dizajn eksperimenata u razvoju analitičkih metoda

Dizajn eksperimenata (engl. *Design of Experiments*, DoE) dio je znatno šireg koncepta (engl. *Quality by Design*, QbD) kojeg su uvele regulatorne agencije s ciljem ugrađivanja kvalitete u farmaceutski proizvod od samog početka njegovog razvoja. QbD predstavlja sistematičan pristup razvoju lijeka koji se bazira na unaprijed definiranim ciljevima i stavlja naglasak na razumijevanje proizvoda i procesa. Odabrani procesi proizvodnje i kontrole lijeka trebaju biti utemeljeni na znanstvenim činjenicama te upravljanju rizicima.¹³⁴ Kod tradicionalnog pristupa kvaliteta se osiguravala tek analizom uzorka na kraju proizvodnog ciklusa.¹³⁵

Detaljno opisan QbD pristup omogućava brži pregled proizvoda od strane regulatornih agencija, a time i brži dolazak proizvoda na tržište do pacijenata. Očekivanja regulatornih agencija opisana su u smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonisation* (ICH)), ICH Q8(R2) i Q9, a odnose se uglavnom na QbD u razvoju formulacije i procesa proizvodnje.^{134,136}

Istovremeno se razvija QbD pristup u razvoju analitičkih metoda (engl. *Analytical Quality by Design*, AQbD). Iako se koncepti opisani u navedenim vodičima mogu primijeniti i u AQbD, detaljnijih smjernica od strane regulative zasad nema. Ciljevi uvođenja AQbD principa u razvoj analitičke metode su:

- Razvoj robusne metode i definiranje raspona vrijednosti parametara koji ne utječu na konačne rezultate analize,
- Smanjen rizik uočavanja rezultata izvan specifikacije (engl. *Out of specification*, OOS) ili izvan trenda (engl. *Out of trend*, OOT) uzrokovanih greškom metode,
- Fleksibilnost kod promjene parametara metode i
- Smanjenje troškova razvoja metode.

AQbD stavlja naglasak na razumijevanje prednosti i ograničenja analitičkih postupaka. Kako kvaliteta lijeka ovisi o pouzdanosti i točnosti analitičkih rezultata jasno je zašto su važne pouzdane analitičke metode.

Proces kreiranja DoE započinje prepoznavanjem kritičnih atributa kvalitete (CQA) te kritičnih procesnih parametara (engl. *Critical Process Parameters*, CPP). CQA podrazumijeva čimbenike koji utječu na analizu određenom metodom i na rezultate analize. CPP su parametri metode koji imaju utjecaj na CQA. Uz pomoć DoE uspostavlja se korelacija

između CPP i CQA te definira prostor u kojem promjene CPP daju prihvatljive vrijednosti za CQA. Cilj je odabir uvjeta metode koji omogućavaju robusne analize i što manji utjecaj izvedbe analize na rezultate.

Prednost razvoja metode kroz DoE je mogućnost uočavanja utjecaja pojedinačnih čimbenika, njihovih međusobnih interakcija i utjecaja nelinearnih efekata na CQA.¹³⁵

Dosadašnja praksa uključivala je evaluaciju parametara metode pojedinačno. Na taj način međusobni utjecaj različitih parametara ostaje neispitan. Rizik od kasnijih nedostataka metode je velik, a ponekad zahtjeva naknadni razvoj, ponovljenu validaciju i transferiranje metode.

Za razvoj i optimizaciju kromatografskih metoda često se koristi računalni program DryLab[®] (Molnar Institute, Berlin, Njemačka).

DryLab[®] ima mogućnost ispitivanja odabranih CQA za promjene do tri parametra istovremeno iz samo 2-12 eksperimenata. Relativno jednostavan računalni program omogućava ispitivanje višedimenzionalnog utjecaja CPP na razdvajanje analita uz pomoć alata praćenja pikova (engl. *Peak tracking*). Analiti se prate prema njihovom vremenu zadržavanja i površini. Može se primijeniti za metode tekućinske i plinske kromatografije. Iz prikupljenih rezultata program računa 2D ili 3D matematičke modele. Matematički model predviđa vremena zadržavanja analita i izgled kromatograma i za eksperimente koji nisu provedeni. Na ovaj način, iz najviše 12 pokusa program izračunava optimalne uvjete metode te predlaže robusnost na odabranim uvjetima. Iz grafičkih prikaza modela mogu se uočiti i uvjeti koji daju loše rezultate što omogućava definiranje raspona u kojem metoda prikladno funkcionira. Robusni prihvatljivi rezultati za odabrane CQA označeni su crvenom bojom na grafičkim prikazima modela (rezolucijskoj mapi ili rezolucijskoj kocki).¹³⁷

DryLab[®] nije primjenjiv za uvjete fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima. Stoga je moguće za dizajn eksperimenata kod razvoja metode SFC tehnikom koristiti statistički računalni program kao što je JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD). Osmišljen je 1989. godine, a danas obuhvaća skup statističkih programa. JMP za razliku od DryLab[®] nije isključivo kromatografski program pa je moguće evaluiranje i većeg broja CPP i CQA. Nakon unošenja CPP koji se žele ispitati kroz dizajn eksperimenata, program predlaže optimalni dizajn. Na temelju eksperimentalnih rezultata računaju se matematički modeli. Čimbenici koji opisuju svaki od ispitivanih parametara upućuju na značaj tog parametra za mjereni CQA. Modeli pokazuju i interakcije između parametara te nelinearne utjecaje

pojedinih promjena. Optimiranjem odgovora za sve modele istovremeno program daje najpovoljnije uvjete metode.^{138,139}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U doktorskom radu korištene su sljedeće kemikalije:

Metanol, HPLC-čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)
2-propanol, HPLC-čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)
Etanol, HPLC-čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)
Acetonitril, HPLC-čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)
Amonijev acetat, p.s. čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)
Trifluorooctena kiselina, p.s. čistoće, Merck (Darmstadt, Njemačka)
Amonijev formijat, HPLC-čistoće, (Steinheim, Švicarska)
Mravlja kiselina, p.a. čistoće, Lach-Ner (Neratovice, Češka)
Trietilamin (TEA), $\geq 99,5$ %, p.a. čistoće, Sigma Aldrich (Steinheim, Švicarska)
Dimetilsulfoksid, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)
n-heptan, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)
Klorovodična kiselina min. 36,5 %, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)
Fosforna kiselina, min. 85 %, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)
Kalijev dihidrogenfosfat p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)
Limunska kiselina, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)
N-metil-2-pirolidon, GC čistoće, Bisolve Chimie SARL (Dienze, Francuska)
Benzilni alkohol, GC čistoće, Sigma Aldrich (St. Luis, SAD)
Ledena octena kiselina, 100 %, p.a. čistoće, Kemika
Svježe pročišćena voda, pripremljena u Milli Q Water sustavu za pročišćavanje, Millipore (Eschborn, Njemačka)
Ugljikov dioksid (CO₂), $\geq 99,998$ %, Messer (Sint-Pieters-Leeuw, Belgija)
Natrijev hidrogenfosfat, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)

Natrijev hidroksid, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)

Kalijev hidroksid, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)

Amonijak, otopina min. 25 %, p.a. čistoće., Kemika, (Zagreb, Hrvatska)

Vodikov peroksid, min. 30 %, p.a. čistoće, Kemika, (Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Farmaceutske pomoćne tvari

Laktoza monohidrat, DFE Pharma (Nörten-Hardenberg, Njemačka)

Mikrokristalinična celuloza, FMC Biopolymer (Cork, Irska)

Natrij kroskarmeloza, FMC Biopolymer (Cork, Irska)

Silicijev dioksid, Evonik (Darmstadt, Njemačka)

Magnezijev stearat, Peter Greven (Venlo, Nizozemska)

Manitol, Merck (Darmstadt, Njemačka)

Škrob, Roquette (Lestrem, Francuska)

Natrijev lauril sulfat, BASF (Ludwigshafen, Njemačka)

Krospovidon, Ashland (Rotterdam, Nizozemska)

3.1.3. Radni standardi

Izoniazid, Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)

2-Izoniazid, Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)

3-Izoniazid, Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)

Acetil Izoniazid, Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)

Izonikotinamid, Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)

Rifabutin, Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)

25-O-desacetil rifabutin, Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)

Izonikotinska kiselina, Sigma Aldrich (Buchs, Švicarska)

3.2. Instrumenti i metode

3.2.1. Priprema otopina i uzoraka

Za pripremu otopina i odvage uzoraka korištene su analitičke vage Mettler Toledo AT-261 i Mettler Toledo MX 5 (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, SAD), 780 pH meter Metrohm (Metrohm AG, Herisau, Švicarska), te ultrazvučna kupelj Sonorex digital 10P, Bandelin (Bandelin, Berlin, Njemačka).

Priprema kompakata za ispitivanje kompatibilnosti napravljena je uz pomoć hidraulične preše Specac (Specac Ltd., Orpington, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Za miješanje otopina kod ispitivanja topljivosti korištena je recipročna tresilica IKA Labortechnik HS 250 basic (IKA Labortechnik, Staufen, Njemačka).

3.2.2. Tekućinska kromatografija

Za razvoj i validaciju UHPLC metode korišten je tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti Waters UPLC H-class (Waters Corporation, Milford, MA, SAD). Sustav se sastoji od kvarterne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 10 μL , odjeljka za kolonu te UV/Vis detektora s nizom dioda. Na sustav je spojen i dodatni detektor spektrometar masa, QDa. QDa koristi ionizaciju elektroraspršenjem i jednostruki kvadrupolni analizator masa. Analize su provedene gradijentnim načinom eluiranja koristeći otopinu amonijevog acetata ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,3, kao pokretnu fazu A, i metanol, kao pokretnu fazu B, kroz tri segmenta. U prvih 6 minuta, promjena pokretne faze B bila je $0 \rightarrow 15 \%$, a zatim $15 \rightarrow 90 \%$ u sljedećih 10 minuta. Posljednji segment od 6 minuta izokratno je eluiranje pri 90% pokretne faze B. Protok je bio $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ na nepokretnoj fazi Kinetex F5, $150 \times 2,1 \text{ mm}$, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$, termostatiranoj na 15°C . Volumen injektiranja bio je $5,0 \mu\text{L}$. Kromatogrami su snimani na 260 nm . Za određivanje acetil izoniazida metodi je dodan MS detektor (QDa). Za određivanje iona s m/z 180 korištena je pozitivna ESI ionizacija uz dušik kao nebulizacijski plin. U metodi je korišten napon na kapilari $0,8 \text{ V}$ (engl. *Capillary voltage*) i konusni napon (engl. *Cone voltage*) od 10 V . Metoda je validirana prema ICH smjernicama.

3.2.3. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima

Razvoj i validacija SFC metode napravljena je na Acquity Ultra Performance Convergence Chromatography (UPC²) instrumentu (Waters Corporation, Milford, MA, SAD). Instrument je sličan UHPLC instrumentu uz dodatni dio, regulator tlaka (ABPR), važan za održavanje pokretne faze u superkritičnim uvjetima. Binarna pumpa je kod UPC² spojena s izvorom CO₂ i spremnicima modifikatora. Sustav sadrži još i otplinjač, automatski uzorkivač maksimalnog volumena injektiranja do 10 µL, odjeljak za kolonu s grijačem te UV/Vis detektor. I kod ove metode korišten je gradijentni način eluiranja pri čemu je pokretna faza A bio superkritični CO₂, a pokretna faza B smjesa MeOH-2-PrOH-TEA-H₂O (u volumnim omjerima 70:28:0,1:2). Protok je bio 1,5 mL min⁻¹, a eluiranje je provedeno kroz deset minuta uz promjenu pokretne faze B od 0 % do 13 %. ABPR je postavljen na 2200 psi (15168 kPa). Za analize je korištena nepokretna faza Acquity UPC²™ Torus DEA, 130Å, 3,0 × 100 mm, veličine čestica 1,7 µm, na temperaturi 45 °C. Kromatogrami su snimani na 260 nm za određivanje rifabutina i onečišćenja, dok se izoniazid određivao pri 205 nm zbog boljih rezultata validacije za ovu aktivnu komponentu. Metoda je validirana prema ICH smjernicama.

3.2.4. Ispitivanje *In vitro* oslobađanja

Studije *In vitro* oslobađanja provedene su prema monografiji za kapsule rifabutina iz Američke farmakopeje (USP) na USP aparaturi 1. Korištena je kupelj VK7010 (VanKel Technology Group Inc. Cary, NC, SAD). Oslobađanje je provedeno u 900 mL 0,01 mol L⁻¹ HCl, na 37 ± 0,5 °C uz vrtnju košarica od 100 okreta po minuti. Dodatne točke uzorkovanja, u odnosu na propisano monografijom (45. minuta), uvedene su kako bi se analizirao profil oslobađanja. Otopina je uzorkovana u 10., 15., 30. i 45. minuti uz nadoknađivanje uzorkovanog volumena. Otopina je filtrirana kroz Whatman RC 0,2 µm filter uz odbacivanje prva dva mililitra filtrata. Količina oslobođenih aktivnih tvari određena je UHPLC metodom, mjerenjem apsorbancije na 280 nm.

3.2.5. Spektrometrija masa

Za potrebe karakterizacije nepoznatih onečišćenja nastalih u studiji kompatibilnosti korišten je spektrometar masa Agilent 6650 iFunnel kvadrupol TOF vezan s tekućinskim kromatografom Agilent 1290 LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Sustav se sastoji od kvarterne pumpe, termostatiranog odjeljka za kolonu, termostatiranog uzorkivača, detektora s nizom dioda i MS detektora s ESI ionizacijom. Pri analizi su zadržani kromatografski parametri ranije opisane UHPLC metode. Dušik je korišten kao nebulizacijski i pomoćni plin na 200 °C uz protok 14 L min⁻¹. Potencijal na kapilari bio je 3500 V, a otparivač je postavljen na 35 psi. U tandemnoj spektrometriji masa korištene su kolizijske energije od 5 do 70 eV. Temperatura plina za formiranje kapljica bila je 350 °C (engl. *sheath gas*) uz protok 11 L min⁻¹.

3.3. Računalni programi

Oba kromatografska sustava pokretana su računalnim programom Empower[®], verzija 2 (Waters Corporation, Milford, MA, SAD).

Za dizajn eksperimenata, izračun matematičkih modela i interpretaciju rezultata korišteni su računalni programi DryLab[®] (Molnar Institute, Berlin, Njemačka) i JMP[®], verzija 13.2.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD).

Marvin JS (Chemaxon, Mađarska) korišten je za izračun log D krivlja.

Snimanje spektara masa i obrada podataka napravljena je uz pomoć MassHunter Data Acquisition za Q-TOF B.06.01, B6157 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

3.4. Priprema otopina

3.4.1. Priprema vodenih otopina i pufera

Puferske otopine različitog pH pripremljene su kako bi se ispitala pH ovisnost topljivosti za obje aktivne tvari. Vodena otopina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl pripremljena je razrjeđivanjem $0,83 \text{ mL}$ koncentrirane HCl (36,5 %) u 1000 mL pročišćene vode.³⁴

Vodena otopina $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HCl pripremljena je razrjeđivanjem $8,2 \text{ mL}$ koncentrirane HCl (36,5 %) u 1000 mL pročišćene vode.³⁴

Fosfatni pufer pH 2,5 pripremljen je otapanjem 10 g kalijevog dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) u 100 mL pročišćene vode, a pH je podešen s HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na 2,5.¹¹³

Mellvaine pufer pH 4,0 pripremljen je miješanjem $77,1 \text{ mL}$ natrijevog hidrogen fosfata ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2HPO_4) i $122,9 \text{ mL}$ limunske kiseline ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Pufer pH 6,8 pripremljen je otapanjem $0,9 \text{ g}$ natrij hidroksida (NaOH) i $6,8 \text{ g}$ KH_2PO_4 u 1000 mL , nakon čega je pH podešen s koncentriranom fosforom kiselinom (H_3PO_4).³⁴

Fosfatni pufer pH 7,5 pripremljen je otapanjem $27,2 \text{ g}$ KH_2PO_4 u 1000 mL vode, a pH je podešen s otopinom kalijevog hidroksida (300 g L^{-1} , KOH).¹¹³

3.4.2. Priprema otopina za ispitivanje topljivosti

Ispitivanje topljivosti provedeno je za izoniazid i rifabutin u svrhu određivanja prikladne koncentracije uzoraka te odabira optimalnog otapala. Topljivost je ispitana metodom prezasićene otopine u metanolu, etanolu, acetonitrilu, 2-propanolu, dimetilsulfoskidu (DMSO), *n*-heptanu, N-metil-2-pirolidonu (NMP), vodi i vodenim otopinama različitog pH (1,1, 2,5, 4,0, 6,8 i 7,5). Izoniazid i rifabutin su dodani u suvišku u 10 mL svakog ispitivanog otapala. Zatvorene tikvice s uzorcima postavljene su na tresilicu te miješane brzinom 90 pokreta po minuti kroz 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata uzorkovan je supernatant te filtriran kroz Whatman RC $0,2 \mu\text{m}$ filter uz odbacivanje prva dva mililitra filtrata. Kod uzoraka u otapalima u kojima su analiti dobro topljivi bilo je potrebno dodatno razrjeđivanje kako bi mjerenje bilo unutar linearnog raspona detektora. Češće je to bio slučaj za izoniazid pa je tako uzorak u 2-propanolu razrijeđen 5 puta, uzorak u acetonitrilu razrijeđen 10 puta, uzorci u vodi, etanolu, benzilnom alkoholu, NMP-u, DMSO-u i metanolu 20 puta, a sve ostale

otopine izoniazida 200 puta. Jedino uzorak u *n*-heptanu nije bio razrijeđen budući da se topljivost u ovom otapalu pokazala zanemariva.

Uzorci rifabutina u metanolu i vodenim otapalima razrijeđeni su 20 puta prije analize. Za uzorke rifabutina u vodi, acetonitrilu, etanolu, DMSO-u, NMP-u, *n*-heptanu i benzilnom alkoholu razrjeđenje je bilo 10 puta, a za uzorak otopljen u 2-propanolu 5 puta. Razrjeđenja su unesena u izračun za koncentracije otopljene tvari.

3.4.3. Priprema uzoraka za UHPLC određivanje

Uzorci za analizu UHPLC metodom pripremljeni su otapanjem analita u smjesi metanola i vode, u jednakom volumnom omjeru. Radna koncentracija izoniazida i rifabutina bila je $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Otopine uzoraka filtrirane su kroz Whatman Spartan $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ filter uz propuštanje prva dva mililitra uzorka.

Otopine za ispitivanje linearnosti pripremljene su razrjeđivanjem $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ otopine izoniazida i rifabutina na četiri niža koncentracijska nivoa kako bi se ispitala linearnost u rasponu $0,1 - 0,3 \text{ mg mL}^{-1}$. Uzorci za ispitivanje točnosti metode za određivanje sadržaja aktivnih komponenti pripremljeni su dodavanjem izoniazida i rifabutina u smjesu pomoćnih tvari. Koncentracijski raspon bio je jednak kao i za ispitivanje linearnosti. Uzorci su filtrirani kroz Whatman Spartan $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ filter uz propuštanje prva dva mililitra uzorka. Svaki koncentracijski nivo pripremljen je u triplicatu.

Otopine za ispitivanje linearnosti onečišćenja pripremljene su razrjeđivanjem otopina standarada izoniazida, rifabutina i onečišćenja koncentracije $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$. Pripremljeno je pet koncentracijskih nivoa u rasponu $0,0002 - 0,004 \text{ mg mL}^{-1}$. Otopine su pripremljene u smjesi metanola i vode, pomiješane u jednakim volumnim omjerima. U svrhu ispitivanja točnosti određivanja onečišćenja, analiti su dodani u otopinu pomoćnih tvari u tri koncentracijska nivoa u istom rasponu kao i za linearnost, osim za 2-izoniazid gdje je najniži koncentracijski nivo $0,0004 \text{ mg mL}^{-1}$. Uzorci za ispitivanje točnosti pripremljeni su u istom otapalu, u triplicatu za svaki nivo, te filtrirani prije analize uz odbacivanje prva dva mililitra uzorka.

Granica određivanja ispitana je na koncentraciji $0,0002 \text{ mg mL}^{-1}$.

Uzorci za ispitivanje preciznosti pripremljeni su dodavanjem 1800 mg izoniazida smjesi dobivenoj pražnjenjem 12 kapsula rifabutina (150 mg). Nakon miješanja u tarioniku

pripremljene su odvage smjese te otopljene u smjesi metanola i vode. Koncentracija izoniazida i rifabutina bila je $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.4.4. Priprema uzoraka za SFC određivanje

Uzorci za analizu SFC metodom pripremljeni su otapanjem u smjesi *n*-heptana i 2-propanola. 2-propanol je u odnosu na *n*-heptana u smjesi bio volumeno devet puta zastupljeniji. Radna koncentracija izoniazida i rifabutina bila je 2 mg mL^{-1} .

Uzorci za ispitivanje linearnosti pripremljeni su razrjeđivanjem otopine koncentracije izoniazida i rifabutina ($3,0 \text{ mg mL}^{-1}$) na četiri niža nivoa. Otopine su mjerene s izvornom otopinom kako bi postigli ukupno pet nivoa u rasponu $1,2 - 3,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

Otopine za procjenu točnosti za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina priređene su dodavanjem tih tvari u otopinu pomoćnih tvari u koncentracijskom rasponu analita $1,2 - 2,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Pripremljena su tri koncentracijska nivoa, svaki u triplikatu.

Linearnost za određivanje onečišćenja ispitana je pripremom otopina izoniazida u rasponu $0,004 - 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$, rifabutina, acetil izoniazida, izonikotinamida i 25-O-desacetil rifabutina u rasponu $0,002 - 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ te 2-izoniazida i 3-izoniazida u rasponu $0,008 - 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$. Za svaki od analita pripremljeno je pet koncentracijskih nivoa razrjeđivanjem u smjesi *n*-heptana i 2-propanola volumnog omjera 1:9.

Za ispitivanje točnosti kod određivanja onečišćenja otopine su pripremljene dodavanjem izoniazida u rasponu $0,004 - 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$, rifabutina, acetil izoniazida, izonikotinamida i 25-O-desacetil rifabutina u rasponu $0,002 - 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ te 2-izoniazida i 3-izoniazida u rasponu $0,008 - 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ u otopinu pomoćnih tvari. Pripremljena su tri koncentracijska nivoa za svaki od analita, u triplikatu te filtrirana kroz Whatman Spartan $0,2 \mu\text{m}$ filter uz propuštanje prva dva mililitra filtrata.

Ispitivanje granice određivanja provedeno je na otopinama rifabutina, acetil izoniazida, izonikotinamida i 25-O-desacetil rifabutina koncentracije $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$, izoniazida koncentracije $0,004 \text{ mg mL}^{-1}$ te 2-izoniazida i 3-izoniazida koncentracije $0,008 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.4.5. Priprema uzoraka za određivanje kompatibilnosti

Za potrebe ispitivanja kompatibilnosti pripremljene su smjese izoniazida i rifabutina (dvokomponentne smjese), u jednakom masenom omjeru. Prašci izoniazida i rifabutina pomiješani su u homogenu smjesu u tarioniku.

Dvokomponentna smjesa dodatno je pomiješana s devet pomoćnih tvari, uobičajeno korištenih u suhim oralnim lijekovitim pripravcima, pojedinačno. Svaka od ispitanih pomoćnih tvari (škrob, manitol, laktoza monohidrat, silicijev dioksid, natrij kroskarmeloza, krosповidon, magnezijev stearat, natrijev lauril sulfat i mikrokristalinična celuloza) dodana je smjesi izoniazida i rifabutina tako da s njima tvori trokomponentnu smjesu. Pomoćne tvari su umiješane u omjerima koji odgovaraju najvećim količinama preporučenim za oralne lijekovite pripravke.⁶⁵

Sastav dvokomponentnih i trokomponentnih smjesa prikazan je u tablici 1. Uz pomoć ručne hidraulične preše pripremljeni su kompakti iz homogenih dvokomponentnih i trokomponentnih smjesa. Cilj pripreme kompakata bio je povećati dodirnu površinu sastavnica. Kompakti označeni brojevima 1, 2, 4 i 6-14 su postavljeni na uvjet čuvanja 40 °C i 75 % relativne vlage (RV). Uzorak broj 3 je čuvan na 25 °C i 60 % RV, a uzorak broj 5 na 50 °C, u staklenim bočicama.

Tablica 1. Sastav dvokomponentnih i trokomponentnih kompakata za ispitivanje kompatibilnosti ^a

Sastavnica	Oznaka kompakta													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
izoniazid	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
rifabutin	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
mikrokristalinična celuloza	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
natrijev lauril sulfat	-	-	-	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-
magnezijev stearat	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
silicijev dioksid	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
laktoza monohidrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-
kroskarmeloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
krosповidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12

^a Brojčane vrijednosti u tablici označavaju maseni omjer sastavnice u kompaktu.

Nakon 1 mjesec uzorci su izuzeti s uvjeta čuvanja. Pripremljene su otopine te analizirane prema razvijenim UHPLC i SFC metodama.

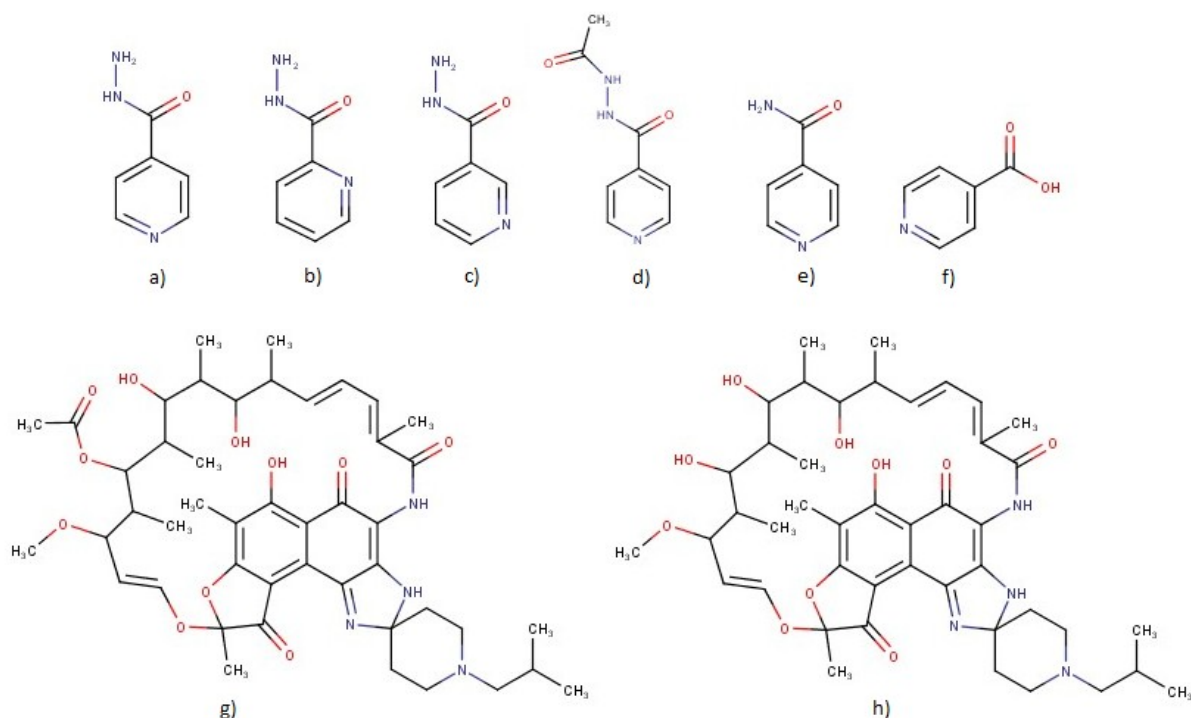
Dodatno, izoniazid je umješan u smjesu za kapsuliranje gotovog proizvoda kapsula rifabutina (sa 150 mg rifabutina). Sadržaj 12 kapsula ispražnjen je u tarionik te promiješan. U smjesu je homogeno umiješano 1800 mg izoniazida. Smjesa je čuvana na sobnoj temperaturi kroz 18 mjeseci u svrhu procjene dugoročne stabilnosti i kompatibilnosti dviju aktivnih tvari unutar formulacije.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu ispitivanja kompatibilnosti nove formulacije s dvije aktivne tvari bilo je potrebno razviti prikladne analitičke metode. Kako bi povećali vjerojatnost uočavanja svih razgradnih produkata, za razvoj metoda su korištene ortogonalne analitičke tehnike. DoE je primijenjen u razvoju metoda kako bi osigurali ugradnju kvalitete, a učinkovitost je potvrđena razvojem metoda za istovremeno određivanje sadržaja aktivnih komponenti i onečišćenja.

4.1. Razvoj UHPLC metode

Za dvije aktivne tvari kupljena su komercijalno dostupna onečišćenja (slika 10).



Slika 10. Strukturne formule: izoniazid (a), 2-izoniazid (b), 3-izoniazid (c), acetil izoniazid (d), izonikotinamid (e), izonikotinska kiselina (f), rifabutin (g) i 25-O-desacetil rifabutin (h)

Razvoj UHPLC metode započet je karakterizacijom analita kroz određivanje topljivosti za odabir prikladnog otapala te evaluiranjem log D krivulja.

4.1.1. Određivanje topljivosti

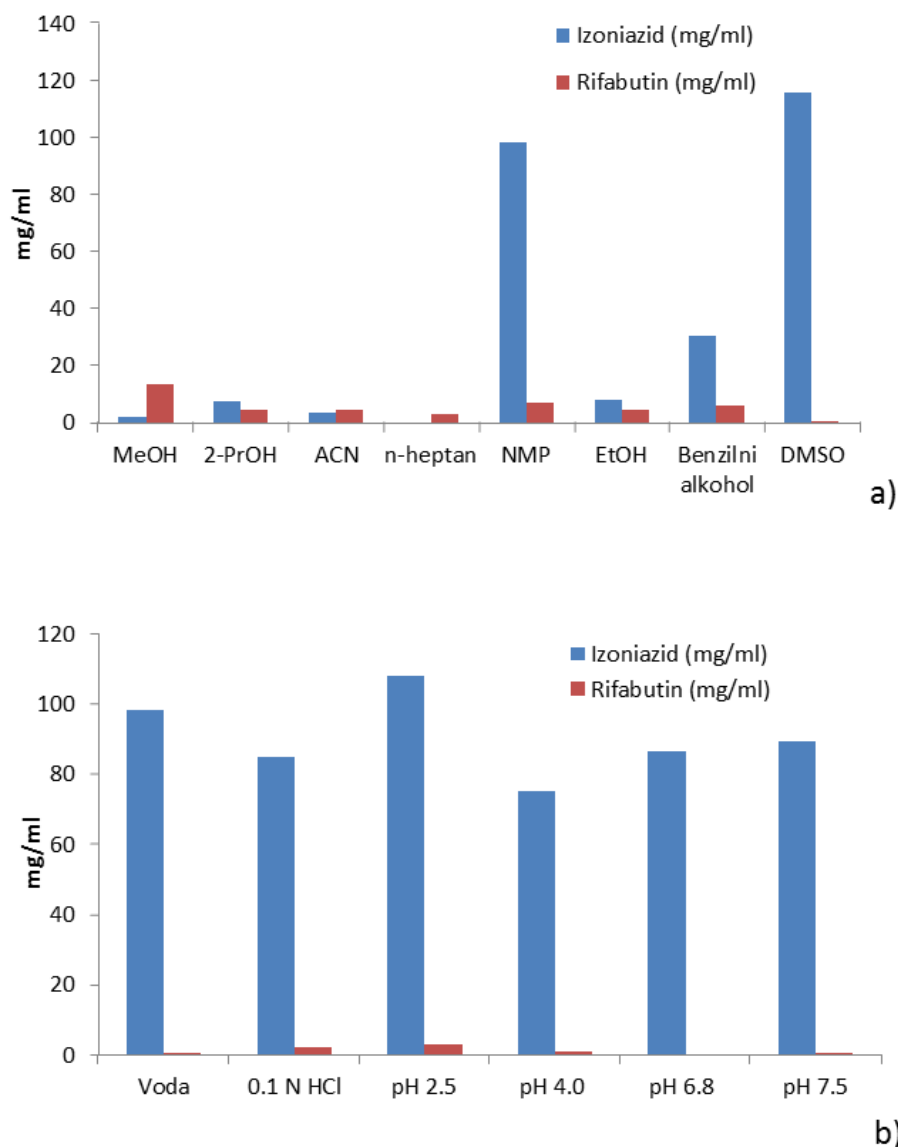
Topljivost je određena metodom prezasićene otopine u organskim i vodenim otapalima različitog pH. Otopine s uzorcima za ispitivanje topljivosti potresivane su kroz 24 sata na sobnoj temperaturi kako bi se postiglo ravnotežno stanje između neotopljenog dijela i supernatanta.³⁴ Otopljeni količina analita određena je iz supernatanta nakon filtracije kroz filter Whatman Spartan 0,2 μm te izražena kao najveća koncentracija (mg mL^{-1}) koja može biti otopljena u ispitivanom otapalu. Rezultati topljivosti za izoniazid i rifabutin prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Topljivost izoniazida i rifabutina

Otapalo	$C_{\text{izoniazid}} / \text{mg mL}^{-1}$	$C_{\text{rifabutin}} / \text{mg mL}^{-1}$
metanol (MeOH)	1,9	13,3
2-propanol (2-PrOH)	7,3	4,7
acetonitril (ACN)	3,4	4,3
<i>n</i> -Heptan	0,0	2,8
N-metil-2-pirolidon (NMP)	98,4	7,0
etanol (EtOH)	8,1	4,3
benzilni alkohol	30,4	5,9
dimetil sulfoksid (DMSO)	>115,9	0,3
Voda	98,1	0,1
vodeno otapalo pH 1,1 (0,1 mol L^{-1} HCl)	85,0	2,0
vodeno otapalo pH 2,5 (fosfatni pufer)	108,1	2,9
vodeno otapalo pH 4,0 (McIlvaine pufer)	75,3	0,7
vodeno otapalo pH 6,8 (fosfatni pufer)	86,3	0,0
vodeno otapalo pH 7,5 (fosfatni pufer)	89,2	0,1

Značajne razlike u strukturi dviju aktivnih tvari pokazale su se u rezultatima studije topljivosti. Isoniazid je jako dobro topiv u svim vodenim otapalima, te u DMSO-u i NMP-u. Manje je topiv u ACN-u, MeOH-u i praktički netopiv u *n*-heptanu. S druge strane, rifabutin je u vodenim otapalima prilično slabo topiv, a topljivost mu značajno raste u organskim

otapalima kao što su MeOH i NMP (slika 11). Rezultati topljivosti za izoniazid su značajno veći nego za rifabutin.



Slika 11. Rezultati topljivosti u organskim otapalima (a) i u vodenim otapalima (b)

S obzirom na rezultate topljivosti odabrano je otapalo i radna koncentracija aktivnih komponenti. U daljnjim ispitivanjima, u sklopu razvoja UHPLC metode, kao otapalo je korištena mješavina metanola i vode u volumenom omjeru 1:1.

4.1.2. Lipofilnost i koeficijent distribucije D

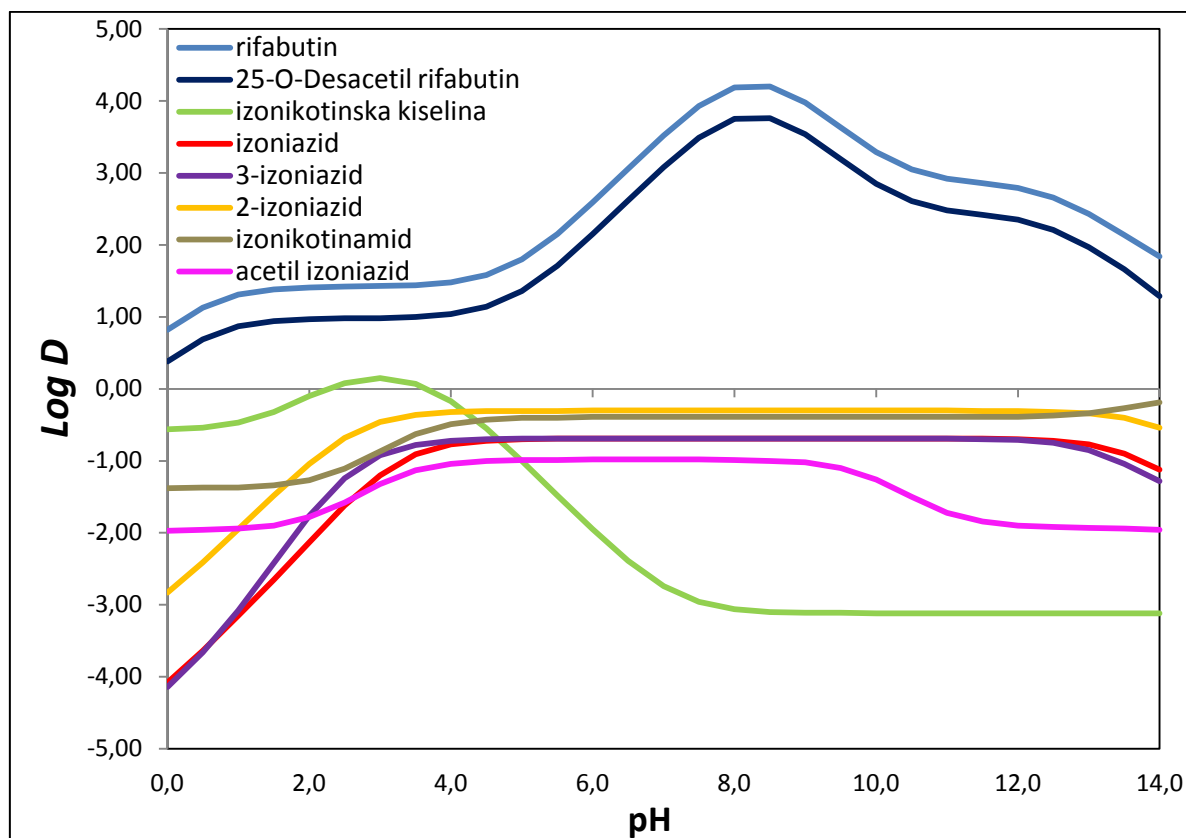
Lipofilnost je svojstvo tvari kojim se opisuje sposobnost otapanja te tvari u uljima, mastima i nepolarnim otapalima. Izražava se $\log D$, logaritam koeficijenta distribucije D te predstavlja omjer koncentracije tvari otopljene u n -oktanolu i koncentracije otopljene u vodi. Ova vrijednost pokazuje afinitet tvari prema hidrofilnom odnosno lipofilnom mediju, slično kao i $\log P$. Ipak, $\log P$ ne uzima u obzir ionizirane oblike molekule, a kako su koncentracije u dva otapala ovisne o stupnju ionizacije molekule, $\log D$ ovisi o pH medija.¹⁴⁰

Kako je ranije navedeno RP-LC se bazira na raspodjeli analita između hidrofilne pokretne faze i hidrofobne nepokretne faze, pa $\log D$ krivulja mogu ukazati na vrijeme zadržavanja na kromatografskom sustavu, odnosno redoslijed eluiranja za više analita.¹⁴⁰

Za izoniazid, rifabutin i njihove srodne spojeve analizirali smo $\log D$ krivulje koristeći računalni program Marvin JS. Rezultati su prikazani u tablici 3, a grafički prikaz krivulja na slici 12.

Tablica 3. Log D vrijednosti svih analita u rasponu pH 0–14

Log D								
pH	rifabutin	25-O-desacetil rifabutin	izonikotinska kiselina	izoniazid	2-izoniazid	3-izoniazid	izonikotinamid	acetil izoniazid
0,0	0,82	0,38	–0,56	–4,08	–4,14	–2,83	–1,38	–1,97
0,5	1,13	0,69	–0,54	–3,64	–3,66	–2,41	–1,37	–1,96
1,0	1,31	0,87	–0,47	–3,15	–3,08	–1,95	–1,37	–1,94
1,5	1,38	0,94	–0,32	–2,65	–2,42	–1,48	–1,34	–1,90
2,0	1,41	0,97	–0,10	–2,13	–1,76	–1,04	–1,27	–1,78
2,5	1,42	0,98	0,08	–1,62	–1,24	–0,68	–1,11	–1,58
3,0	1,43	0,98	0,15	–1,20	–0,92	–0,46	–0,87	–1,32
3,5	1,44	1,00	0,07	–0,91	–0,78	–0,36	–0,63	–1,13
4,0	1,48	1,04	–0,17	–0,77	–0,72	–0,32	–0,49	–1,04
4,5	1,58	1,14	–0,55	–0,72	–0,70	–0,31	–0,43	–1,00
5,0	1,80	1,36	–1,00	–0,70	–0,69	–0,31	–0,40	–0,99
5,5	2,15	1,71	–1,48	–0,69	–0,69	–0,31	–0,40	–0,99
6,0	2,59	2,15	–1,95	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–0,98
6,5	3,06	2,62	–2,39	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–0,98
7,0	3,52	3,08	–2,74	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–0,98
7,5	3,93	3,49	–2,96	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–0,98
8,0	4,19	3,75	–3,06	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–0,99
8,5	4,20	3,76	–3,10	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–1,00
9,0	3,98	3,54	–3,11	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–1,02
9,5	3,63	3,19	–3,11	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–1,10
10,0	3,29	2,85	–3,12	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–1,26
10,5	3,05	2,61	–3,12	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–1,50
11,0	2,92	2,48	–3,12	–0,69	–0,69	–0,30	–0,39	–1,72
11,5	2,89	2,42	–3,12	–0,69	–0,70	–0,31	–0,39	–1,84
12,0	2,79	2,35	–3,12	–0,70	–0,71	–0,31	–0,39	–1,90
12,5	2,66	2,21	–3,12	–0,72	–0,75	–0,32	–0,37	–1,92
13,0	2,43	1,97	–3,12	–0,77	–0,85	–0,34	–0,34	–1,93
13,5	2,14	1,66	–3,12	–0,90	–1,04	–0,40	–0,27	–1,94
14,0	1,84	1,29	–3,12	–1,12	–1,28	–0,54	–0,19	–1,96

Slika 12. Grafički prikaz log D krivulja analita

Log D vrijednosti ukazuju da izoniazid (crvena linija na slici 12) i rifabutin (svijetlo plava linija na slici 12) imaju značajno različite afinitete prema dvije faze kroz cijelo pH područje. Krivulje upućuju da ne bi trebalo biti poteškoća kod njihovog odvajanja na RP-LC sustavu.

Srodni spojevi uglavnom imaju krivulje slične log D krivuljama pripadajuće aktivne komponente, pa tako onečišćenje rifabutina, 25-O-desacetyl rifabutin (tamno plava linija na slici 12), ima u potpunosti jednak oblik log D krivulje kao rifabutin, ali nema međusobnog preklapanja. Niže log D vrijednosti ovog onečišćenja (tablica 3) upućuju na to da se za onečišćenje očekuje manje vrijeme zadržavanja nego za rifabutin. Preklapanje krivulje u dijelu ili u cijelom pH području označava jednaku raspodjelu analita između faza, te time i poteškoće prilikom razlučivanja analita reverzno faznom tekućinskom kromatografijom.

Za srodne spojeve izoniazida može se uočiti veća bliskost prikazanih krivulja. Krivulja 3-izoniazida (označen ljubičastom linijom) preklapa se s krivuljom izoniazida u velikom dijelu pH područja. Nešto manje bliske su krivulje acetil izoniazida (označen ružičastom linijom na slici 12) i izonikotinamida (označen smeđom linijom na slici 12). Prema položaju krivulja acetil izoniazid bi trebao biti slabije, a izonikotinamid jače zadržan na nepokretnoj fazi RP-

LC-a u odnosu na izoniazid. Krivulje 2-izoniazida (označen žutom linijom na slici 12) i izonikotinamida su također blisko postavljene u pH rasponu 3–14. Ipak, ova dva analita se u formulaciji očekuju u niskim koncentracijama, pa je manja vjerojatnost za njihovo koeluiranje nego što je to za onečišćenja uz izoniazid. Iz izračunatih vrijednosti, prikazanih u tablici 3, može se uočiti da izoniazid i svi njegovi srodni spojevi imaju pretežno negativne vrijednosti za $\log D$. Negativne vrijednosti označavaju hidrofilne supstance, što je u skladu i s rezultatima topljivosti prikazanim u poglavlju 4.1.1. Osobito niska $\log D$ vrijednost zabilježena je za izonikotinsku kiselinu (označeno zelenom krivuljom na slici 12) u neutralnom i lužnatom mediju. Negativne vrijednosti $\log D$ mogu značiti poteškoće sa zadržavanjem na obrnuto faznim kromatografskim kolonama.

4.1.3. Odabir nepokretne faze

Razmatranje $\log D$ krivulja uputilo je na moguće poteškoće sa zadržavanjem izoniazida i srodnih spojeva na nepokretnoj fazi. Zbog njihove međusobne strukturne sličnosti moguće je očekivati i koeluiranje pojedinih analita. Stoga je u preliminarnim ispitivanjima ispitano više UHPLC nepokretnih faza različite selektivnosti:

- Waters Acquity CSH Phenyl Hexyl $150 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$,
- Waters Acquity HSS T3 $50 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,8 \mu\text{m}$,
- Waters Acquity HSS PFP $100 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,8 \mu\text{m}$,
- Waters Acquity HSS Cyano $100 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,8 \mu\text{m}$,
- Phenomenex Kinetex C8 $150 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$,
- Phenomenex Kinetex Biphenyl, $150 \times 3,0$ mm, veličine čestica $2,6 \mu\text{m}$,
- Fortis Diphenyl $100 \times 2,1$, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$,
- Phenomenex Kinetex F5, $150 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$.

Za ove eksperimente kao pokretna faza A korišten je amonijev acetat ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,5, a kao pokretna faza B smjesa metanola i acetonitrila u omjeru 1:1. Temperatura kolone je bila 40°C , a protok $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Početni udio pokretne faze B bio je 2 % kroz prve 3 minute kako bi se osiguralo zadržavanje izoniazida i njegovih onečišćenja na koloni.

Kod prve ispitane kolone Waters Acquity CSH Phenyl Hexyl odmah je uočeno koeluiranje onečišćenja s izoniazidom (Dodatak 1, slika A1). Acetil izoniazid i 3-izoniazid nisu bili odvojeni od pika izoniazida. Zadržavanje i razlučivanje drugih analita bilo je

prihvatljivo i u skladu s log D krivuljama. Dva para pikova (acetil izoniazid i izoniazid te izoniazid i 3-izoniazid) prepoznati su kao kritični parovi.

Ni ispitivanje nepokretne faze Waters Acquity HSS T3 nije dalo zadovoljavajuće rezultate. Potpuno preklapanje uočeno je i za acetil izoniazid i za 3-izoniazid s izoniazidom (Dodatak 1, slika A2).

Na nepokretnoj fazi Waters Acquity HSS PFP uočeno je potpuno koeluiranje 3-izoniazida s izoniazidom. Ipak, acetil izoniazid bio je dobro odvojen od izoniazida (Dodatak 1, slika A3).

Analiza na koloni Waters Acquity HSS Cyano pokazala je dodatno koeluiranje 2-izoniazida s izoniazidom. 3-izoniazid nije bio odvojen od izoniazida kao i na ranije ispitanim kolonama (Dodatak 1, slika A4). Acetil izoniazid je eluirao prije izoniazida kao i na Waters Acquity HSS PFP.

Tijekom ispitivanja kolone Phenomenex Kinetex C8, uočeno je potpuno koeluiranje acetil izoniazida s izoniazidom (Dodatak 1, slika A5). Za ovu kolonu ispitana je i promjena pokretne faze B pa je umjesto smjese ACN/MeOH (u volumnom omjeru 1:1) mjerenje provedeno sa 100 % MeOH. Slabiji eluens, uz očekivano bolje zadržavanje, pokazao je nešto bolje razdvajanje, ali djelomično koeluiranje je i dalje bilo prisutno za acetil izoniazid (Dodatak 1, slika A6). Zamjena ACN/MeOH s 2-PrOH nije dala bolje rezultate (Dodatak 1, slika A7), a dodatno je zbog visokog tlaka na koloni, uzrokovanog viskoznošću 2-propanola, bilo potrebno smanjiti protok na $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ i povećati temperaturu kolone na 50°C .

Phenomenex Kinetex Biphenyl nepokretna faza dala je dotad najbolje rezultate za razdvajanje 3-izoniazida od aktivne molekule (Dodatak 1, slika A8). Acetil izoniazid je u ovom slučaju eluirao neposredno prije izoniazida. U svrhu njegovog boljeg razdvajanja pokretna faza B (ACN/MeOH u volumnom omjeru 1:1) je zamijenjena sa 100 % MeOH. Rezultati zamjene su bili slični kao i za prethodno ispitanu kolonu Phenomenex Kinetex C8 (Dodatak 1, slika A9). Usprkos obećavajućim rezultatima razlučivanja, na kromatogramu je uočen značajan rast bazne linije kod visokog udjela organskog otapala u pokretnoj fazi (Dodatak 1, slika A10). Porast bazne linije rezultat je nestabilnosti nepokretne faze i otkidanja aktivnih skupina punila, a onemogućio je ispravno određivanje rifabutina i njegovih onečišćenja. Ova pojava nije neuobičajena za bifenilne nepokretne faze. Zbog lipofilnosti rifabutina eluiranje s velikim udjelom metanola bilo je nužno zbog čega je i ova kolona, unatoč obećavajućim rezultatima razlučivanja, isključena iz daljnjih ispitivanja.

Ispitana je još jedna kolona s dvije fenilne grupe, Fortis Diphenyl. Kod ove kolone fenilne skupine nisu vezane serijski, kao što je to slučaj kod Kinetex Biphenyl, pa razlučivanje nije bilo ni približno dobro kao na prethodnoj koloni (Dodatak, slika A11). Acetil izoniazid i 3-izoniazid su koeluirali s izoniazidom iako se kolona pokazala puno stabilnija u odnosu na prethodno ispitano. Porast bazne linije nije uočen.

Osim Kinetex Biphenyl još je jedino Phenomenex Kinetex F5 (Dodatak 1, slika A12) pokazala razdvajanje kritičnih parova pikova (acetil izoniazid i izoniazid te izoniazid i 3-izoniazid). Kako je kod bifenilne kolone uočena nestabilnost prilikom eluiranja s visokim organskim udjelom u pokretnoj fazi, Phenomenex Kinetex F5, $150 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$ odabrana je kao konačna nepokretna faza za UHPLC metodu.

4.1.4. Odabir pokretne faze

Preliminarna istraživanja odabira pokretne faze B provedena su u sklopu ispitivanja prikazanih u poglavlju 4.1.3. Metanol je izabran za pokretnu fazu B zbog potrebe da u početnom dijelu eluiranja pokretna faza bude što manje elucijske snage te osigura što dulje zadržavanje analita.

Pokretna faza A odabrana je na osnovu analize log D krivulja aktivnih tvari i njihovih onečišćenja. Ispitano je područje pH 2,0, pH 3,6 i pH 5,5. Iako se kod niskog pH uočava preklapanje krivulja za 3-izoniazid i acetil izoniazid, krivulja izoniazida odvojena je od onečišćenja. S obzirom na učestalo koeluiranje acetil izoniazida i 3-izoniazida s izoniazidom, koji je u znatno većoj koncentraciji, ovo je pH područje ispitano s ciljem evaluacije razlučivanja dvaju onečišćenja od izoniazida.

Pokretna faza A, pH 2,0, pripremljena je razrjeđenjem mravlje kiseline u vodi. Pri ovom pH, uz metanol kao pokretnu fazu B, zadržavanje izoniazida i onečišćenja izoniazida bilo je jako loše. Zbog kratkog vremena eluiranja (< 2 minute za izoniazid, acetil izoniazid i 3-izoniazid) srodni spojevi izoniazida koeluiraju s aktivnom tvari. Nažalost ni uz nizak udio (2 %) pokretne faze B, u prvom dijelu kromatograma, vremena zadržavanja analita nisu bila zadovoljavajuća, te je izostalo uspješno razdvajanje (Dodatak 1, slika B1).

Područje pH 3,6 također je ispitano u cilju odvajanja dvaju kritičnih parova pikova. Pokretna faza A, pH 3,6 pripremljena je otapanjem amonijevog formijata ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$) u vodi. pH je podešen s mravljom kiselinom. Promjenom pH postignuto je nešto bolje zadržavanje, ali ne i razdvajanje (Dodatak 1, slika B2). Pokretna faza B je, kao i u

prethodnom mjerenju, bio metanol. Eluiranje je provedeno na nepokretnoj fazi Kinetex F5, $150 \times 2,1$, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$ na 15°C i uz protok $0,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Budući da dva ispitana pH područja nisu pokazala prihvatljive rezultate pripremljena je pokretna otopina višeg pH, iznad pH 5.

Pokretna faza A, pH 5,5 pripremljena je otapanjem amonijevog acetata u vodi. Pokretne faze sličnog pH i sastava korištene su i u ranijim radovima u kojima je određivan izoniazid ili rifabutin.^{11,141} pH je podešen s trifluorooctenom kiselinom (TFA). Pokretna faza B je bio metanol. Postignuto je bolje zadržavanje analita u odnosu na ranija ispitivanja pri pH 2,0 i 3,6. Acetil izoniazid i 3-izoniazid su eluirali blizu izoniazida, ali uz najbolje razlučivanje dosad (Dodatak 1, slika A12).

Viša pH područja nisu dalje ispitivana zbog toga što log D krivulje (slika 12) nisu ukazivale da postoji istaknuti utjecaj na zadržavanje izoniazida i njegovih onečišćenja, kao ni na razdvajanje. Također, u području iznad pH 7, dolazi do značajnog odvajanja krivulje izonikotinske kiseline koja poprima vrlo niske negativne log D vrijednosti. S druge strane, iznad pH 7 krivulje rifabutina i 25-O-desacetil rifabutina su značajno razdvojene, u području pozitivnih vrijednosti, od krivulja izoniazida i izoniazidnih srodnih spojeva, što ukazuje na još jače zadržavanje ova dva analita. Zbog jačeg zadržavanja bilo bi potrebno dodati jači eluens u pokretnu fazu ili produljiti vrijeme analize.

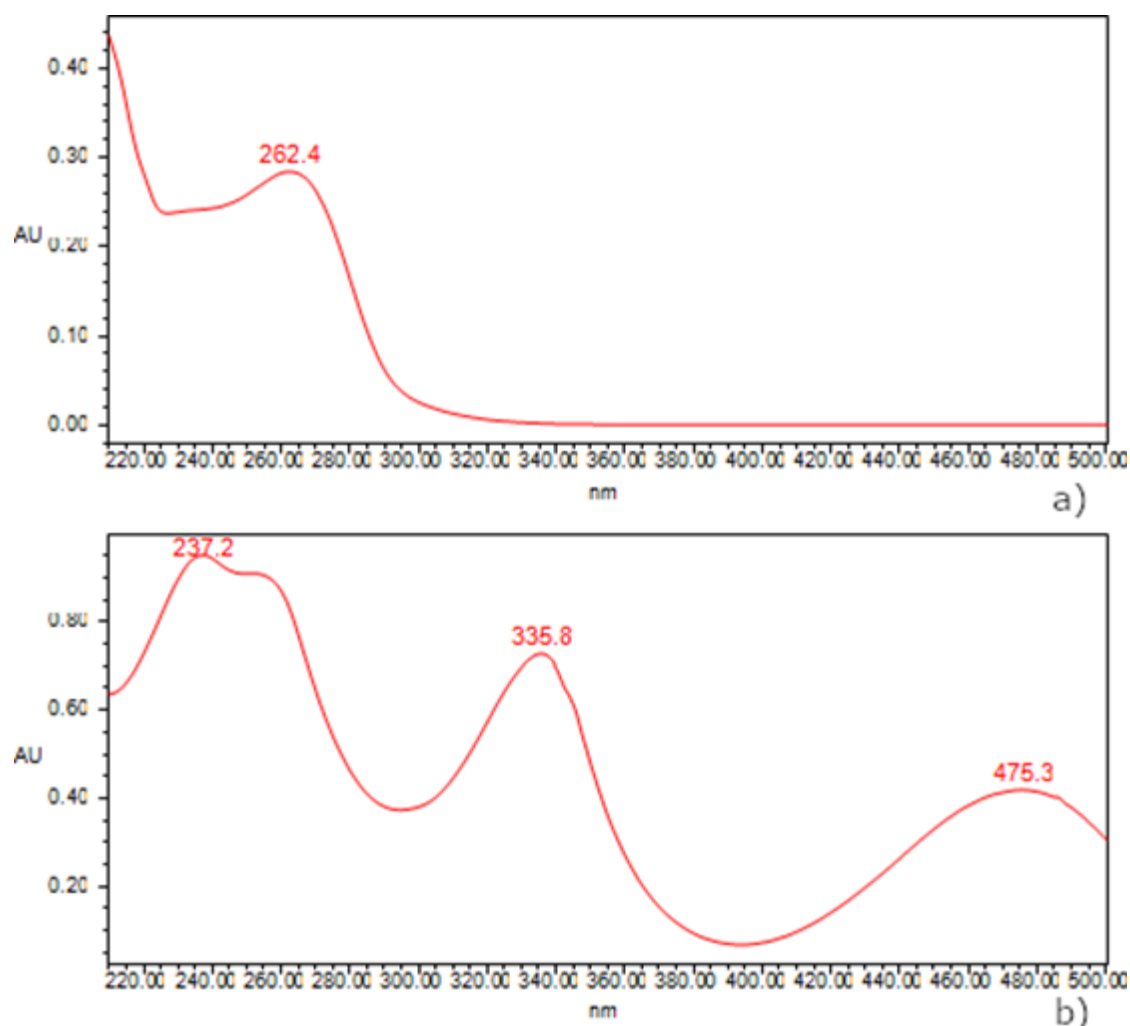
Tijekom ovih ispitivanja uočen je i vrlo loš oblik pika rifabutina pa je u pokretnu otopinu dodan trietilamin (TEA). Dodatak TEA u volumnoj koncentraciji 0,1 % poboljšao je oblik pika rifabutina. Visina pika bila je za oko 40 % bolja nakon dodatka TEA.

4.1.5. Odabir protoka pokretne faze

S obzirom na loše zadržavanje analita i na karakteristike UHPLC tehnike, protok pokretne faze je postavljen na $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Viši protok nije bio prihvatljiv jer je eluiranje rifabutina zahtijevalo visoke udjele pokretne faze B. Metanol zbog svoje viskoznosti generira vrlo visoke tlakove na kromatografskom sustavu što ograničava brzinu pokretne faze.

4.1.6. Detekcija

Kromatogrami su tijekom ovih ispitivanja snimani na valnoj duljini od 260 nm. Ova je valna duljina odabrana kao optimalna valna duljina za obje aktivne komponente prema njihovim apsorpcijskim maksimumima (slika 13).



Slika 13. UV/Vis spektri izoniazida (a) i rifabutina (b)

4.1.7. Volumen injektiranja i radna koncentracija

Volumen injektiranja određen je prema odazivu analita kod radne koncentracije aktivnih tvari. Radna koncentracija odabrana je s obzirom na rezultate topljivosti. Ograničenje kod odabira volumena injektiranja bio je sastav pokretne faze na početku mjerenja. Zbog elucijske snage

otapala za uzorke visoki volumeni injektiranja nisu bili prihvatljivi. Kada otapalo za uzorke konkurira elucijskom snagom pokretnoj fazi u početku mjerenja, uočava se cijepanje pikova koji eluiraju s najslabijim zadržavanjem. Ovaj fenomen izraženiji je kod velikih volumena injektiranja.

5 μL je volumen pri kojem je postignut s/n veći od 10 za sva onečišćenja, a bio je prihvatljiv s obzirom na jačinu otapala.

4.1.8. Temperatura kolone

U prvim eksperimentima analize su provedene pri različitim temperaturama kolone (30 – 50 °C). Uočeno je da niže temperature kolone povoljno utječu na razdvajanje acetil izoniazida od izoniazida (Dodatak 1, slika C1). Optimalna temperatura kolone ispitana je kroz DoE.

4.1.9. Dizajn eksperimenata

Kroz ispitivanja u poglavljima 4.1.1 – 4.1.8 uočene su poteškoće kod kromatografskog razdjeljivanja pojedinih parova pikova. Najčešće su zabilježena koeluiranja acetil izoniazida s izoniazidom i 3-izoniazida s izoniazidom. Stoga je razdjeljivanje analita, odnosno razlučivanje između pikova, prepoznato kao kritičan pokazatelj kvalitete metode (CQA).

Uz pomoć DryLab[®] računalnog programa specijaliziranog za primjenu QbD kod kromatografskih metoda napravljena su tri dizajna eksperimenata. Izračuni su bazirani na solvofobnoj teoriji objavljenoj još davne 1976. godine.¹⁴² Ova teorija zasniva se na principima termodinamike i bila je prvi takav model koji opisuje kromatografski proces. Prema njoj kromatografski proces je prikazan kao reverzibilno vezivanje molekula analita s nepokretnom fazom, odnosno hidrofobnim ligandima nepokretne faze.^{142–144} Do vezivanja analita dolazi zbog smanjenja nepolarne površine izložene pokretnoj fazi. Autori smatraju da otapalo, odnosno pokretna faza, prisiljava molekule na udruživanje i formiranje hidrofobne veze, a ne privlačenje među njima. Dolazi do promjene slobodne energije procesa zadržavanja analita na nepokretnoj fazi pa je uz pomoć osnovnog principa termodinamike izvedena jednadžba za faktor kapaciteta:

$$k = A + BD + C\Delta A + \frac{D(\kappa e - 1)V^2}{3\gamma} + E + RT \ln \left(\frac{RT}{PoV} \right) \quad (5)$$

gdje je:

k – faktor zadržavanja (faktor kapaciteta),

A i C – konstante koje se određuju eksperimentalno,

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

ΔA – površina solvofobnog kontakta između analita (S) i liganada s površinom nepokretne faze (L) m^{-2} ,

γ – površinski napetost / N m^{-1} ,

R – plinska konstanta, $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$,

T – temperatura / K ,

p_0 – atmosferski tlak / Pa ,

V – molarni obujam otapala / L mol^{-1} ,

κ_e – molekularni parametar analita.¹⁴⁴

Iz jednadžbe je vidljivo kako na faktor kapaciteta utječe pokretna faza preko površinske napetosti, struktura analita i njegov dipolni moment te nepokretna faza i njena elektrostatska svojstva. Površinska napetost pokretne faze ovisi o temperaturi i sastavu pokretne faze.

Solvofobna teorija, kao osnova DryLab[®] programa, fokusirana je na utjecaj pokretne faze na vrijeme zadržavanja analita. Ipak, osobine različitih nepokretnih faza danas su uvedene u program, što je omogućilo značajno podudaranje izračunatih modela s eksperimentalnim rezultatima.¹⁴⁵

Prvi DoE postavljen je tako da ispita utjecaj jakosti pufera na CQA. Jakost pufera može utjecati na visinu pikova, a time i na širinu pika. Širina pika izravno je povezana s razlučivanjem (vidi Jednadžbu 3).

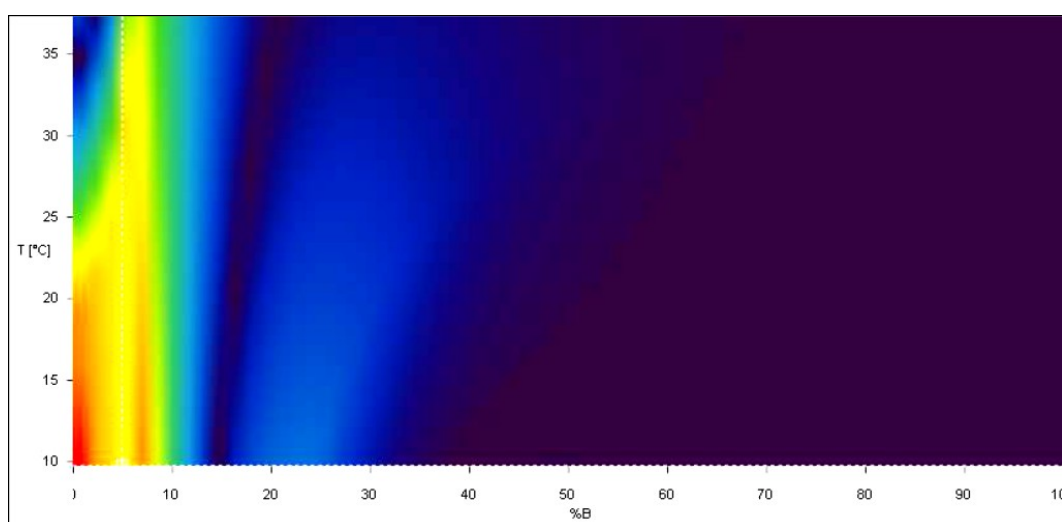
Budući da jakost pufera nije ranije ispitivana, postavljen je DoE kao jednodimenzionalni model na tri razine. Pripremljene su otopine amonijevog acetata pH 5,3 i jakosti 0,0025, 0,01 i 0,02 mol L^{-1} . Kao pokretna faza B korišten je metanol, a ispitivanja su provedena na odabranoj nepokretnoj fazi Kinetex F5, $150 \times 2,1 \text{ mm}$, veličine čestice $1,7 \text{ }\mu\text{m}$, termostatiranoj na $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Rezultati su pokazali da jakost pufera nema utjecaja na razdvajanje

analita te na njihovo određivanje. Stoga je za finalnu metodu, odabran amonijev acetat 0,01 mol L⁻¹.

Drugi DoE postavljen je tako da se ispita utjecaj dva parametra istovremeno. Ranije je uočeno da temperatura kolone i udio organske faze u pokretnoj fazi imaju utjecaj na razdvajanje kritičnih parova pikova. Cilj je bio odabrati najbolje uvjete za oba parametra.

Temperatura kolone ispitana je u rasponu 12 – 35 °C na tri nivoa na temperaturama (12, 25 i 35 °C). Udio organske faze evaluiran je kroz ispitivanje početnog udjela metanola u pokretnoj fazi. Ovaj parametar osobito je značajan za analite koji eluiraju s malim relativnim vremenom zadržavanja. Ispitivanja su provedena na nepokretnoj fazi Kinetex F5, 150 × 2,1 mm, veličine čestica 1,7 µm uz protok pokretne faze od 0,2 mL min⁻¹. Amonijev acetat pH 5,3 korišten je kao pokretna faza A, a metanol kao pokretna faza B.

Rezultati ovog 2D modela prikazani su kao rezolucijska mapa na slici 14.



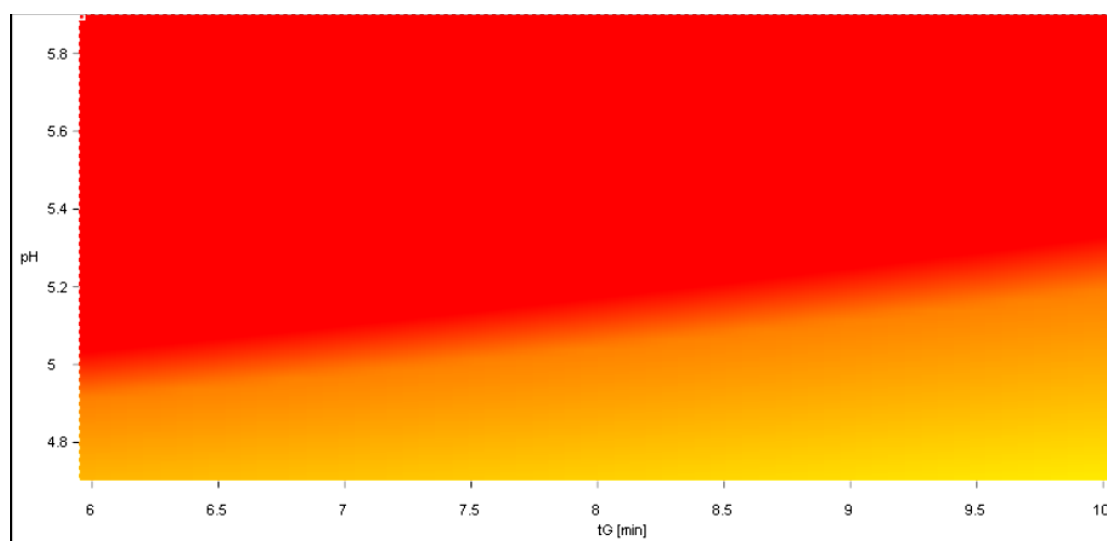
Slika 14. DryLab[®] rezolucijska mapa opisuje utjecaj temperature kolone i početni udio metanola u gradijentnom eluiranju

Crvena boja na rezolucijskoj mapi upućuje na najbolje rezultate razdvajanja. Jasno je vidljivo kako boljem razdvajanju pogoduju niža temperatura kolone i niski udio metanola. Nizak udio organske komponente očekivano pogoduje razdvajanju jer omogućava jače zadržavanje jako polarnih komponenti. S druge strane utjecaj temperature kolone nije bio tako očigledan. Niska temperatura kolone pokazala se osobito značajna kod odvajanja acetil izoniazida od

izoniazida. Temperatura kolone može utjecati na topljivost analita u pokretnoj fazi te na taj način pospješiti razlučivanje analita.

Treći DoE imao je za cilj ispitati pH pokretne faze i najkraće vrijeme nužno za optimalno razdvajanje (engl. *gradient time*, t_G). Područje pH ranije je ispitivano u početnim razvojnim eksperimentima. Uz pomoć DoE definiran je točan pH pufera amonijevog acetata i sagledano robusno područje metode. Za prvi segment gradijenta, u kojem eluiraju kritični parovi pikova postavljeno je vrijeme od 6 minuta. Skraćivanje ovog segmenta nije bilo moguće zbog niskih vrijednosti razlučivanja za kritične parove pikova. Stoga je vrijeme eluiranja, u rasponu 6 do 10 minuta, evaluirano za treći segment u kojem eluiraju rifabutin i 25-O-desacetil rifabutin. U ranijim mjerenjima vrijednosti razlučivanja za ovaj par pikova su bile veće od 1,5, stoga je ispitano da li je moguće kraćenjem ovog segmenta skratiti ukupno trajanje analize bez značajnijeg utjecaja na razdvajanje. pH pokretne faze A ispitano je na tri razine: pH 4,8, 5,3 i 5,8. Eksperimenti su napravljeni na nepokretnoj fazi Kinetex F5, $150 \times 2,1$ mm, veličine čestica $1,7 \mu\text{m}$ uz protok pokretne faze od $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ i pri temperaturi kolone 15°C . Početni udio metanola iznosio je 0 % prema rezultatima drugog DoE.

Rezultati su prikazani na 2D rezolucijskoj mapi (slika 15).



Slika 15. DryLab[®] rezolucijska mapa - utjecaj vremena eluiranja i pH pokretne faze

Cilj je bio odabrati što kraće vrijeme t_G i pH u kojem će metoda biti robusna. Za $t_G = 6$ minuta odabran je pH 5,3 pokretne faze A.

Vrijeme središnjeg segmenta postavljeno je na 10 minuta. U ovom segmentu eluiraju dva izoniazidna onečišćenja, izonikotinamid i 2-izoniazid pri čemu se gradijent pokretne faze značajno mijenja (15 – 90 % pokretne faze B). Rezultat kraćeg t_G u ovom dijelu i brže promjene sastava pokretne faze bila je nepravilna bazna linija. Stoga je odabran nešto duži segment od 10 minuta. Za analite koji eluiraju u ovom području $R_s > 1,5$ te nije uočeno koeluiranje.

Eksperimenti provedeni u sklopu DoE ukazali su na značajan utjecaj temperature kolone i početnog udjela metanola u pokretnoj fazi na uspješno razdvajanje. Vrijeme analize optimirano je kroz DoE. Vrijednost pH pokretne faze odabran je kako bi se negativan utjecaj malih nenamjernih promjena sveo na minimum.

Primjenom računalnog programa omogućena je procjena više parametara istovremeno, te olakšan odabir parametara koji osiguravaju robusnost metode.

4.1.10. Validacija UHPLC metode

Odabrani uvjeti UHPLC metode prikazani su u tablici 4.

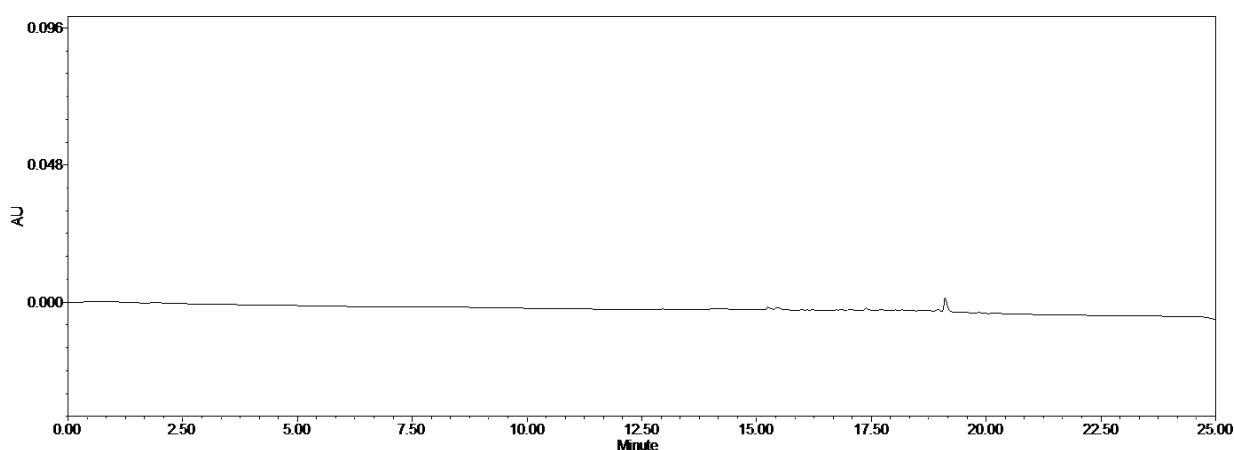
Tablica 4. Uvjeti UHPLC metode

Nepokretna faza	Kinetex F5, 150 × 2,1 mm, 1,7 μm		
Pokretna faza A	0,01 mol L ⁻¹ amonijev acetat s 0,1 % TEA, pH 5,3 podešen s TFA		
Pokretna faza B	MeOH		
Protok	0,2 mL min ⁻¹		
Volumen injektiranja	5,0 μl		
Valna duljina	260 nm		
Temperatura kolone	15 °C		
Gradijentno eluiranje	vrijeme / min	A / %	B / %
	0	100	0
	6	85	15
	16	10	90
	22	10	90

UHPLC metoda uspješno je validirana. Tijekom validacije potvrđena su sljedeća svojstva metode: selektivnost, linearnost, točnost, granica određivanja, radno područje i preciznost. Ispitana je stabilnost otopina, filter studija i robusnost metode.

Selektivnost

Kako bi se potvrdila selektivnost određivanja sadržaja izoniazida i rifabutina i onečišćenja iz formulacije pripremljena je otopina placebo. Placebo je pripremljen miješanjem najčešće korištenih farmaceutskih pomoćnih tvari.⁶⁵ Škrob, laktoza monohidrat, mikrokristalinična celuloza, manitol, silicijev dioksid, magnezij stearat, kroskarmeloza i krosповidon pomiješani su u omjerima koji odgovaraju najvećim dozvoljenim količinama za suhe oralne lijekovite oblike. Smjesa je otopljena u mješavini vode i metanola u jednakom omjeru te analizirana prema predloženoj metodi. Kromatogram nije pokazao interferenciju na mjestu eluiranja poznatih onečišćenja i dviju aktivnih tvari (slika 16).

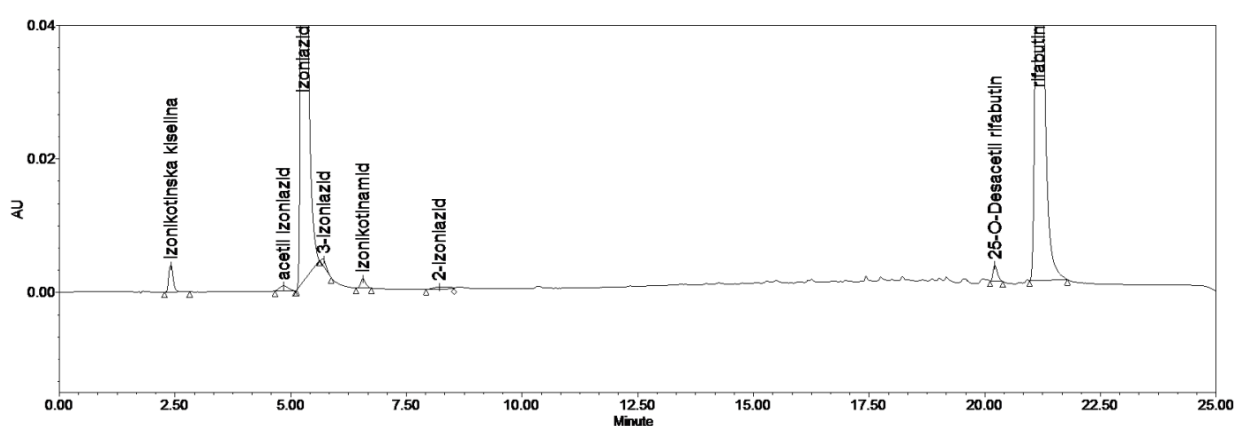


Slika 16. Kromatogram otopine placebo

Selektivnost metode za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina te njihovih onečišćenja potvrđena je mjerenjem signala dviju aktivnih tvari i dostupnih onečišćenja (slika 17).

Onečišćenja izonikotinska kiselina, izonikotinamid, 2-izoniazid i 25-O-desacetil rifabutin su dobro razlučeni od ostalih onečišćenja i aktivnih tvari. Acetil izoniazid je odvojen od izoniazida s razlučivanjem 1,5. Za razdvajanje ovog kritičkog para pikova pokazalo se kako temperatura kolone ima najviše utjecaja. Temperatura kolone je u metodi postavljena na 15 °C kako bi se smanjio rizik koeluiranja s izoniazidom. 3-izoniazid eluira neposredno iza izoniazida. Iako je razlučivanje nešto slabije, 3-izoniazid se smatra procesnim onečišćenjem

izoniazida. Njegov značajan porast u slučaju razgradnje izoniazida tijekom stabiliteta ili u studiji kompatibilnosti nije očekivan. Za ovo je onečišćenje i računalni program Marvin sugerirao koeluiranje s izoniazidom (poglavlje 4.1.2.), a eksperimentalni rezultati pokazali su da jedino Kinetex Biphenyl kolona dobro razdvaja ovaj kritični par pikova. Ipak, ova kolona se pokazala izrazito nestabilna. Relativna vremena zadržavanja (engl. *Relative Retention Time*, RRT) izračunata prema vremenu zadržavanja rifabutina su 0,11 za izonikotinsku kiselinu, 0,23 za acetil izoniazid, 0,25 za izoniazid, 0,27 za 3-izoniazid, 0,31 za izonikotinamid, 0,39 za 2-izoniazid i 0,96 za 25-O-desacetil rifabutin.



Slika 17. Kromatogram otopine selektivnosti

Za sve analite provedena je i analiza čistoće pikova (tablica 5). Analiza koristi spektralni kontrast (engl. *Spectral Contrast*) kako bi utvrdila koeluiranje više analita.

Tablica 5. Analiza čistoće pikova

Analiti	Kut čistoće pika	Prag odbacivanja
izonikotinska kiselina	1,827	2,298
acetil izoniazid	3,316	8,986
Izoniazid	0,049	0,411
3-izoniazid	3,696	8,452
izonikotinamid	1,955	5,445
2-izoniazid	12,602	34,599
25-O-desacetil rifabutin	0,865	1,947
Rifabutin	0,040	0,253

Spektri snimljeni u vremenskom periodu eluiranja pika prebačeni u vektore daju kut razlikovanja koji se naziva kut čistoće (engl. *Purity Angle*). Prag odbacivanja (engl. *Purity Thershold*), određuje se na sličan način izračunom kuta razlikovanja vektora spektara vremenskog perioda postavljenog na vremenu gdje nema eluiranja pikova. Analiza je pokazala da su analiti spektralno čisti. Kut čistoće pikova u svim je slučajevima bio niži od praga odbacivanja.

Linearnost

Linearnost je ispitana mjerenjem otopina analita na pet koncentracijskih razina. Otopine za analizu sadržaja izoniazida i rifabutina pripremljene su u rasponu 0,1 do 0,3 mg mL⁻¹. Linearnost onečišćenja ispitana je na pet koncentracijskih nivoa u rasponu od 0,0002 do 0,004 mg mL⁻¹. Rezultati su izračunati regresijskom analizom, a jednadžbe pravaca za pojedinačne analite prikazane su u tablicama 6 i 7. Koeficijent determinacije za sve je analite bio veći od 0,998.

Tablica 6. Rezultati linearnosti kod određivanja sadržaja izoniazida i rifabutina

Analit	Koncentracijski raspon / mg mL ⁻¹	Jednadžba pravca	r^2
izoniazid	0,1 – 0,3	$y = 40508771 x + 35374$	1,000
rifabutin	0,1 – 0,3	$y = 42417222 x + 286441$	1,000

Tablica 7. Rezultati linearnosti za određivanje onečišćenja

Analit	Koncentracijski raspon / mg mL ⁻¹	Jednadžba pravca	r^2	RRF
Izoniazid	0,0002 – 0,0042	$y = 39212895 x + 408$	1,000	/
Rifabutin	0,0002 – 0,0042	$y = 36114240 x + 277$	0,998	/
2-izoniazid	0,0002 – 0,0040	$y = 38204301 x - 824$	1,000	1,0
3-izoniazid	0,0002 – 0,0041	$y = 45203070 x - 455$	1,000	1,2
acetil izoniazid	0,0002 – 0,0040	$y = 23462215 x + 900$	1,000	0,6
Izonikotinamid	0,0002 – 0,0041	$y = 27611536 x - 139$	1,000	0,7
izonikotinska kiselina	0,0002 – 0,0041	$y = 32005450 x + 2166$	0,998	0,8
25-O-desacetil rifabutin	0,0002 – 0,0043	$y = 36850372 x - 209$	0,999	1,0

Iz omjera nagiba pravca onečišćenja i odgovarajuće aktivne tvari izračunat je relativni faktor odgovora (engl. *Relative Response Factor*, RRF) za svako onečišćenje (tablica 7). Kada se onečišćenja računaju preko standarda odgovarajuće aktivne tvari, a faktor odgovora je značajno različit od 1,0 ($< 0,8$ i $> 1,2$), u izračunu je potrebno koristiti RRF.

Granica određivanja

Za sve analite granica određivanja potvrđena je na najnižem koncentracijskom nivou studije linearnosti ($0,0002 \text{ mg mL}^{-1}$). Granice određivanja određene su metodom omjera signala i šuma, $s/n \geq 10$. Navedeni omjer s/n je iznosio 140, 24, 48, 39, 39, 31, 79 i 54 za izonikotinsku kiselinu, acetil izoniazid, izoniazid, 2-izoniazid, 3-izoniazid, izonikotinamid, rifabutin i 25-O-desacetil rifabutin.

Preciznost

Ponovljivost je evaluirana pripremom šest otopina uzorka u koncentraciji aktivnih komponenti $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*, RSD) za sadržaj izoniazida i rifabutina je bila $< 2,0 \%$ ($1,2 \%$ za izoniazid i $0,9 \%$ za rifabutin).

Dodatnih šest priprema uzorka analizirano je drugi dan od strane drugog analitičara na drugom sustavu. RSD vrijednost za sadržaj obiju aktivnih tvari i u ovom je setu podataka bila unutar $2,0 \%$ ($0,3 \%$ za izoniazid i $1,3 \%$ za rifabutin). Razlika između dva skupa podataka bila je $0,8 \%$ za izoniazid i $1,6 \%$ za rifabutin.

Preciznost je evaluirana i za određivanje onečišćenja na istim uzorcima. RSD vrijednosti su za oba skupa podataka bile manje od $10,0 \%$. Za prvi dan zabilježen je raspon od $1,5$ do $8,5 \%$, a za drugi dan od $1,5$ do $7,1 \%$. Najveća razlika za pojedinačna onečišćenja između skupova podataka bila je $0,06 \%$.

Točnost

Uzorci su pripremljeni dodavanjem analita u tri koncentracijska nivoa u otopinu placeba, pripremljenu jednako kao i za ispitivanje selektivnosti. Rezultati točnosti prikazani su kao srednji analitički povrat (%) u tablicama 8 i 9. Uz svaki podatak dane su i RSD vrijednosti budući da je svaki koncentracijski nivo pripremljen u triplicatu.

Tablica 8. Rezultati validacije točnosti za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina

Analit	Koncentracijski nivo / mg mL ⁻¹	Srednji analitički povrat / %	RSD / %
izoniazid	0,10	99,9	1,6
	0,20	100,2	1,3
	0,30	100,4	1,4
rifabutin	0,10	98,4	2,4
	0,20	100,9	1,2
	0,30	100,9	1,7

Metoda se pokazala točna za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina s analitičkim povratom unutar 97,0 – 103,0 % i RSD vrijednostima između priprema unutar 3,0 %.

Metoda se pokazala točna za određivanje onečišćenja s analitičkim povratom unutar 80,0 – 120,0 % i RSD vrijednostima između priprema unutar 10,0 %. Zbog niskih koncentracija analita bile su prihvatljive šire granice u odnosu na određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina.

Tablica 9. Točnost metode za određivanje onečišćenja

Analit	Koncentracijski nivo / mg mL ⁻¹	Srednji analitički povrat / %	RSD ^a / %
izoniazid	0,0002	89,8	2,5
	0,0010	89,5	0,2
	0,0040	88,6	1,2
rifabutin	0,0002	85,4	4,9
	0,0010	92,3	5,7
	0,0040	90,8	2,1
2-izoniazid	0,0004	91,4	2,4
	0,0010	96,4	3,3
	0,0040	106,5	4,4
3-izoniazid	0,0002	80,2	5,0
	0,0010	84,9	0,9
	0,0040	84,6	2,2
acetil izoniazid	0,0002	97,3	4,4
	0,0010	92,2	0,4
	0,0040	90,5	5,2
izonikotinamid	0,0002	86,1	1,7
	0,0010	90,1	0,8
	0,0040	87,9	2,5
izonikotinska kiselina	0,0002	97,3	4,3
	0,0010	94,7	0,3
	0,0040	87,9	1,7
25-O-desacetil rifabutin	0,0002	86,3	2,5
	0,0010	92,9	5,6
	0,0040	91,6	2,1

^a RSD vrijednosti izračunate su za pripreme u triplicatu za svaki koncentracijski nivo

Radno područje

Za sva onečišćenja osim za 2-izoniazid potvrđeno je radno područje metode od 0,0002 mg mL⁻¹ do 0,004 mg mL⁻¹. Zbog nešto slabijeg odaziva za 2-izoniazid najniži nivo na kojem je potvrđena točnost bio je 0,0004 mg mL⁻¹ pa je radno područje metode za određivanje 2-izoniazida od 0,0004 mg mL⁻¹ do 0,004 mg mL⁻¹. Za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina, radno područje metode potvrđeno je u rasponu 0,1 mg mL⁻¹ do 0,3 mg mL⁻¹.

Stabilnost otopina

U sklopu validacije metode ispitane su i stabilnosti otopina. Rezultati su pokazali da su otopine standarda za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina te njihovih onečišćenja stabilne najmanje dva dana čuvane na sobnoj temperaturi, kao i otopina uzorka za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina. Otopinu uzorka za određivanje onečišćenja potrebno je svježe pripremiti.

Filter studija

Budući da se prije analize uzorak filtrira, bilo je važno ispitati utjecaj filtera na rezultate analize. Studija je provedena usporedbom rezultata filtriranih i centrifugiranog alikvota istog uzorka. Propuštanjem uzorka kroz filter Whatman Spartan 0,2 µm od regenerirane celuloze sakupljeni su 2 mililitarski alikvoti filtrata (0 – 2, 2 – 4 i 4 – 6 mL). Rezultati su evaluirani izračunom analitičkog povrata u odnosu na rezultat centrifugiranog alikvota. Vrijednosti analitičkih povrata pokazale su da se prilikom filtriranja treba propustiti prva dva mililitra uzorka zbog zadržavanja analita na filteru. Omjer površina za alikvot nakon propuštenih 2 mL bio je u rasponu 100,3 – 100,7 % za sadržaj izoniazida i rifabutina te 93,5 – 102,7 % za onečišćenja.

Robusnost

Robusnost je evaluirana za tri UHPLC parametra, pH pokretne faze (pH 5,1 – 5,6), protok pokretne faze (0,18 – 0,22 mL min⁻¹) i temperaturu kolone (14 °C – 16 °C).

Zadovoljavajuće kromatografsko eluiranje postignuto je u svim ispitivanim uvjetima. Za prvi kritični par pikova (acetil izoniazid i izoniazid) uočeno je odvajanje pri osnovici ($\pm 0,08$) za sve ispitane uvjete. 3-izoniazid je na kromatogramima vidljiv u repu pika izoniazida kao i

na slici 17. UHPLC metoda pokazala se robusna u ispitnom rasponu uvjeta, što je potvrdilo rezultate DoE.

4.1.11. Analize gotovih proizvoda

Validiranom UHPLC metodom ispitani su gotovi farmaceutski oblici koji sadrže izoniazid (uzorak 1) i rifabutin (uzorak 2 i 3) prisutni na tržištu. Budući da FDC formulacije s obje aktivne tvari nema na tržištu, prikladnost metode je ispitana i na uzorku pripremljenom u laboratoriju s obje aktivne komponente (uzorak 4). Uzorak s obje aktivne tvari imao je cilj oponašati FDC pripravak, a pripremljen je dodavanjem izoniazida smjesi za kapsuliranje rifabutin gotove formulacije. Aktivne komponente u posljednjem uzorku bile su u masenom omjeru 1:1 (tablica 10).

Tablica 10. Rezultati sadržaja izoniazida i rifabutina te njihovih onečišćenja

Uzorak	Sadržaj aktivnih tvari			Onečišćenja		Udio ukupnih onečišćenja
	/%			/%		
	Izoniazid	Rifabutin	Poznata onečišćenja	Nepoznata onečišćenja ^a RRT 0,48	RRT 0,95	
1	101,1	/	/	0,4	/	1,5
2	/	95,2	< 0,1	/	0,4	1,0
3	/	98,9	< 0,1	/	0,4	1,3
4	98,8	101,0	< 0,1	0,2	0,4	2,0

^a Prikazana najveća detektirana onečišćenja

Na kromatogramu uzorka izoniazid tableta s tržišta uočen je nepoznati pik na mjestu eluiranja poznatog onečišćenja acetil izoniazida (Dodatak 1, slika D1). Nepoznati pik je bio u količini od 6,2 % površine pika izoniazida. Usporedbom UV/Vis spektara (Dodatak 1, slika D2) utvrđeno je da nepoznati pik nije povezan s aktivnom komponentom. S obzirom da za isti uzorak nije bilo pada sadržaja izoniazida, zaključeno je kako pik potječe od pomoćnih tvari koje se nalaze u uzorku s tržišta. Ponovljenom analizom otopine ispitana je stabilnost uočenog pika. Nije bilo promjene koja bi sugerirala na to da je nepoznati pik razgradno onečišćenje aktivne komponente.

S obzirom da je nepoznati pik u potpunosti prekrrio onečišćenje acetil izoniazid, validiranoj metodi dodan je jednostruki kvadrupolni spektrometar masa (QDa) kao detektor za

određivanje acetil izoniazida. Metoda je validirana s ciljem određivanja acetil izoniazida spektrometrijom masa.

Rezultati analize uzoraka pokazuju da gotovi proizvodi odgovaraju zahtjevima monografija za tablete izoniazida i kapsule rifabutina iz američke farmakopeje.³⁴ Sadržaj aktivnih tvari je unutar 90,0 – 110,0 %. Pojedinačna onečišćenja rifabutina su prema monografiji za Rifabutin kapsule propisana do 0,5 %, a ukupna onečišćenja do 4,5 %, pa prema tome analizirani uzorci odgovaraju zahtjevima.¹²⁴

4.1.12. Validacija MS metode za određivanje acetil izoniazida

Acetil izoniazid je srodni spoj izoniazida s molekulskom masom $179,18 \text{ g mol}^{-1}$ (slika 10d). Uz kromatografske parametre navedene u tablici 4, za određivanje acetil izoniazida u konfiguraciji instrumenta dodan je QDa detektor. QDa detektor koristi ESI ionizaciju i jednostruki kvadrupolni analizator masa. Kod ove metode korištena je pozitivna ESI ionizacija uz dušik kao nebulizacijski plin, potencijal na kapilari 0,8 kV i konusni napon od 10 V. Kod analize je sniman molekulski ion (engl. *parent ion*), $[M+H]^+$, pri m/z 180.

Za potrebe validacije metode za određivanje acetil izoniazida spektrometrijom masa ispitani su sljedeći parametri: selektivnost, točnost, linearnost, radno područje metode, filter studija, preciznost, i granica određivanja.

Selektivnost je potvrđena mjerenjem uzorka tableta izoniazida kod kojeg je uočen nepoznati pik na vremenu zadržavanja acetil izoniazida. Interferencija iz uzorka je bila $< 0,01$ %.

Uzorci za parametar linearnosti pripremljeni su na isti način kao i ranije kod UV/Vis detekcije. Otopina analita razrijeđena je na pet koncentracijskih nivoa u rasponu $0,0002 - 0,0024 \text{ mg mL}^{-1}$. Regresijska analiza dala je jednadžbu pravca $y = 4548905048,950 x + 164846,805$ uz koeficijent determinacije $r^2 = 1,000$.

Parametar točnost određivanja ispitan je na isti način kao i ranije, tako da je analit dodan u 3 koncentracijska nivoa ($0,0002$, $0,0010$ i $0,0024 \text{ mg mL}^{-1}$) u otopinu placeba. Rezultat je iskazan kao analitički povrat, odnosno izmjerena količina u odnosu na dodanu, stvarnu količinu. Svaki koncentracijski nivo pripremljen je u triplicatu pa je razlika između priprema izražena kao RSD (%). Analitički povrat je bilo unutar $80,0 - 120,0$ % a RSD unutar $10,0$ %.

Srednje vrijednosti analitičkog povrata za tri nivoa iznosile su 91,4 %, 95,6 % i 94,7 % uz RSD od 3,4 %, 1,6 % i 1,3 %.

Filter studija pokazala je da je nužno odbaciti prva 4 mL filtrata za filter Whatman Spartan 0,2 µm.

Preciznost je ispitana na uzorku kojem je dodano onečišćenje u količini 0,001 mg mL⁻¹. Šest priprema uzorka analizirano je prvi dan i dodatnih šest priprema drugi dan. Dobivene su vrijednosti RSD unutar 10,0 % za oba skupa podataka (2,6 % za prvi skup podataka i 1,9 % za drugi). Razlika srednjeg sadržaja acetil izoniazida između dana bila je 0,03 %.

Granica određivanja potvrđena je na najnižem nivou testiranom u studiji linearnosti (0,0002 mg mL⁻¹) uz $s/n = 30$. Validacijski testovi potvrdili su mogućnost korištenja QDa detektora za određivanje acetil izoniazida u prisustvu pomoćnih tvari koje koeluiraju s ovim onečišćenjem. Potvrđeno je radno područje metode od 0,0002 do 0,0024 mg mL⁻¹.

4.1.13. Prisilna razgradnja

Studija prisilne razgradnje provedena je kako bi se potvrdila selektivnost UHPLC metode za određivanje sadržaja aktivnih tvari i onečišćenja formulacije koja sadrži izoniazid i rifabutin. Prisilna razgradnja predstavlja izlaganje uvjetima koji su rigorozniji od uvjeta propisanih za ispitivanje ubrzanog starenja (40 °C i 75 % RV) s ciljem ispitivanja osjetljivosti molekula i prepoznavanja razgradnih mehanizama analita. Osjetljivost analita ima utjecaja na odabir sastavnica formulacije, procesa proizvodnje, ali i pakiranja finalnog proizvoda.

Analiza je provedena na otopinama obiju aktivnih tvari koje su izložene utjecaju kiseline, lužine i vodikovog peroksida.

Jedinstveni uvjeti za poticanje prisilne razgradnje dosad nisu službeno propisani. Uobičajeno se postavljaju prema karakteristikama analita. Uz prepoznavanje najizraženijih razgradnih produkata važno je očuvanje ukupne mase (engl. *Mass balance*, MB) tijekom ispitivanja (jednadžba 6).

$$MB = \frac{(\text{sadržaj} + \text{onečišćenja})_{\text{tretirani uzorak}}}{(\text{sadržaj} + \text{onečišćenja})_{\text{kontrolni netretirani uzorak}}} \times 100$$

(6)

Količina aktivne tvari koja je izgubljena zbog razgradnje treba približno odgovarati količini nastalih razgradnih produkata. Kako bi se očuvao MB i uočili primarni razgradni produkti poželjno je izbjeći preveliku razgradnju.

Aktivne komponente, izoniazid i rifabutin, otopljene su u koncentraciji $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. 1 mililitarski alikvoti pripremljenih otopina rifabutina i izoniazida izloženi su uobičajenim promotorima razgradnje: razrijeđenoj kiselini, razrijeđenoj lužini i razrijeđenom vodikovom peroksidu. Kod tretiranja otopina razrijeđenom kiselinom primijenjena je neutralizacija lužinom kako ne bi došlo do promjene vremena zadržavanja analita. Sve su otopine čuvane na sobnoj temperaturi (ST) za vrijeme provođenja ispitivanja.

Netretirani uzorci analizirani su kao kontrolna mjerenja. Uvjeti kojima su alikvoti izloženi prikazani su u tablicama 11 i 12.

Tablica 11. Uvjeti prisilne razgradnje za izoniazid

Vrsta reakcije razgradnje	Priprema uzorka
Kisela hidroliza	$0,2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ }^a + 100 \text{ } \mu\text{L } 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl} + 100 \text{ } \mu\text{L } 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, 1 dan, ST ^b
Lužnata hidroliza	$0,2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ }^a + 50 \text{ } \mu\text{L } 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 150 \text{ } \mu\text{L H}_2\text{O}$, 15 minuta, ST ^b
Oksidacija	$0,2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ }^a + 100 \text{ } \mu\text{L } 30 \% \text{ H}_2\text{O}_2 + 100 \text{ } \mu\text{L H}_2\text{O}$, 3,5 sata, ST ^b

^a koncentracija izoniazida i rifabutina u otopini

^b sobna temperatura

Tablica 12. Uvjeti prisilne razgradnje za rifabutin

Vrsta reakcije razgradnje	Priprema uzorka
Kisela hidroliza	$0,2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ }^a + 100 \text{ } \mu\text{L } 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl} + 100 \text{ } \mu\text{L } 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$, 1 dan, ST ^b
Lužnata hidroliza	$0,2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ }^a + 50 \text{ } \mu\text{L } 1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 150 \text{ } \mu\text{L H}_2\text{O}$, 15 minuta, ST ^b
Oksidacija	$0,2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ }^a + 100 \text{ } \mu\text{L } 30 \% \text{ H}_2\text{O}_2 + 100 \text{ } \mu\text{L H}_2\text{O}$, 3,5 sata, ST ^b

^a koncentracija izoniazida i rifabutina u otopini

^b sobna temperatura

Nastala onečišćenja izračunata su kao razlika prema istom onečišćenju iz kontrolnog uzorka, ukoliko je ono detektirano u kontrolnom uzorku. Rezultati su prikazani u tablici 13.

Tablica 13. Rezultati prisilne razgradnje

Analit	Prinos / %		
	Lužnata hidroliza	Kisela hidroliza	Oksidacija
Sadržaj izoniazida	93,3	96,8	97,9
Onečišćenje 1, t_R 2,95 minuta	0,26	0,75	0,17
Onečišćenje 2, t_R 5,78 minuta	/	0,54	/
Onečišćenje 3, t_R 7,61 minuta	0,37	1,26	/
Onečišćenje 4, t_R 9,34 minuta	0,12	0,28	/
Onečišćenje 5, t_R 10,29 minuta	0,35	0,22	/
Onečišćenje 6, t_R 11,55 minuta	/	0,24	/
Onečišćenje 7, t_R 12,03 minuta	0,52	0,31	0,18
Onečišćenje 8, t_R 12,66 minuta	/	/	0,24
Onečišćenje 9, t_R 13,44 minuta	0,41	0,29	0,24
Onečišćenje 10, t_R 13,76 minuta	0,19	0,23	/
Onečišćenje 11, t_R 17,97 minuta	/	0,16	/
Onečišćenje 12, t_R 18,42 minuta	/	0,52	/
MB	96	102	99
Sadržaj rifabutina	43,9	91,8	93,6
Onečišćenje 13, t_R 4,79 minuta	/	0,16	/
Onečišćenje 14, t_R 16,35 minuta	/	0,20	0,35
Onečišćenje 15, t_R 16,63 minuta	/	/	0,24
Onečišćenje 16, t_R 16,85 minuta	/	/	0,54
Onečišćenje 17, t_R 17,55 minuta	0,16	/	/
Onečišćenje 18, t_R 17,74 minuta	/	0,86	0,08
Onečišćenje 19, t_R 17,96 minuta	39,01	/	/
Onečišćenje 20, t_R 18,02 minuta	/	2,42	1,03
Onečišćenje 21, t_R 18,15 minuta	/	1,69	/
Onečišćenje 22, t_R 18,29 minuta	17,42	/	/
Onečišćenje 23, t_R 18,38 minuta	/	4,57	/
Onečišćenje 24, t_R 18,83 minuta	/	1,57	/
Onečišćenje 25, t_R 19,55 minuta	/	1,18	/
MB	102	105	97

Rezultati prikazani u tablici 13 pokazuju da je izoniazid najosjetljiviji na lužnate uvjete. U vrlo kratkom vremenu zabilježen je pad sadržaja izoniazida od preko 5 %. Najznačajnija

onečišćenja uočena su na 12,03 i 13,44 minuta, a MB je iznosio 96 %. Kod uzorka tretiranog razrijeđenom kiselinom porast onečišćenja je bio 4,8 %. Najznačajniji razgradni produkti nastali pod utjecajem kiselih uvjeta su rezultirali pikovima s vremenima zadržavanja 2,95 i 7,61 minuta. Općenito, za oba eksperimenta uočen je veći broj razgradnih produkata na kromatogramima, ali ukupna količina onečišćenja nije tako velika. Nešto manje onečišćenja (0,8 %) postignuto nakon što je uzorak tretiran s 30 % H_2O_2 , uz MB 99 %.

Eksperimenti prisilne razgradnje kod rifabutina pokazali su osobitu osjetljivost prema lužnatim uvjetima. Najznačajnije onečišćenje uočeno je s vremenom zadržavanja od 17,96 minuta u količini od čak 39 % nakon samo 15 minuta izloženosti. Drugo značajno onečišćenje eluira na 18,29 minuta s preko 17 %. Iako je razgradnja značajna, pad sadržaja rifabutina odgovarao je porastu onečišćenja i postignut je prihvatljiv MB od 102 %.

Prisilna razgradnja pod utjecajem kiseline također je rezultirala nastankom značajnih onečišćenja rifabutina. Razgradni produkti detektirani su na 18,02, 18,15, 18,33 i 18,83 minuta. Ukupno je 13 % onečišćenja nastalo uz MB 105 %.

Najslabija razgradnja uočena je za oksidativne reakcije. Nastalo je ukupno 2,9 % onečišćenja, a od pojedinačnih razgradnih produkata najznačajniji je na vremenu eluiranja 18,02 minuta. Postignut je MB od 97 %.

Ni u jednom od uvjeta nije bilo porasta poznatih onečišćenja.

Kako bi potvrdili da nije bilo dodatnih razgradnih produkata provedena je i analiza čistoće pikova. Analiza spektralne čistoće pikova provjerena je na kromatogramima maksimalnih absorbancija (engl. *Max plot*), u spektralnom rasponu 210 – 500 nm, snimanom tijekom analize. Izračun je napravljen na ukupnoj površini pika (100 %). Izmjereni kutovi spektralne čistoće bili su manji od praga odbacivanja (tablica 14).

Tablica 14. Analiza čistoće pikova

Uvjet	Analiti	Kut čistoće pika	Prag odbacivanja
Kontrolni uzorak	izoniazid	0,021	0,327
	rifabutin	0,089	0,492
Kisela hidroliza	izoniazid	0,017	0,333
	rifabutin	0,229	0,399
Lužnata hidroliza	izoniazid	0,038	0,459
	rifabutin	0,116	0,310
Oksidacija	izoniazid	0,011	0,335
	rifabutin	0,134	0,666

4.2. Razvoj SFC metode

S ciljem razvoja ortogonalne analitičke metode korištena je fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima. Principi ove tehnike opisani su detaljnije u poglavlju 2.4. Analize uzoraka s više tehnika koje počivaju na različitim principima povećavaju pouzdanost rezultata i povećavaju vjerojatnost uočavanja nekompatibilnosti sastavnica formulacije. Jedan od razloga zbog kojih je SFC tehnika uključena u istraživanje je i njena ekološka prihvatljivost u odnosu na UHPLC tehniku.

Kako je ranije zaključeno, dvije aktivne tvari međusobno se razlikuju prema fizikalno kemijskim karakteristikama, ali su zato onečišćenja vrlo bliska odgovarajućim aktivnim komponentama. Kod UHPLC metode uočene su poteškoće s razdvajanjem nekih onečišćenja te nam je cilj bio ispitati prikladnost SFC-a upravo za tu svrhu. Dodatno, s obzirom na karakteristike SFC, cilj je bio ispitati prikladnost tehnike za simultane analize tako različitih aktivnih komponenti uz očuvanje učinkovitosti analize.

4.2.1. Odabir otapala

Fizikalno kemijske razlike izoniazida i rifabutina očitovale su se u rezultatima topljivosti (poglavlje 4.1.1). Topljivost u metanolu ili drugim nepolarnijim otapalima jedan je od preduvjeta za primjenu SFC u analizi specifičnog analita. Drugi preduvjet je $\log P$ analita ≥ -2 .

Najčešća otapala koja se koriste u SFC su *n*-heptan, metanol, 2-propanol i acetonitril pri čemu se metanol klasificira kao otapalo najjače elucijske snage. S druge strane, *n*-heptan je jako nepolarno otapalo pa u ovom nizu ima najslabiju elucijsku snagu. *n*-heptan je najsličniji pokretnoj fazi superkritičnom CO₂ zbog čega je najpoželjnije za pripremu SFC uzoraka.

S obzirom da otapala jake elucijske snage mogu uzorkovati cijepanje pikova ovisno o injektiranom volumenu, cilj nam je bio koristiti što slabije otapalo u skladu s topljivošću aktivnih komponenti. Metanol s aspekta topljivosti nije bio dobar izbor. Nažalost ni *n*-heptan nije bio pogodan zbog vrlo slabe topljivosti izoniazida u tom organskom otapalu (tablica 2). Ipak, *n*-heptan nije u potpunosti isključen, već su razmatrane smjese s drugim organskim otapalima kako bi se postigla što bolja kompatibilnost otapala uzorka s pokretnom fazom. Za metanol i acetonitril uočene su poteškoće pri miješanju s *n*-heptanom. 2-propanol se dobro

miješao s *n*-heptanom, a i topljivost za obje aktivne tvari bila je zadovoljavajuća. Mješavine 2-propanola i *n*-heptana ispitane su u volumnim omjerima 1:9, 2:8 i 3:7 uz volumen injektiranja 3 μ L.

Nije bilo istaknute razlike kod oblika ni kod razlučivanja pikova. T_f se razlikovao za samo 0,02 između ova tri kromatograma. Kao konačno otapalo odabrana je smjesa 2-propanola i *n*-heptana u volumnom omjeru 1:9 kako topljivost uzorka ne bi bila narušena.

4.2.2. Odabir nepokretne faze

Nepokretna faza kod SFC-a ima veći utjecaj na razlučivanje analita nego što je to kod tekućinske kromatografije.¹⁴⁶ Razlog tome je što su moguće varijacije SFC pokretne faze znatno manje. Niz autora je istraživalo utjecaj i klasificiralo vrste SFC nepokretne faze.^{147–153} S tim u skladu, u razvoju metode ispitano je više različitih nepokretnih faza:

- Waters Acquity UPC²® CSHTM Fluoro-Phenyl, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica 1,7 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ Torus Diol, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica 1,7 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ BEH, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica 1,7 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ HSS C18 SB, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica 1,8 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ TrefoilTM CEL1, 3,0 $\times$ 150 mm, veličine čestica 2,5 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ TrefoilTM CEL2, 3,0 $\times$ 150 mm, veličine čestica 2,5 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ Torus 2-PIC, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica 1,7 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ BEH 2-EP, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica, 1,7 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ TrefoilTM AMY1, 3,0 $\times$ 150 mm, veličine čestica 2,5 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ Torus 1-AA, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica 1,7 μ m,
- Waters Acquity UPC²™ Torus DEA, 3,0 $\times$ 100 mm, veličine čestica 1,7 μ m.

Sve nepokretne faze kupljene su od Waters Corporation, Milford, MA, SAD.^{154,155}

Početna istraživanja provedena su gradijentnim eluiranjem (0 – 40 %), koristeći metanol kao modifikator kroz deset minuta. Protok je bio 2 mL min⁻¹, temperatura kolone 40 °C, a ABPR je postavljen na 2000 psi (13 789 kPa). Kromatogrami su snimani na 260 nm.

Tri kiralne nepokretne faze, Acquity UPC²™ TrefoilTM CEL1, Acquity UPC²™ TrefoilTM CEL2, Acquity UPC²™ TrefoilTM AMY1, i jedna akiralna, Acquity UPC²™ Torus 1-AA, su

se pokazale uspješne u razdvajanju strukturno sličnih analita izoniazida, 2-izoniazida i 3-izoniazida ($R_s > 1,5$). Nažalost rifabutin je eluirao s izrazito lošim oblikom pika i širokim intervalom elucije od jedne do čak četiri minute (Dodatak 1, slika E1).

Acquity UPC²™ CSH™ Fluoro-Phenyl (Dodatak 1, slika E2) i Acquity UPC²™ HSS C18 SB (Dodatak 1, slika E3) kolone su također pokazale loše oblike pikova za obje aktivne tvari s T_f u rasponu od 3,3 do 4,2. Kolona Acquity UPC²™ BEH 2-EP ima znatno bolje kromatografske pikove za aktivne komponente. Ipak, uočava se loš oblik pika za onečišćenja 2-izoniazid, a 3-izoniazid koeluirao s izoniazidom zbog čega je i ova nepokretna faza isključena iz daljnjih ispitivanja (Dodatak 1, slika E4).

Osim na Acquity UPC²™ BEH 2-EP koeluiranje analita uočeno je i na Acquity UPC²™ Torus Diol (Dodatak 1, slika E5).

Acquity UPC²™ BEH također nije odvajala 3-izoniazid i izoniazid, a oblik pika za rifabutin nije bio prihvatljiv (Dodatak 1, slika E6). Značajno bolji oblik pika uočen je i na koloni Acquity UPC²™ Torus 2-PIC. Ipak, mala visina izoniazida i značajna razlika visine u odnosu na rifabutin (Dodatak 1, slika E7) upućivalo je na moguće poteškoće s osjetljivošću određivanja onečišćenja izoniazida.

Najbolje razdvajanje i oblik pikova analita postignuti su analizom na koloni Acquity UPC²™ Torus DEA, zbog čega je ova kolona izabrana za nastavak ispitivanja.

Zbog učestalog koeluiranja analita te neprikladnih oblika pikova, u ispitivanju odabira nepokretne faze dodavani su različiti modifikatori (acetonitril, 2-propanol, etanol) i aditivi (voda, TEA, amonijev acetat, amonijev hidroksid), a konačni zaključci o prikladnosti nepokretne faze izvedeni su iz najboljih mjerenja.

4.2.3. Utjecaj modifikatora pokretne faze

Modifikator se dodaje u pokretnu fazu kako bi utjecao na selektivnost i omogućio eluiranje polarnih analita. Dodatak modifikatora mijenja viskoznost, gustoću i polarnost pokretne faze. Time utječe na superkritične attribute i elucijsku snagu pokretne faze. Osim utjecaja na karakteristike pokretne faze, dodatak modifikatora mijenja i polarnost nepokretne faze te time mijenja interakcije analita s obje faze.¹⁰⁶

Svojstva modifikatora mijenjaju se promjenom temperature kolone i tlaka pod kojim se provodi analiza. Kombinacijom promjena ovih parametara moguće je optimirati zadržavanje i selektivnost analize.

U prvim pokusima razvoja metode korišten je metanol kao modifikator. Kod ispitivanja različitih nepokretnih faza često je uočeno koeluiranje pikova analita. Iz tog razloga konačni udio modifikatora je smanjen na 13 % kroz deset minuta. Time je ublažena brzina promjene sastava pokretne faze. Ispitani su i niži krajnji udjeli metanola. Oni nisu pokazali poboljšanje razlučivanja, ali je zadržavanje izoniazida bilo jače uzorkujući duže vrijeme analize i nižu visinu pika izoniazida.

Osim metanola, ispitana su i druga organska otapala u svojstvu modifikatora pokretne faze.

Potpuna zamjena metanola acetonitrilom nije bila prihvatljiva zbog toga što su analiti imali vrlo loše oblike pikova s neprihvatljivim T_f . Ovakav utjecaj acetonitrila i ranije je opisan u radu od Zou i suradnika.¹⁰⁶ Acetonitril ima slabu sposobnost deaktivacije slobodnih silanolnih skupina kolone zbog čega analiti mogu eluirati s visokim T_f vrijednostima.¹⁰⁶ Stoga je ispitana smjesa metanola i acetonitrila volumnog omjera 1:1. Ova promjena nije utjecala na simetriju pikova (Dodatak 1, slika F1).

Kada je umjesto metanola korišten 2-propanol mjerenje je zaustavljeno zbog previsokog tlaka na sustavu.

Dodatkom 2,0 % vode i 0,1 % TEA u metanol postignuta je značajno bolja simetrija pikova (Dodatak 1, slika F2) zbog čega su navedeni aditivi dodavani i kod sljedećih ispitivanja.

S druge strane, dodatak 2,0 % vode i čak do 3 % TEA u etanol nije pokazao veliki utjecaj na oblik pika, a uočeno je i koeluiranje za pikove izoniazida i 3-izoniazida (Dodatak 1, slika F3).

Kako bi postigli manju jačinu pokretne faze i utjecali na bolje razdvajanje uz očuvanje prihvatljivog oblika pikova, ispitana je smjesa metanola i 2-propanola uz dodatak 2,0 % vode i 0,1 % TEA. Ovi pokusi pokazali su najbolje oblike pikova uz prihvatljivo razdvajanje analita. Omjer 2-propanola i metanola dodatno je optimiran kroz DoE.

4.2.4. Utjecaj aditiva

SFC pokretna faza često sadrži i aditive. Aditivi su najčešće kisela ili lužnata otapala, ili soli, koji se dodaju kako bi reagirali sa slobodnim silanolnim skupinama kolone umjesto analita, te time poboljšali oblik pikova. Najčešće se kiseli aditivi dodaju u analizi kiselih analita, a lužnati za lužnate analite. Niz je studija proučavalo utjecaj aditiva.^{109,156–158}

Kroz razvoj SFC metode ispitani su amonijev acetat i amonijak u vodenoj otopini u koncentracijama 0,01 mol L⁻¹ i 0,02 mol L⁻¹ te TEA u volumnim koncentracijama 0,05 %, 0,1 %, 0,2 % i 1,0 %.

Amonijak (min 25 % u vodenoj otopini) i amonijev acetat, oba u koncentraciji 0,01 mol L⁻¹, bili su prihvatljivi za određivanje rifabutina. Uspoređujući kromatograme nakon što su u pokretnu fazu dodani ovi aditivi, nešto bolji oblik pika dobiven je uz dodatak amonijevog acetata (razlika T_f je bila $\pm 0,1$).

Ipak, nijedan od ovih aditiva nije imao značajan utjecaj na pik izoniazida. Povećanje koncentracije amonijevog acetata (0,02 mol L⁻¹) nije povoljno utjecalo na visinu pika izoniazida dok je visina rifabutina poboljšana za 34 %.

Zamjenom amonijevog acetata s TEA postignuta je 10 puta veća visina izoniazida i nešto bolji oblik pika za rifabutin ($T_f = 0,7$). U svrhu optimizacije koncentracije aditiva provedena su ispitivanja s 0,05 %, 0,1 %, 0,2 % i 1,0 % TEA u modifikatoru. Povećanje koncentracije nije dovelo do daljnjeg poboljšanja. Upravo suprotno, visoke koncentracije (1,0 % TEA) su značajno pojačale šum bazne linije (Dodatak 1, slika G1).

4.2.5. Dodatak vode modifikatoru pokretne faze

Imajući na umu nepolarnost superkritičnog fluida, dodatak vode pokretnoj fazi nije očigledan. Ipak, dodavanje malih količina vode modifikatoru može imati povoljan utjecaj na oblike pikova analita i na selektivnost metode.¹⁰⁴ Voda ima sinergistički utjecaj s aditivima. Zbog svoje polarnosti, voda pomaže eluiranje jako polarnih analita. Stoga je ispitan utjecaj različitih volumnih koncentracija vode u modifikatoru, 1,0 %, 2,0 % i 3,0 % na izgled pikova. T_f vrijednosti za izoniazid i rifabutin razlikovale su se manje od $\pm 0,1$ između tri mjerenja, a

vrijednosti razlučivanja za najbliže pikove mijenjala su se za svega $\pm 0,03$. Na temelju dobivenih rezultata odabrana je koncentracija od 2,0 %.

4.2.6. Dizajn eksperimenta

Složenost utjecaja parametara metode na rezultate analize te njihova međusobna ovisnost istaknuta je u poglavlju 2.4. Opsežna razvojna ispitivanja ukazala su na CQA za ovu metodu. Dio SFC parametara izabran je prema rezultatima preliminarnih ispitivanja, a dio parametara dodatno je ispitan kroz DoE. Cilj dizajna bio je optimirati uvjete tlaka, protoka, temperature kolone te sastav modifikatora. Ovi parametri mogu svojim vrijednostima utjecati na karakteristike superkritičnog fluida, ali mogu imati i međusobne interakcije i kombinirani utjecaj na CQA. Kombinirani utjecaj nije moguće uočiti u klasičnom principu ispitivanja. Dodatno, provođenje DoE i matematičko modeliranje odgovora omogućilo je sagledavanje cjelokupnog prostora dizajna.

Ranije objavljene studije ispitivale su utjecaj više SFC parametara, najčešće temperaturu kolone, tlak i sastav modifikatora na kromatografske odgovore.^{159–164} Landagaray i suradnici¹⁶² u svojim istraživanjima uključili su i utjecaj protoka, dok zbog složenosti utjecaja temperature kolone nju drže stalnom.

Kako bi se ispitao utjecaj temperature kolone te moguće interakcije s drugim parametrima, u istraživanja provedena u ovom radu uključene su temperaturu kolone (T_k) i protok u DoE zajedno s tlakom i sastavom modifikatora. Temperatura kolone ispitana je u rasponu 38 – 55 °C, tlak u rasponu 1800 – 2500 psi (12410 – 17236 kPa), protok u rasponu 1,0 – 1,8 mL min⁻¹, a volumni omjer 2-propanola u modifikatoru u rasponu 20,0 – 35,0 % (tablica 15).

Tablica 15. DoE¹⁶⁵

Kromatografski uvjeti					Kritični atributi metode				
Oznaka mjerenja	protok / mL min ⁻¹	T _k / °C	ABPR / psi	2-PrOH / %	Rs 1 ^a	Rs 2 ^b	Rs 3 ^c	TF 1 ^d	TF2 ^e
1	1,0	55	1800	20,0	0,283	1,184	1,065	0,763	2,299
2	1,0	38	1800	28,0	4,766	4,621	0,100	0,737	1,520
3	1,8	45	1800	20,0	6,233	1,463	1,160	0,704	1,630
4	1,8	55	2500	35,0	7,197	0,100	1,471	0,724	2,099
5	1,8	55	2200	20,0	6,105	1,373	0,100	0,740	1,963
6	1,0	55	2500	35,0	2,297	0,100	1,519	0,682	2,082
7	1,8	55	1800	28,0	4,210	0,468	1,164	0,770	2,010
8	1,4	47	2100	27,5	6,275	1,353	1,291	0,684	1,601
9	1,0	45	2500	20,0	6,832	2,288	1,284	0,669	1,712
10	1,0	45	1800	35,0	4,626	1,957	0,685	0,731	1,619
11	1,4	46	2200	27,5	6,577	1,497	1,262	0,681	1,604
12	1,0	38	2200	20,0	6,330	3,758	0,100	0,689	1,521
13	1,8	38	2500	20,0	7,648	1,483	0,588	0,877	1,526
14	1,0	38	2500	35,0	8,289	4,871	0,100	0,671	1,598
15	1,8	38	1800	35,0	7,068	0,698	0,228	0,730	1,523
16	1,0	55	2200	28,0	1,505	0,100	1,464	0,693	1,732
17	1,4	46,5	2150	27,5	6,409	1,465	1,285	0,684	1,629
18	1,4	46,5	2150	27,5	6,519	1,440	1,277	0,682	1,662

^a Rs 1 = razlučivanje između rifabutina i izonikotinamida, ^b Rs 2 = razlučivanje između acetil izoniazida i 3-izoniazida, ^c Rs 3 = razlučivanje između 3-izoniazida i izoniazida, ^d TF 1 = T_f rifabutina ^e TF 2 = T_f izoniazida

Kroz prethodno opisana ispitivanja utvrđeno je da je razdvajanje kritičnih parova pikova predstavlja CQA. Stoga su kroz DoE ispitane vrijednosti razlučivanja tri kritična para pikova, razlučivanje između rifabutina i izonikotinamida – Rs 1, razlučivanje između acetil izoniazida i 3-izoniazida – Rs 2, te razlučivanje između 3-izoniazida i izoniazida – Rs 3. Ova tri para pikova pokazala su najslabije razdvajanje, odnosno najveće promjene zadržavanja tijekom ranijih ispitivanja. Ostali parovi pikova postizali su razdvajanje s $Rs > 1,5$ te njihovo razdvajanje nije smatrano kritičnim.

U početnim fazama razvoja metode uočeno je kako aktivne komponente imaju nešto lošije oblike pikova, T_f za rifabutin je bio oko 0,7, a za izoniazid oko 1,5. Kako bi ispitali utjecaj kromatografskih parametara i na oblik pikova, T_f za rifabutin (TF 1) i izoniazid (TF 2) dodani su u DoE kao CQA. Ukupno pet kritičnih atributa kvalitete evaluirano je kroz dizajn eksperimenata, što je više nego u ranije objavljenim studijama. DoE je omogućio odabir SFC uvjeta koji bi dali optimalan odgovor za sve ispitane CQA istovremeno. Cilj je bio odabrati uvjete kojima bi se postigle najviše vrijednosti za Rs 1–3, najviše vrijednosti za TF 1 (s granicom na 1,0) i najniže vrijednosti za TF 2 (s granicom na 1,0).

Iako su druge nepokretne faze pokazivale nešto bolje oblike pikova za pojedine aktivne komponente, sve su imale poteškoća s razdvajanjem svih analita osim Acquity UPC²™ Torus DEA. Stoga je DoE proveden na odabranoj nepokretnoj fazi kako bi se optimirali uvjeti pokretne faze za sve CQA istovremeno. Uz nepokretnu fazu, sadržaj vode (2,0 %), TEA (0,1 %) u modifikatoru, temperatura sustava za automatsko uzorkovanje (15 °C), otapalo (*n*-heptane:2-propanol=1:9), volumen injektiranja (3 µL) bili su konstantni kroz DoE. Eluiranje je bilo gradijentno u dva segmenta 6 % → 8 % modifikatora u prve 2,5 minute i 8 % → 13 % modifikatora u sljedeće 4,5 minute. Kromatogrami su snimani na 205 nm za izoniazid i 260 nm za rifabutin i onečišćenja. Za mjerenja kod kojih je uočeno koeluiranje, u izračunu modela korištena je niska vrijednost razlučivanja 0,100, budući da nije bilo moguće odrediti točne vrijednosti.

Matematički model za odabrane CQA izračunat je prema jednadžbi 7 uz pomoć JMP računalnog programa:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \epsilon \quad (7)$$

U jednadžbi y predstavlja odgovor, β_0 odsječak na osi y , β_1 do β_{34} koeficijente za linearne, kvadratne te utjecaje interakcija a ϵ je pogreška. X_1 , X_2 , X_3 , X_4 predstavljaju ispitivane faktore (temperaturu kolone, protok, omjer 2-propanola u modifikatoru i tlak). Izračunati koeficijenti modela prikazani su u tablici 16 kao normalizirane i centrirane vrijednosti.

P -vrijednosti za prikladnost modela (engl. *lack of fit*) bile su iznad 0,05 ($> 0,2100$), dok su za analizu varijance vrijednosti bile značajno ispod 0,05 ($< 0,004$). Koeficijent determinacije

(r^2) za sve modele je bio 1,00 čime je potvrđena bliskost predviđenih i eksperimentalnih podataka (slike 18a, 19a, 20a, 21a i 22a).

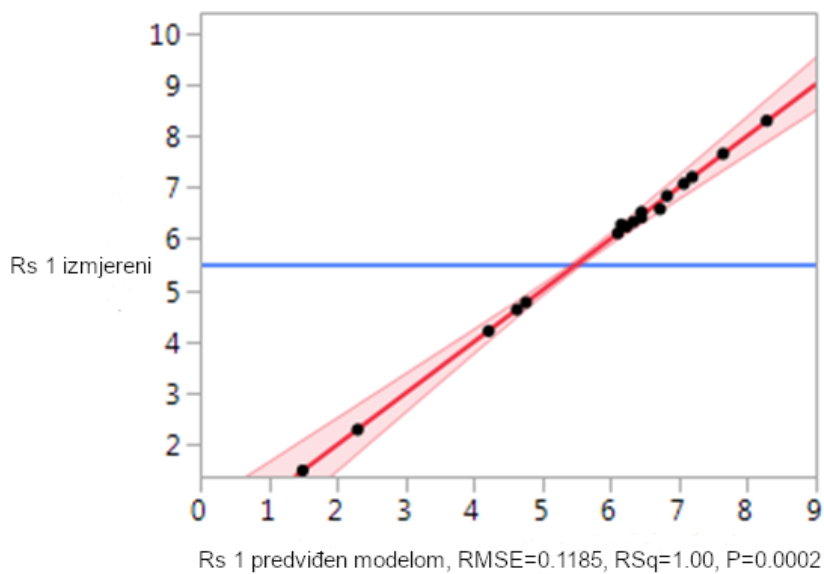
Tablica 16. Koeficijenti DoE modela¹⁶⁵

Parametri metode	Kritični atributi metode				
	Rs 1 ^a	Rs 2 ^b	Rs 3 ^c	TF 1 ^d	TF 2 ^e
protok (mL min ⁻¹)	1,369	-0,684	0,069	0,019	-0,047
Tk (°C)	-1,674	-1,194	0,334	0,003	0,285
ABPR (psi)	1,294	0,116	0,163	-0,010	-0,031
2-PrOH (%)	0,371	-0,455	0,104	-0,013	-0,056
protok (mL min ⁻¹) × Tk (°C)	0,867	0,836	-0,255	-0,009	0,040
protok (mL min ⁻¹) × 2-PrOH (%)	0,226	-0,236	0,174	-0,014	0,020
protok (mL min ⁻¹) × ABPR (psi)	-0,017	0,083	-0,012	0,025	-0,003
Tk (°C) × ABPR (psi)	-0,028	0,071	-0,092	-0,019	-0,002
Tk (°C) × 2-PrOH (%)	-0,421	-0,427	0,214	0,012	-0,003
ABPR (psi) × 2-PrOH (%)	0,012	0,287	0,178	-0,024	0,001
protok (mL min ⁻¹) × protok (mL min ⁻¹)	0,315	-0,316	0,405	-0,034	-0,416
Tk (°C) × Tk (°C)	-1,517	0,345	-0,763	0,058	0,241
ABPR (psi) × ABPR (psi)	-0,357	0,411	0,137	0,046	0,251
2-PrOH (%) × 2-PrOH (%)	0,300	-0,173	-0,461	0,002	0,200

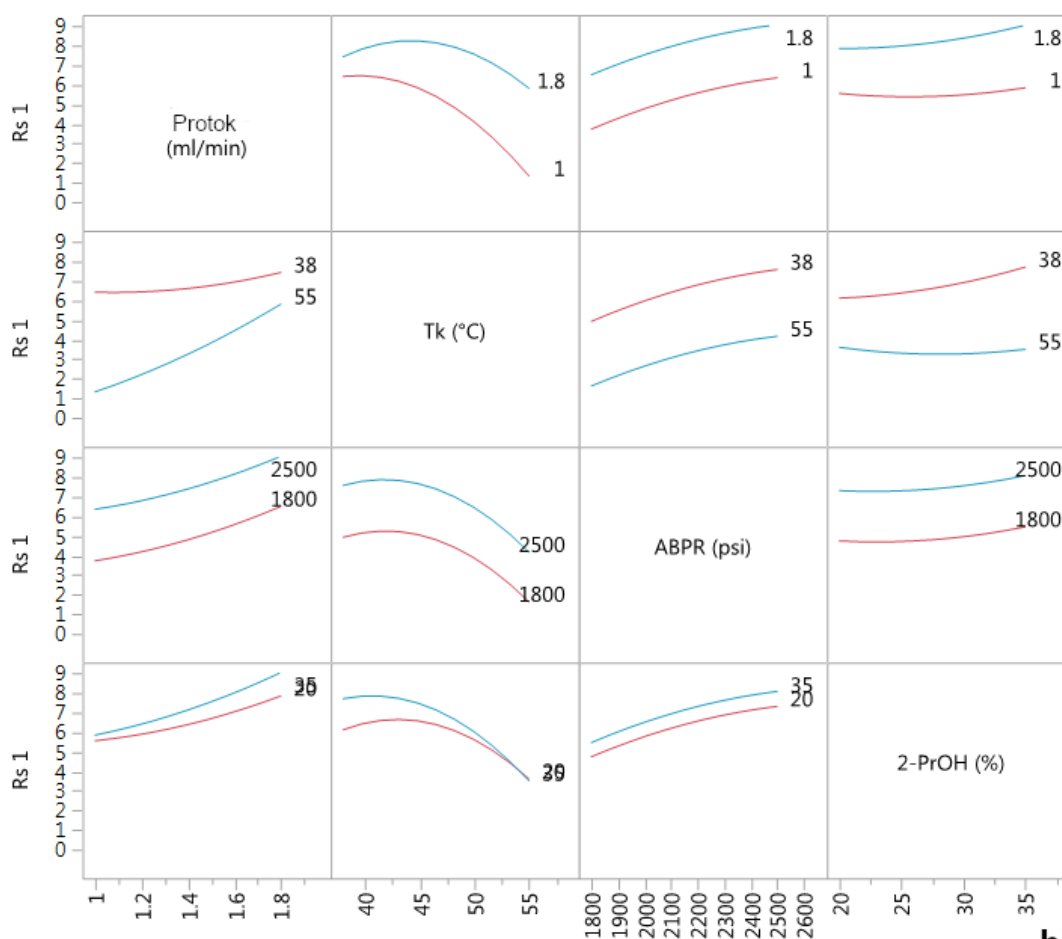
^a Rs 1 = razlučivanje između rifabutina i izonikotinamida, ^b Rs 2 = razlučivanje između acetil izoniazida i 3-izoniazida, ^c Rs 3 = razlučivanje između 3-izoniazida i izoniazida, ^d TF 1 = T_f rifabutina ^e TF 2 = T_f izoniazida

Utjecaj na razlučivanje između rifabutina i izonikotinamida, Rs 1

Najveći utjecaj na parametar Rs 1 ima temperatura kolone, što je vidljivo iz koeficijenta izračunatog za Tk (-1,674). Negativan predznak ukazuje na to da viša temperatura kolone smanjuje Rs. Značajni koeficijenti izračunati su i za protok (koeficijent = 1,369) te tlak (koeficijent = 1,294), oba s pozitivnim predznakom. Značajan koeficijent višeg reda ukazuje na interakcije između parametara protoka i temperature kolone (koeficijent = 0,867), a uočen je i kvadratni utjecaj temperature kolone (koeficijent = -1,517). Nešto slabiji je utjecaj sastava modifikatora s koeficijentom 0,371.



a)



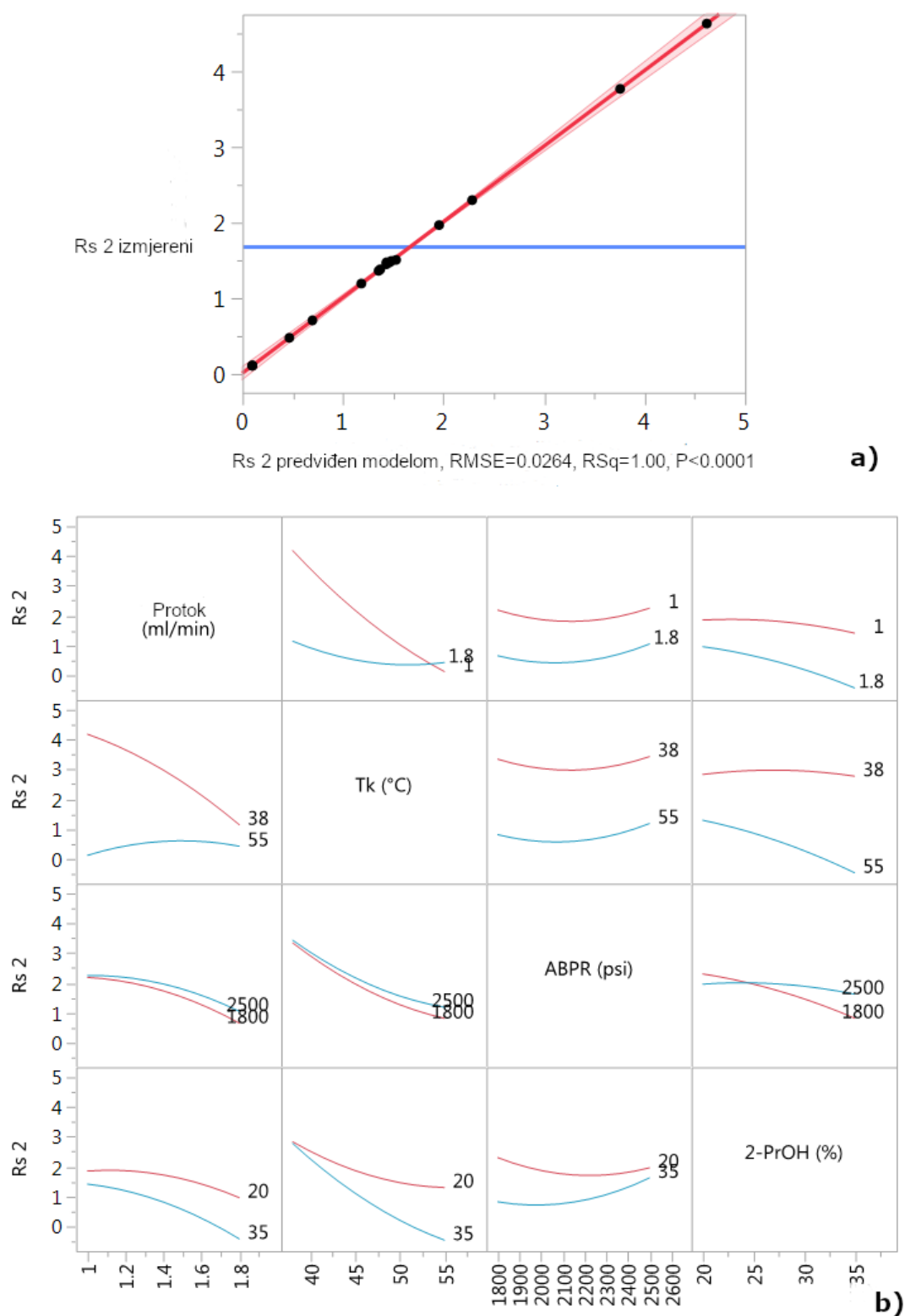
b)

Slika 18. Grafički prikaz utjecaja parametara metode na razlučivanje između rifabutina i izonikotinamida, Rs 1; graf izmjereno prema predviđenom matematičkim modelom (a); graf interakcija između mjerenih varijabli (b)¹⁶⁵

Zabilježene su i interakcije sastava modifikatora s temperaturom kolone i protokom (koeficijenti -0,421 i 0,226). Spomenute interakcije prikazane su u obliku preklapanja linija na slici 18b. Grafovi vizualno prikazuju povoljan utjecaj visokih protoka, niskih temperatura kolone i visokih tlakova na Rs 1.

Utjecaj na razlučivanje između acetil izoniazida i 3-izoniazida, Rs 2

Slično kao i kod prethodnog modela, temperatura kolone ima najveći utjecaj na parametar Rs 2 s koeficijentom -1,194. Sljedeći koeficijent po veličini predviđen je za utjecaj protoka, -0,684. Nešto niži utjecaj ima sastav modifikatora s koeficijentom -0,455. Promjena tlaka ima slab utjecaj na Rs 2, s koeficijentom 0,116. Ipak, promjena tlaka, za razliku od protoka, temperature kolone i sastava modifikatora, ima povoljan utjecaj zbog pozitivnog predznaka koeficijenta. Interakcije kromatografskih parametara uočene su i za ovaj CQA. Protok i temperatura kolone imaju kombinirani utjecaj na parametar Rs 2 s koeficijentom 0,836, što se očituje kao presjek linija na grafu interakcija (slika 19b).

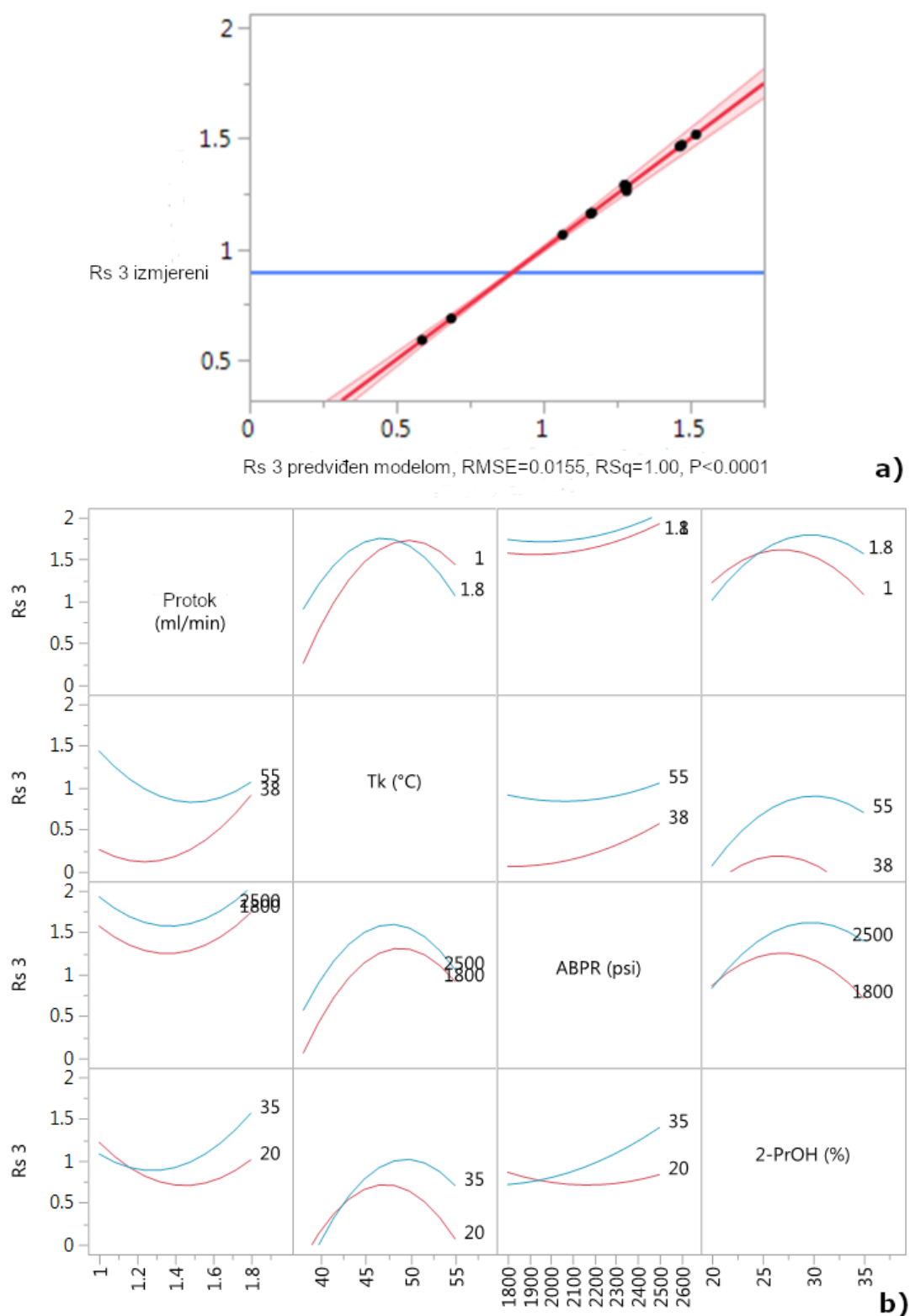


Slika 19. Grafički prikaz utjecaja parametara metode na razlučivanje između acetil izoniazida i 3-izoniazida, Rs 2; graf izmjereno prema predviđenom matematičkim modelom (a); graf interakcija između mjerenih varijabli (b)¹⁶⁵

Utjecaj na razlučivanje između 3-izoniazida i izoniazida, Rs 3

Još jednom se pokazalo kako temperatura kolone ima najznačajniji utjecaj na razlučivanje kritičnih parova pikova. Koeficijent T_k prema modelu izračunatom za Rs 3 je 0,334. Za razliku od prethodnih CQA koeficijent ima pozitivan predznak, što znači da povećanjem temperatura kolone raste i razdvajanje 3-izoniazida i izoniazida. Osim toga, moguće je uočiti i utjecaj tlaka s koeficijentom 0,163. Pozitivan predznak upućuje na zaključak kako ovom paru pikova odgovaraju uvjeti superkritičnog fluida bliži karakteristikama plinske kromatografije. Za promjenu protoka izračunat je mali koeficijent (0,069), suprotno zaključcima za parametre Rs 1 i Rs 2.

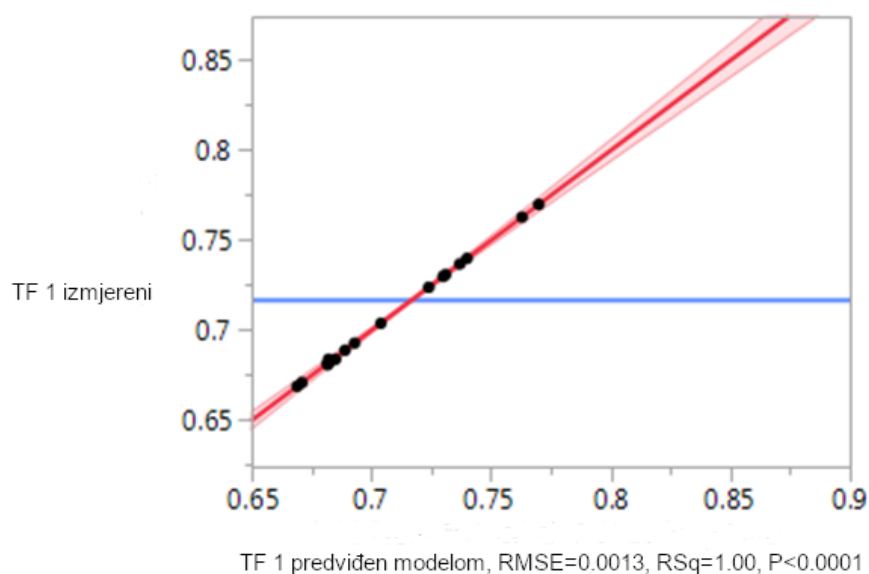
Nelinearni utjecaji vidljivi su za T_k (koeficijent $-0,763$), udio 2-PrOH (koeficijent $-0,461$) i protok (koeficijent 0,405). Interakcije T_k i protoka opisane su koeficijentom $-0,255$, protoka i sastava modifikatora s koeficijentom 0,174, te T_k i sastava modifikatora s koeficijentom 0,214. Konačno, graf interakcija (slika 20b) potvrđuje povoljan utjecaj visoke temperature, visokog tlaka i većeg udjela 2-propanola u sastavu modifikatora na parametar Rs 3.



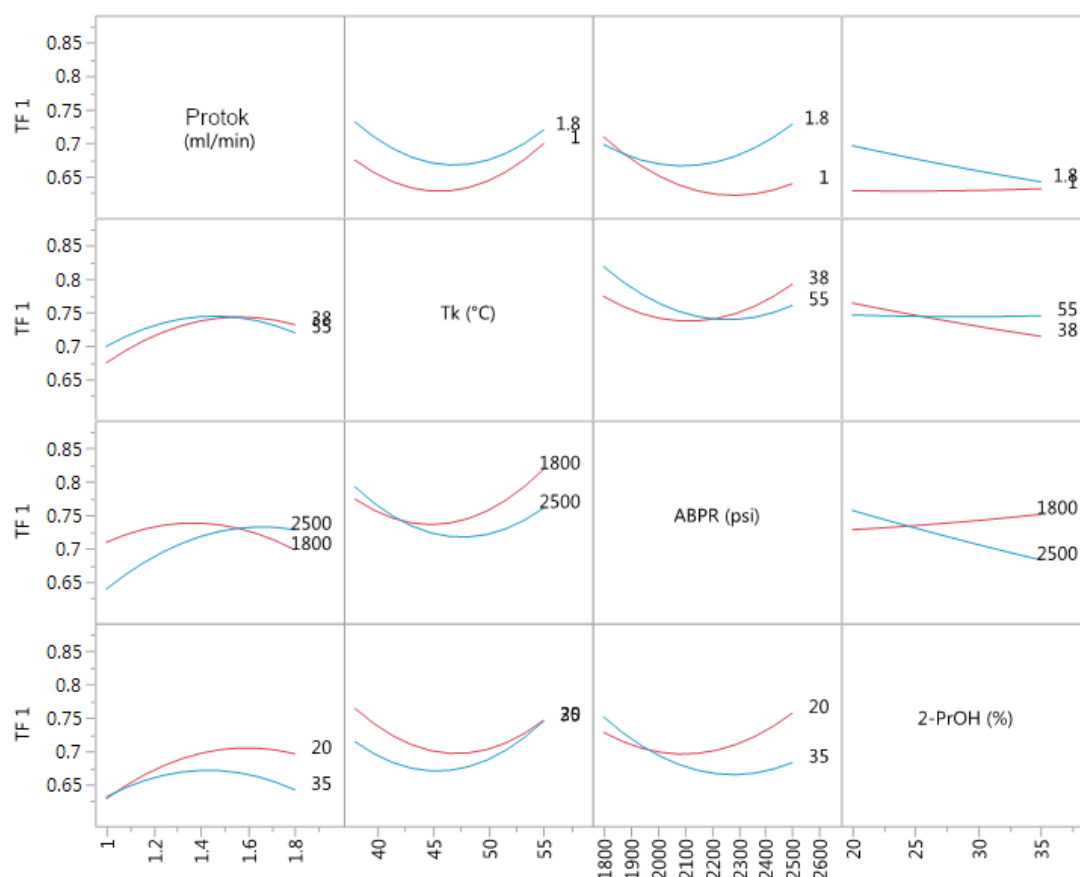
Slika 20. Grafički prikaz utjecaja parametara metode na razlučivanje između 3-izoniazida i izoniazida, Rs 3 graf izmjereno prema predviđenom matematičkim modelom (a); graf interakcija između mjerenih varijabli (b) ¹⁶⁵

Utjecaj na T_f rifabutina, TF 1

Rezultati matematičkog modela prikazani u tablici 16 upućuju na to da parametri koje smo mijenjali kroz DoE nemaju značajan utjecaj na varijacije parametra TF 1. Model potvrđuje kako na oblik pika veliki utjecaj ima vrsta nepokretne faze. Niski koeficijenti za model izračunat za TF 1 rezultat su kratkog zadržavanja rifabutina na koloni, zbog čega je utjecaj karakteristika pokretne faze slab. Graf interakcija (slika 21b) pokazuje više parametara kod kojih su linije krajnjih uvjeta prekrižene, ukazujući time na interakcije ispitivanih parametara, kompleksnost SFC parametara i njihov kombinirani utjecaj na CQA. Iz DoE pokusa vidljivo je da je TF 1 bio najbliži 1,0 u eksperimentu 13 ($1,8 \text{ mL min}^{-1}$; 2500 psi (17236 kPa); 20 % 2-propanola i $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Međutim, ovi uvjeti nisu bili povoljni za parametar Rs 3.



a)



b)

Slika 21. Grafički prikaz utjecaja parametara metode na T_f rifabutina, TF 1; graf izmjereno prema predviđenom matematičkim modelom (a); graf interakcija između mjerenih varijabli (b) ¹⁶⁵

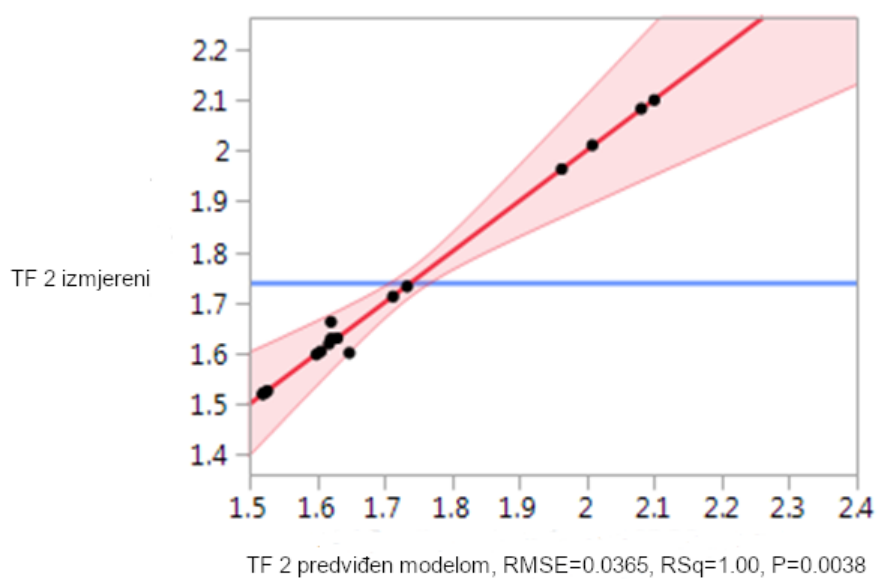
Utjecaj na T_f izoniazida, TF 2

Matematički model za odgovor TF 2 ima nešto više koeficijente, no što je to slučaj za TF 1. S obzirom na to da je zadržavanje pika izoniazida bolje nego pika rifabutina, očekivano je veći utjecaj promjena karakteristika pokretne faze na vrijeme zadržavanja i oblik pika. Ovo je i u skladu s činjenicom da su nužne promjene inicijalne SFC pokretne faze (CO_2) kako bi eluirali polarne analite s nepokretne faze.

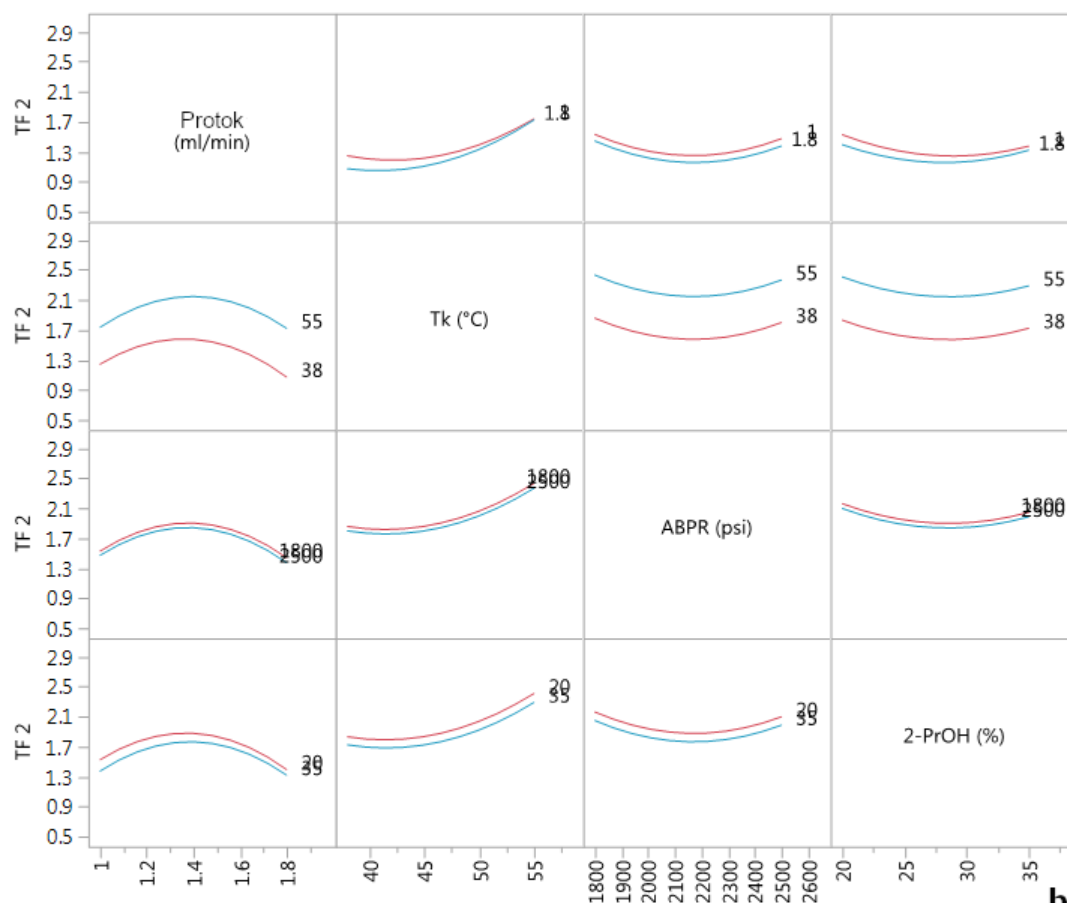
Temperatura kolone ima najveći utjecaj na TF 2, s koeficijentom 0,285. Pozitivni predznak ovog koeficijenta je znak da više temperature pogoduju višim vrijednostima TF 2. Budući da je cilj približiti se $T_f = 1,0$, za ovaj pik nepovoljno je povećavati temperaturu kolone. Isti zaključak vidljiv je i iz interakcijskog profila (slika 22b). Niže temperature su pogodnije za vrijednosti TF 2 bliže 1,0. Ipak, niže temperature kolone rezultiraju jačim zadržavanjem izoniazida što onda dovodi do gubitka visine pika, a posljedično i mogućih problema s osjetljivošću metode, iako je simetrija pika postaje bolja.

Ostali faktori označeni su linijama blisko postavljenim za krajnje ispitane vrijednosti parametara, što označava da promjena tih faktora nema značajnog utjecaja.

Interakcije parametara za ovaj CQA nisu značajne (koeficijenti $< 0,02$). U skladu s tim nema ni križanja linija u profilima interakcija. S druge strane, nelinearni utjecaji uočeni su za sve ispitivane parametre, s koeficijentima 0,251 za tlak, 0,241 za Tk, 0,200 za sastav modifikatora i $-0,416$ za protok. Budući da je ovaj odgovor potrebno smanjiti i približiti se vrijednosti 1,0, koeficijenti negativnog predznaka su poželjni.



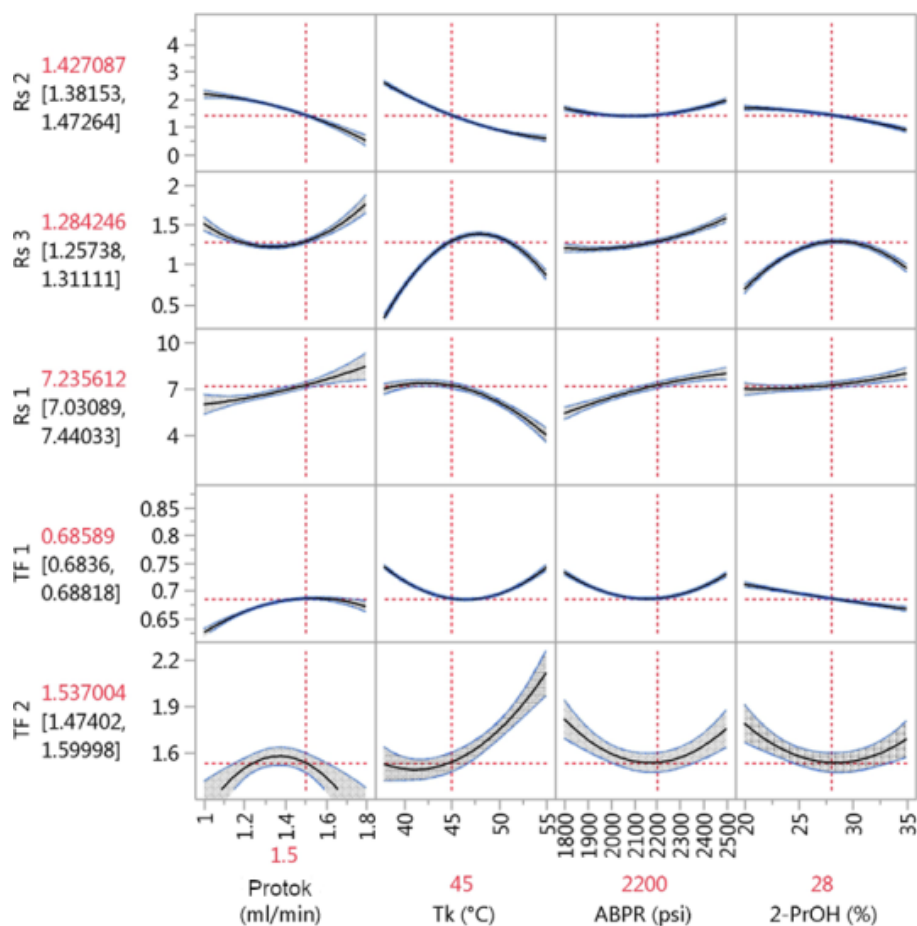
a)



b)

Slika 22. Grafički prikaz utjecaj parametara metode na T_f izoniazida, TF 2; graf izmjereno prema predviđenom matematičkim modelom (a); graf interakcija između mjerenih varijabli (b)¹⁶⁵

Parametri optimalne SFC metode odabrani su uz pomoć JMP platforme za predikciju (engl. *JMP Prediction profiling platform*). Uvjeti protoka, temperature kolone, tlaka i sastava modifikatora odabrani su na način da osiguravaju optimalne vrijednosti za ispitivane CQA istovremeno (slika 23).



Slika 23. JMP platforma za predikciju – odabir optimalnih uvjeta za sve kromatografske parametre istovremeno¹⁶⁵

ABPR je postavljen na 2200 psi (15168 kPa), protok na $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura kolone na 45°C . Za gradijentno eluiranje odabran je modifikator u sastavu MeOH-2-PrOH-TEA- H_2O u volumnim omjerima 70:28:0.1:2,0.

Primjena računalnog programa omogućila je uočavanje kombiniranih utjecaja više parametara. Uočeni su utjecaji i relacije koje nije lako uočiti prilikom standardnog načina razvoja metode, a konačni su uvjeti odabrani na temelju evaluacije svih CQA istovremeno.

4.2.7. Validacija SFC metode

Nakon odabira konačnih uvjeta, analitička metoda (tablica 17) uspješno je validirana. Ispitivanja su provedena prema ICH smjernicama za parametre linearnost, točnost, radno područje, preciznost, selektivnost, granicu određivanja i robusnost. Određena je stabilnost otopina te ispitana prikladnost filtera. Rezultati su prikazani na slikama 24 i 25 te tablicama 18 i 19.

Tablica 17. Uvjeti SFC metode

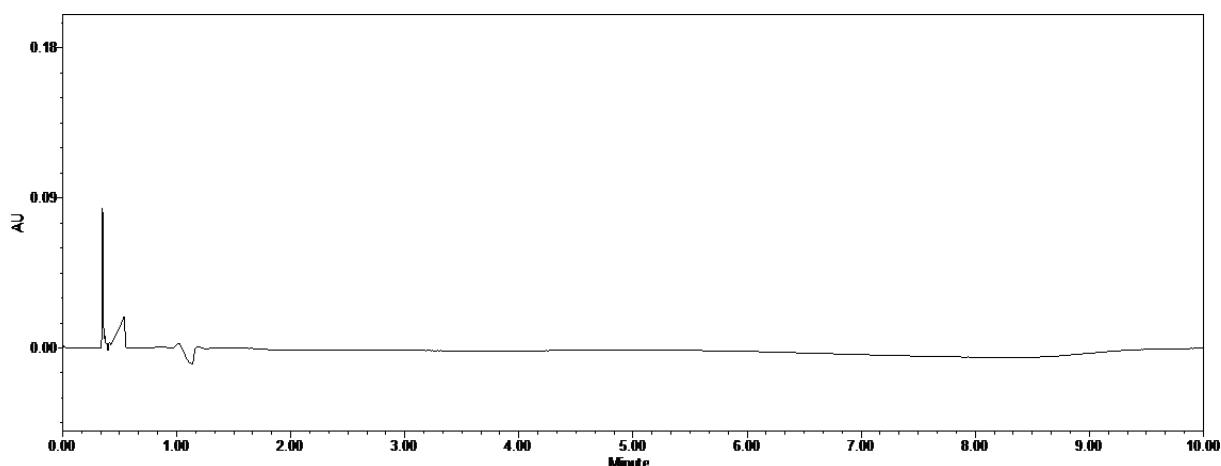
Nepokretna faza	Acquity UPC ² ™ Torus DEA, 3,0 × 100 mm, veličine čestica 1,7 μm		
Pokretna faza A	CO ₂		
Pokretna faza B	MeOH-2-PrOH-TEA-H ₂ O (70:28:0,1:2,0)		
Protok	1,5 mL min ⁻¹		
Volumen injektiranja	3 μL		
Valna duljina	260 nm za rifabutin i onečišćenja, 205 za izoniazid		
Temperatura kolone	45 °C		
Gradijentno eluiranje	vrijeme / minute	A / %	B / %
	0,0	94	6
	2,5	92	8
	7,0	87	13
	8,0	87	13

Selektivnost

U svrhu ispitivanja selektivnosti pripremljena je placebo smjesa. Pomoćne tvari najčešće korištene u suhim oralnim oblicima (škrob, laktoza monohidrat, mikrokristalinična celuloza, manitol, natrijev lauril sulfat, silicijev dioksid, kroskarmeloza, magnezijev stearat i krospovidon) pomiješane su u najvećim dozvoljenim omjerima za suhe oralne pripravke.⁶⁵

Otopljene su u smjesi 2-propanola i *n*-heptana u volumnom omjeru 9:1.

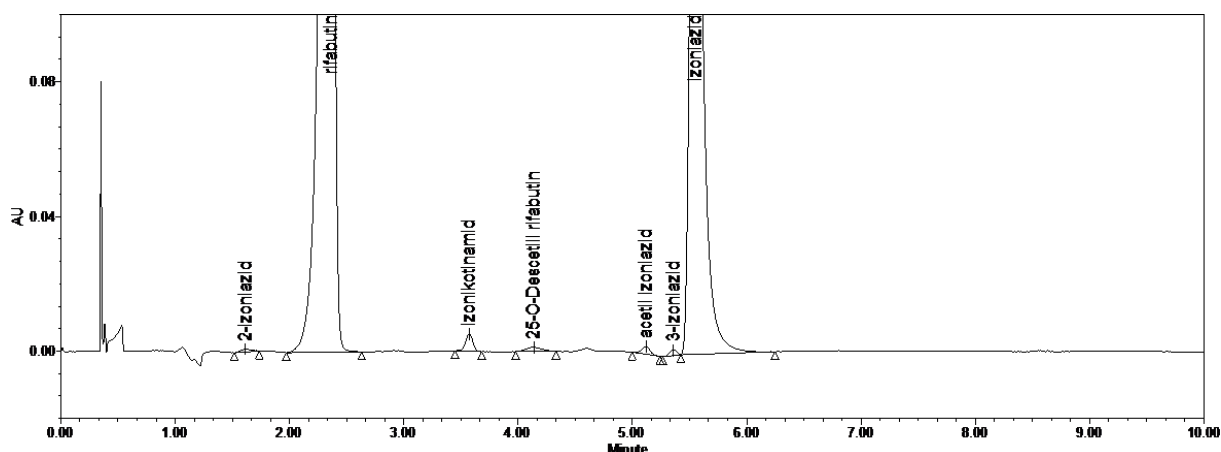
Otopina placeba nije pokazivala interferencije koje bi smetale određivanju izoniazida, rifabutina i njihovih onečišćenja (slika 24).



Slika 24. Kromatogram otopina placeba snimljen pri 260 nm

Uz placebo otopinu mjerena je i otopina dviju aktivnih tvari, izoniazida i rifabutina u koncentraciji 2 mg mL^{-1} , u koju su dodana poznata onečišćenja u koncentraciji $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$. Svi su analiti uspješno kromatografski razdvojeni (slika 25).

Relativna vremena zadržavanja (RRT) za onečišćenja izračunata su u odnosu na izoniazid, analit koji posljednji eluira na kromatogramu. Iznosila su 0,29 za 2-izoniazid, 0,64 za izonikotinamid, 0,75 za 25-O-desacetil rifabutin, 0,92 za 3-izoniazid i 0,97 za acetil izoniazid.

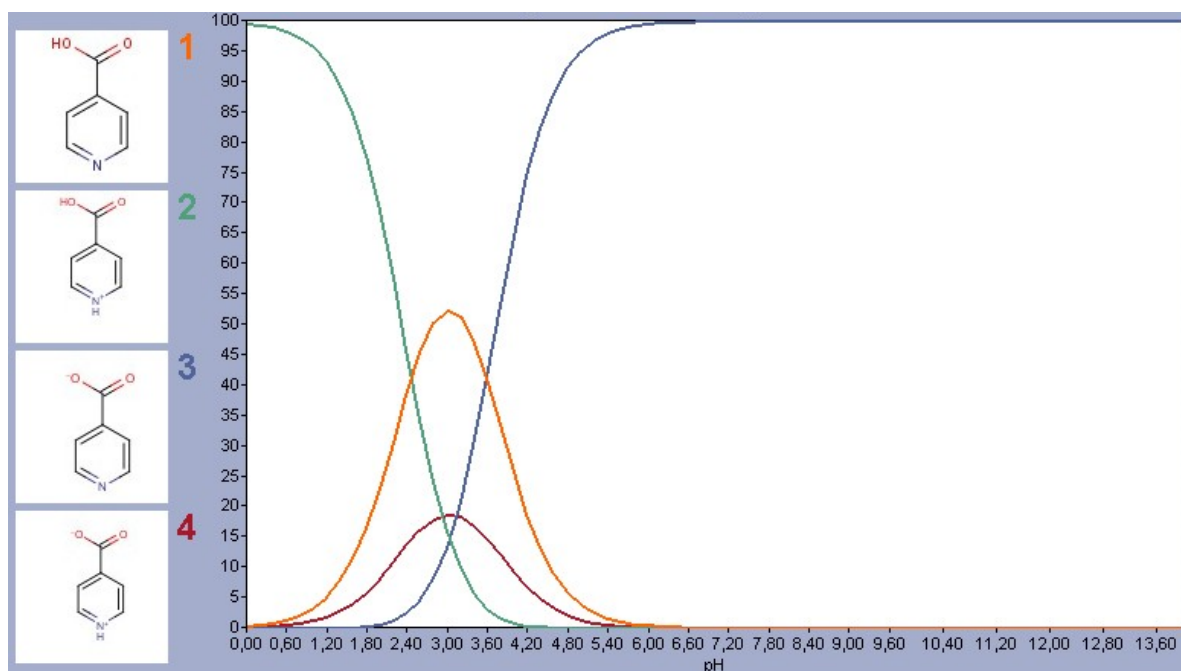


Slika 25. Kromatogram otopine placeba u koju su dodani izoniazid i rifabutin (2 mg mL^{-1}) i poznata onečišćenja izoniazida i rifabutina ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$)

Usporedbom UHPLC i SFC metoda moguće je uočiti kako je bolje razdvajanje među analitima postignuto SFC metodom. Acetil izoniazid i 3-izoniazid su pri osnovici pika

odvojeni od drugih analita. Ipak, aktivne komponente, izoniazid i rifabutin, imaju nešto lošije oblike pikova u odnosu na UHPLC metodu.

SFC metoda nije bila pogodna za eluiranje izonikotinske kiseline. Ovaj analit se pokazao kao najpolarniji kod UHPLC metode (poglavlje 4.1.12) s eluiranjem unutar prve 3 minute. Polarnost izonikotinske kiseline jasno je vidljiva i iz log D krivulja (slika 14, tablica 3). Na prvi pogled izračun log P vrijednosti uz pomoć Marvin računalnog programa ukazivao je kako je primjena SFC-a u analizi izonikotinske kiseline moguća. Izračunati log P bio je < -2 i iznosio je 0,41. Ipak, uvidom u raspodjelu specija izonikotinske kiseline kroz čitavo pH područje jasno je da je stvarni log P znatno niži jer prevladavaju udjeli ioniziranih oblika molekule. Oni su na slici 26 označeni kao 2, 3 i 4 (zeleni, plavi i crveni liniji). Njihove log P vrijednosti su redom $-0,57$, $-3,12$, i $-0,80$.



Slika 26. Grafički prikaz udjela različitih specija izonikotinske kiseline

Linearnost

Linearnost je ispitana mjerenjem pet otopina različitih koncentracijskih nivoa za svaki od ispitivanih analita. U izračunu je primijenjena metoda linearne regresije površine pika prema ispitivanoj koncentraciji. Određen je koeficijent determinacije (r^2) i izračunate su kalibracijske krivulje, te relativni faktor odgovora za onečišćenja, RRF. RRF je određen iz

omjera nagiba pravca onečišćenja i nagiba pravca ogovarajuće aktivne tvari. Rezultati su prikazani u tablici 18.

Tablica 18. Linearnost analitičke metode

Analit	Koncentracijski raspon / mg mL ⁻¹	Jednadžba pravca	r ² ^a	s/n ^b	RRF ^c
Određivanje sadržaja aktivnih tvari					
izoniazid	1,2 - 3,0	y = 2223308 x + 17865	1,00	/	/
rifabutin	1,2 - 3,0	y = 2957167 x + 42506	1,00	/	/
Određivanje onečišćenja					
izoniazid	0,004 - 0,040	y = 870262 x + 1450	1,00	10	/
rifabutin	0,002 - 0,020	y = 2797169 x + 303	1,00	11	/
2-izoniazid	0,008 - 0,020	y = 423948 x - 151	1,00	12	0,48
3-izoniazid	0,008 - 0,020	y = 757336 x - 986	0,99	10	0,85
acetil izoniazid	0,002 - 0,020	y = 1939931 x + 204	1,00	14	1,70
izonikotinamid	0,002 - 0,020	y = 1497239 x + 142	1,00	12	2,21
25-O-desacetil rifabutin	0,002 - 0,020	y = 2712099 x + 1324	1,00	11	0,97

^a r² = koeficijent determinacije, ^b s/n = omjer signala i šuma, ^c RRF = relativni faktor odgovora

Granica određivanja

Granica određivanja provjerena je na najnižoj koncentraciji iz ispitivanja linearnosti određivanjem s/n vrijednosti. Za rifabutin, acetil izoniazid, izonikotinamid i 25-O-desacetil rifabutin granica određivanja potvrđena je pri koncentraciji 0,002 mg mL⁻¹; za izoniazid pri koncentraciji 0,004 mg mL⁻¹, a 2-izoniazid i 3-izoniazid pri koncentraciji 0,008 mg mL⁻¹. Iz rezultata je utvrđeno kako je osjetljivost SFC metode slabija u odnosu na ranije opisanu UHPLC metodu.

Preciznost

Preciznost metode potvrđena je pripremom skupa otopina kroz dva radna dana od strane dva analitičara. Budući da na tržištu nije prisutna formulacija koja sadrži obje aktivne tvari, uzorak za ispitivanje preciznosti pripremljen je na način da se smjesi za kapsuliranje iz komercijalno dostupnih kapsula rifabutina dodao izoniazid. Smjesa je vagana za šest priprema te otopljen u smjesi otapala (*n*-heptane:2-propanol=1:9) pri čemu je koncentracija aktivnih tvari bila 2 mg mL⁻¹. Isti postupak ponovljen je sljedeći dan od strane drugog analitičara.

RSD vrijednost za određivanje sadržaja izoniazida i rifabutina bila je manja od 2,5 % za skup od šest priprema, a razlika između srednjih vrijednosti sadržaja kroz dva dana bila je 0,6 % za izoniazid i 0,4 % za rifabutin.

RSD vrijednost za određivanje onečišćenja je < 11 %, a razlika između sadržaja pojedinih onečišćenja između dva dana $\leq 0,03$ %.

Točnost

Otopine za određivanje točnosti pripremljene su dodavanjem analita u tri različite koncentracije na placebo pripremljen na isti način kao i za ispitivanje selektivnosti. Za svaku koncentracijsku razinu pripremljene su tri otopine.

Rezultati su izračunati kao analitički povrat izmjerene koncentracije u odnosu na poznatu, dodanu koncentraciju. Za određivanje sadržaja aktivnih tvari analitički povrati su bili unutar 97,0 – 103,0 % s RSD $< 3,0$ % na pojedinoj koncentracijskoj razini (tablica 19).

Za određivanje onečišćenja analitički povrati su bili u rasponu 85,0 – 115,0 % s RSD vrijednostima $< 10,0$ % (tablica 19).

Radno područje

Radno područje metode za sadržaj aktivnih tvari potvrđeno je u rasponu 1,2 - 2,4 mg mL⁻¹. Za određivanje onečišćenja radno područje metode je 0,004 – 0,04 mg mL⁻¹ za nepoznata onečišćenja izoniazida, 0,002 – 0,02 mg mL⁻¹ za nepoznata onečišćenja rifabutina, acetil izoniazid, izonikotinamid i 25-O-desacetil rifabutin te 0,008 – 0,02 mg mL⁻¹ za određivanje 2-izoniazida i 3-izoniazida.

Stabilnost

Stabilnost otopine uzorka ispitana je mjerenjem otopine kroz vrijeme te usporedbom rezultata analize s vrijednostima svježe pripremljenih otopina. Otopina uzorka za određivanje sadržaja aktivnih tvari stabilna je najmanje dva dana čuvana na sobnoj temperaturi. Omjer površina izoniazida i rifabutina unutar dva dana bio je u rasponu 0,97 – 1,03. Iako nije uočena razgradnja uzorka, niti porast razgradnih produkata, primijećen je trend povećanja površina. Razlog tome je organsko, lako hlapivo otapalo zbog kojeg dolazi do ukoncentriravanja uzorka s vremenom. Iz tog razloga je temperatura injektora u metodi postavljena na 15 °C.

Za određivanje onečišćenja prikladno čuvan i zatvoren uzorak stabilan je bar šest dana. Za to vrijeme porast onečišćenja je bio od 0,28 % do 0,34 %, djelomično i zbog othlapljivanja otapala.

Ipak, organsko otapalo omogućilo je veću stabilnost uzorka nego što je to slučaj kod UHPLC metode budući da nije uočen porast razgradnih produkata.

Tablica 19. Rezultati točnosti

Analit	Koncentracija / mg mL ⁻¹	Prinos / %	RSD ^a / %
<i>Određivanje sadržaja aktivnih tvari</i>			
Izoniazid	1,2	101,8	0,8
	1,8	100,0	2,8
	2,4	101,4	3,0
Rifabutin	1,2	97,5	0,4
	1,8	98,3	0,2
	2,4	99,1	1,1
<i>Određivanje onečišćenja</i>			
Izoniazid	0,004	112,6	1,2
	0,010	95,7	5,1
	0,040	102,4	1,0
Rifabutin	0,002	97,5	3,6
	0,005	93,7	7,6
	0,020	103,6	7,9
2-izoniazid	0,008	96,7	3,4
	0,010	104,3	2,9
	0,020	97,2	7,5
3-izoniazid	0,008	93,4	6,3
	0,010	100,7	5,0
	0,020	105,0	7,2
acetil izoniazid	0,002	107,4	7,3
	0,005	106,4	3,6
	0,020	101,2	2,5
izonikotinamid	0,002	102,3	6,2
	0,005	103,7	0,8
	0,020	98,4	2,9
25-O-desacetil rifabutin	0,002	110,1	3,2
	0,005	110,2	6,6
	0,020	99,2	1,6

^a RSD = relativna standardna devijacija

Filter studija

Filter studija osmišljena je na način da je uzorak filtriran kroz ispitivani filter pri čemu su sakupljene frakcije propuštene kroz filter od po 2 mL (0 – 2 mL, 2 – 4 mL, 4 – 6 mL). Ispitan je filter Whatman Spartan 0,2 μm . Površina pikova u filtriranim frakcijama uspoređena je s površinama pikova na kromatogramu centrifugiranog alikvota istog uzorka. Rezultati su pokazali da je potrebno propustiti 4 mL uzorka kroz filter prije sakupljanja alikvota za analizu. Omjer površina za alikvot nakon propuštenih 4 mL je bio u rasponu 100,0 – 100,1 % za sadržaj izoniazida i rifabutina i 93,4 – 107,7 % za onečišćenja.

Robusnost

Robusnost razvijene metode ispitana je variranjem uvjeta analize u uskom rasponu. Ispitani su parametri: temperatura kolone u rasponu 42 – 48 °C; sastav modifikatora 26 – 30 % 2-propanola; količina TEA u modifikatoru u rasponu 0,05 – 0,20 %; količina H₂O u modifikatoru u rasponu 1,0 – 3,0 % i protok u rasponu 1,4 – 1,6 mL min⁻¹.

Rezultati robusnosti su evaluirani prema promjeni CQA ranije odabranih za DoE, Rs 1, Rs 2, Rs 3, TF 1 i TF 2. U svim promjenama postignuto je razdvajanje pikova na osnovici te nije uočeno koeluiranje. Rs 1 i Rs 2 su pri svim uvjetima bili > 1,5. Za Rs 3 vrijednosti su bile nešto niže (oko 1,3), ali pik 3-izoniazida je u svim kromatogramima odvojen od izoniazida i određen bez poteškoća. Rs 3 je varirala $\pm 0,08$.

T_f je varirao do $\pm 0,03$ za rifabutin i do $\pm 0,12$ za izoniazid što je u skladu i sa zaključcima DoE.

Rezultati su potvrdili robusnost razvijene SFC metode.

4.2.8. Analiza gotovih oblika SFC metodom

Prikladnost analitičke metode je potvrđena i na uzorcima gotovih formulacija. Na tržištu su dostupni proizvodi s jednom aktivnom komponentom, kapsule rifabutina i tablete izoniazida. Formulacija s obje aktivne tvari pripremljena je umješavanjem izoniazida u smjesu za kapsuliranje koja je sadržavala rifabutin iz na tržištu dostupnih kapsula.

Tablica 20 sadrži rezultate sadržaja aktivnih tvari i njihovih onečišćenja za navedene uzorke. Rezultati su u skladu sa zahtjevima monografija američke farmakopeje za kapsule rifabutin i tablete izoniazida.³⁴ Sadržaj izoniazida i rifabutina je u zadanim granicama od 90,0

– 110,0 %. Poznata onečišćenja ni jedne od aktivnih tvari nisu uočena kao ni ranije kod analize ortogonalnom UHPLC metodom. Najveće onečišćenje je bilo na razini 0,8 % kod izoniazid tableta. Kod analize UHPLC metodom najveće izoniazidno onečišćenje je bilo na razini 0,4 % što je rezultat razlike u vremenu analize prema dvije metode. Uočene su i male razlike u količini ukupnih onečišćenja između dviju analiza što je rezultat nešto bolje selektivnosti UHPLC metode prema nepoznatim onečišćenjima ali i nestabilnosti otopine za analizu UHPLC metodom.

Dva dodatna onečišćenja, RRT 0,53 i 0,67, detektirana su kod uzorka koji je sadržavao obje aktivne tvari, oba u koncentraciji 0,1 %.

Tablica 20. Rezultati ispitivanja gotovih proizvoda

Oznaka uzorka	Sadržaj aktivnih tvari			Udio onečišćenja		
	/ %			/ %		
	Izoniazid	Rifabutin	Poznata onečišćenja	Nepoznata onečišćenja ^a		Udio ukupnih onečišćenja
				RRT 0,41	RRT 0,90	
1	101,1	/	/	0,8	/	0,8
2	/	99,5	< 0,1	/	0,3	0,5
3	/	103,3	< 0,1	/	0,3	0,4
4	103,5	103,3	< 0,1	NP ^b	0,3	0,7

^a Prikazana najveća nepoznata onečišćenja

^bNP = nije primjenjivo jer vrijeme zadržavanja analita vrlo blisko vremenu zadržavanja rifabutina

Pik placebo koji je uočen analizom u uzorku tableta izoniazida kod analize UHPLC metodom, a koeluirao je s acetil izoniazidom prema toj metodi, prema SFC metodi je dobro odvojen od svih poznatih analita i eluira s vremenom zadržavanja od 8,1 minuta.

4.2.9. Prisilna razgradnja

Studija prisilne razgradnje provedena je kako bi se ispitala selektivnost razvijene SFC metode za određivanje sadržaja aktivnih tvari i onečišćenja formulacije koja sadrži izoniazid i rifabutin. Svrha ovakve studije je dati uvid u osjetljivost, razgradne puteve i razgradne mehanizme analita.

Zbog poteškoća s miješanjem otapala propisanog metodom (2-propanol:*n*-heptan=9:1), s reagensima koji se najčešće koriste u prisilnoj razgradnji, otapalo propisano metodom je zamijenjeno 2-propanolom. Isoniazid i rifabutin su otopljeni u koncentraciji 2 mg mL⁻¹. Otopinama su dodane razrijeđena kiselina, razrijeđena lužina i razrijeđeni vodikov peroksid. Uz tretirane alikvote analizirani su i netretirani uzorci kao kontrolni uzorci. Eksperimentalni uvjeti prikazani su u tablicama 21 i 22.

Tablica 21. Uvjeti prisilne razgradnje za izoniazid

Vrsta reakcije razgradnje	Priprema uzorka
Kisela hidroliza	2 mg mL ⁻¹ ^a + 5 µL 0,2 mol L ⁻¹ HCl/6 sata ST ^b
Lužnata hidroliza	2 mg mL ⁻¹ ^a + 5 µL 2 mol L ⁻¹ NaOH/3,5 sata ST ^b
Oksidacija	2 mg mL ⁻¹ ^a + 5 µL 1 % H ₂ O ₂ /12 dana ST ^b

^a koncentracija izoniazida i rifabutina u otopini

^b sobna temperatura

Tablica 22. Uvjeti prisilne razgradnje za rifabutin

Vrsta reakcije razgradnje	Priprema uzorka
Kisela hidroliza	2 mg mL ⁻¹ ^a + 5 µL 0,5 mol L ⁻¹ HCl/3 sata ST ^b
Lužnata hidroliza	2 mg mL ⁻¹ ^a + 5 µL 1 mol L ⁻¹ NaOH/0,5 sati ST ^b
Oksidacija	2 mg mL ⁻¹ ^a + 5 µL 30 % H ₂ O ₂ /12 dana ST ^b

^a koncentracija izoniazida i rifabutina u otopini

^b sobna temperatura

Uvjeti iz tablica 21 i 22 odabrani su nakon početnih ispitivanja kod kojih su reagensi veće koncentracije uzorkovali fizikalne promjene otopina. Dodatkom 5 mol L⁻¹ HCl otopini izoniazida došlo je do stvaranja bijelog precipitata, a dodatkom 5 i 10 mol L⁻¹ NaOH do promjene boje otopine. Ovi uzorci nisu analizirani, a prisilna razgradnja je provedena sa znatno manje koncentriranim reagensima (tablica 21 i 22).

Tretirane otopine analizirane su zaštićene od svjetla. Nastala onečišćenja označena su prema njihovom vremenu zadržavanja, a porast poznatih onečišćenja nije uočen. Onečišćenja su izražena kao porast prema istom onečišćenju iz kontrolnog uzorka (tablica 23).

Isoniazid je bez obzira na promjenu otapala u odnosu na prisilnu razgradnju provedenu UHPLC metodom opet pokazao najveću osjetljivost prema lužnatim uvjetima. Značajni produkt razgradnje eluira na 2,28 minute, a isto onečišćenje uočeno je i kod kisele razgradnje,

ali u nešto manjoj količini. SFC metoda za određivanje onečišćenja iz FDC koji sadrži izoniazid i rifabutin nažalost nije dovoljno selektivna za određivanje ovog onečišćenja (RRT 0,41) budući da ono eluira na vremenu zadržavanja vrlo bliskom vremena zadržavanja rifabutina. Stoga je zaključeno da iako je SFC metodom postignuto bolje razdvajanje za poznata onečišćenja, UHPLC metoda je pogodnija za ispitivanje nepoznatih onečišćenja.

Nadalje, kao i kod prisilne razgradnje provedene UHPLC metodom izoniazid je najstabilniji prema oksidativnim reagensima. MB je bio nešto viši kod uvjeta oksidacije, ali se mora uzeti u obzir moguća mala greška određivanja zbog lako hlapivog organskog otapala i malog volumena na kojem je provedena razgradnja.

U svim uvjetima zabilježeno je znatno manje razgradnih produkata nego kod prisilne razgradnje ispitivane za UHPLC metodu. Razlog tome bi mogao biti bolja stabilnost u organskom otapalu u odnosu na vodeno otapalo, što je uočeno kod mjerenja stabilnosti otopine uzorka ispitivanom u tijeku obiju validacija. Dodatno, treba se naglasiti da su za ispitivanja prisilne razgradnje SFC tehnikom korišteni reagensi slabije koncentracije u odnosu na one korištene u prisilnoj razgradnji UHPLC metodom zbog više koncentracije analita primijenjene kod SFC određivanja.

Prisilna razgradnja rifabutina pokazala je najveću osjetljivost prema lužnatim uvjetima. Najznačajnije onečišćenje uočeno je na 3,41 minuti u količini od čak 7,3 % unutar samo pola sata izloženosti. Iako su uočena samo dva onečišćenja njihova ukupna količina odgovarala je padu sadržaja rifabutina pa je MB bio 100 %. Slično je zamijećeno i UHPLC analizom gdje su uočena dva istaknuta produkta razgradnje nakon samo 15 minuta izloženosti nešto jačem reagensu ($1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$). Kod kisele razgradnje veći je broj onečišćenja, ali manja ukupna količina, uz MB 97 %. Kako bi postigli prihvatljivu razgradnju za alikvot tretiran H_2O_2 uzorak je bilo potrebno izložiti kroz 12 dana što ukazuje slabiju osjetljivost prema H_2O_2 kako je i ranije zaključeno. Najznačajniji razgradni produkt je uočen na 4,78 minuta s oko 4,5 %, a MB za oksidaciju je bio 103 %.

Tablica 23. Rezultati prisilne razgradnje

Analit	Prinos / %		
	Lužnata hidroliza	Kisela hidroliza	Oksidacija
Sadržaj izoniazida	86,5	93,5	102,6
Onečišćenje 1, t_R 2,28 minuta	8,35	4,40	0,95
Onečišćenje 2, t_R 3,46 minuta	0,29	0,35	0,12
Onečišćenje 3, t_R 4,10 minuta	0,15	/	/
Onečišćenje 4, t_R 7,60 minuta	4,33	/	0,30
MB	100	98	107
Sadržaj rifabutina	91,8	95,2	97,7
Onečišćenje 5, t_R 3,04 minuta	/	/	0,20
Onečišćenje 6, t_R 3,41 minuta	7,33	/	/
Onečišćenje 7, t_R 4,23 minuta	0,90	/	/
Onečišćenje 8, t_R 4,25 minuta	/	0,67	/
Onečišćenje 9, t_R 4,39 minuta	/	0,68	/
Onečišćenje 10, t_R 4,76 minuta	/	/	4,54
Onečišćenje 11, t_R 4,79 minuta	/	0,14	/
Onečišćenje 12, t_R 5,20 minuta	/	/	0,20
Onečišćenje 13, t_R 5,83 minuta	/	0,40	/
Onečišćenje 14, t_R 7,00 minuta	/	/	0,16
MB	100	97	103

Kako bi potvrdili da nije bilo dodatnih razgradnih produkata provedena je i analiza čistoće pikova. Spektralna čistoća pikova analizirana je na kromatogramima maksimalnih apsorbanacija u spektralnom rasponu 190 – 800 nm snimanom tijekom analize.

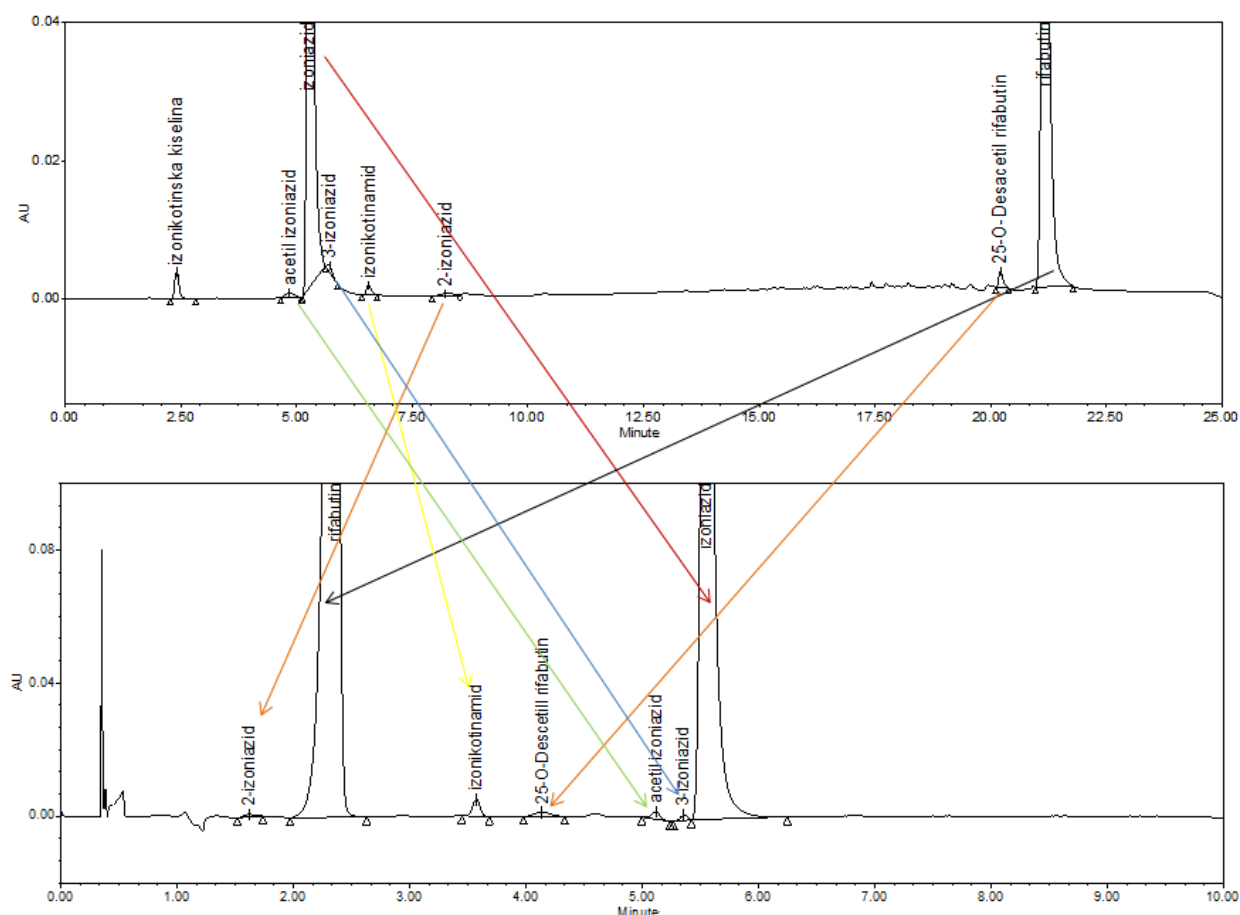
Svi izmjereni kutovi čistoće pika bili su manji od praga odbacivanja (tablica 24).

Tablica 24. Rezultati kontrole čistoće pikova

Uvjet	Analiti	Kut čistoće pika	Prag odbacivanja
Kontrolni uzorak	izoniazid	0,449	0,746
	rifabutin	0,132	0,314
Kisela hidroliza	izoniazid	0,696	0,788
	rifabutin	0,177	0,406
Lužnata hidroliza	izoniazid	0,400	0,753
	rifabutin	0,381	1,150
Oksidacija	izoniazid	0,226	0,408
	rifabutin	0,363	0,413

4.3. Ortogonalnost

Ortogonalnost dviju metoda evaluirana je usporedbom redoslijeda eluiranja poznatih onečišćenja. Usporedba je prikazana na slici 27.



Slika 27. Ortogonalnost UHPLC (kromatogram iznad) i SFC metode (kromatogram ispod) za određivanje izoniazida, rifabutina i srodnih spojeva iz FDC formulacije

Ortogonalnost je potvrđena zamijenjenim redoslijedom eluiranja izoniazida i rifabutina, kako je i očekivano s obzirom na polarnost dvaju sustava. Usporedbom kromatograma vidljivo je kako 2-izoniazid kao najnepolarnije izoniazidno onečišćenje, i najjače zadržano na UHPLC koloni, eluira ispred izoniazida na SFC sustavu. Nakon 2-izoniazida slijedi izonikotinamid, koji je UHPLC metodom eluirao prije 2-izoniazida, a nakon izoniazida. Ortogonalnost potvrđuje i položaj 3-izoniazida koji je također zamijenio redoslijed s izoniazidom te na SFC kromatografu eluira ispred izoniazida. Iako je postignuto razdvajanje na osnovici, vremena

zadržavanja za izoniazid i 3-izoniazid vrlo su bliska prema obje metode. Jedino acetil izoniazid nije eluirao u skladu s očekivanjima budući da prema obje metode eluira ispred izoniazida. Ipak, SFC omogućava njegovo bolje razlučivanje od izoniazida. Što se tiče rifabutina i 25-O-desacetil rifabutina, uočava se zamjena vremena zadržavanja kod SFC eluiranja u odnosu na UHPLC. Općenito se može zaključiti da je razdvajanje sličnih analita bolje SFC metodom iako je vrijeme analize kraće. S druge strane, moguće je uočiti da je razdvajanje izoniazida i rifabutina značajno lošije SFC metodom. U ovom slučaju to predstavlja prednost, jer omogućava kraće vrijeme analize za oblike s više aktivnih komponenti jako različitih karakteristika.

4.4. Kompatibilnost

Kompatibilnost izoniazida i rifabutina ispitana je analizom onečišćenja kompaktiranih smjesa. Aktivne tvari pomiješane su u omjeru 1:1, smjesa je promiješana u tarioniku te kompaktirana.

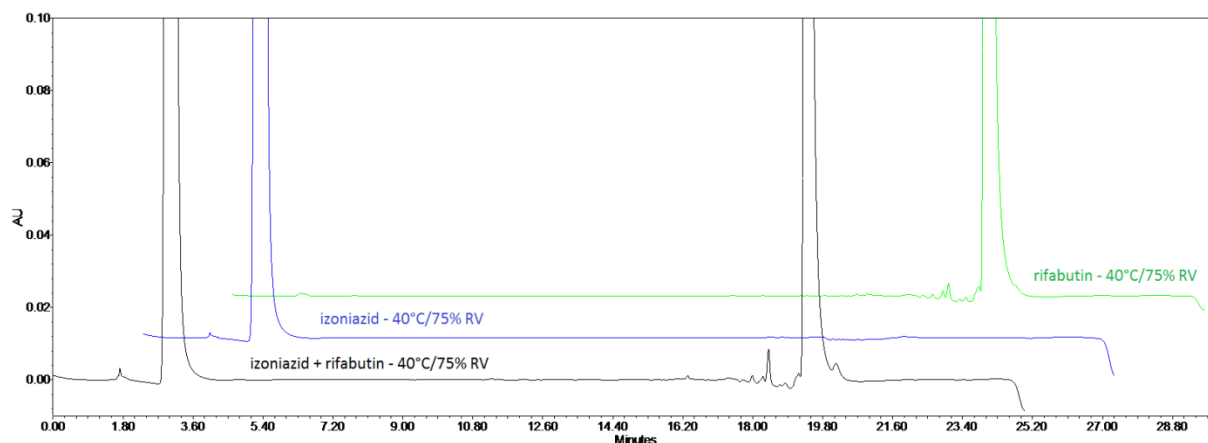
Uz dvokomponentnu smjesu, pripremljene su i trokomponentne smjese. Smjese dviju aktivnih tvari s jednom pomoćnom tvari pripremljene su s ciljem ispitivanja utjecaja pomoćnih tvari.

Nakon izuzimanja s uvjeta čuvanja, uzorci su pregledani. Vizualna usporedba s početnim izgledom smjese nije pokazala uočljivu razliku. Svi uzorci analizirani su dvjema ortogonalnim metodama. Kompatibilnost je evaluirana pregledom i usporedbom kromatograma te izračunom nastalih razgradnih produkata.

4.4.1. Određivanje UHPLC metodom

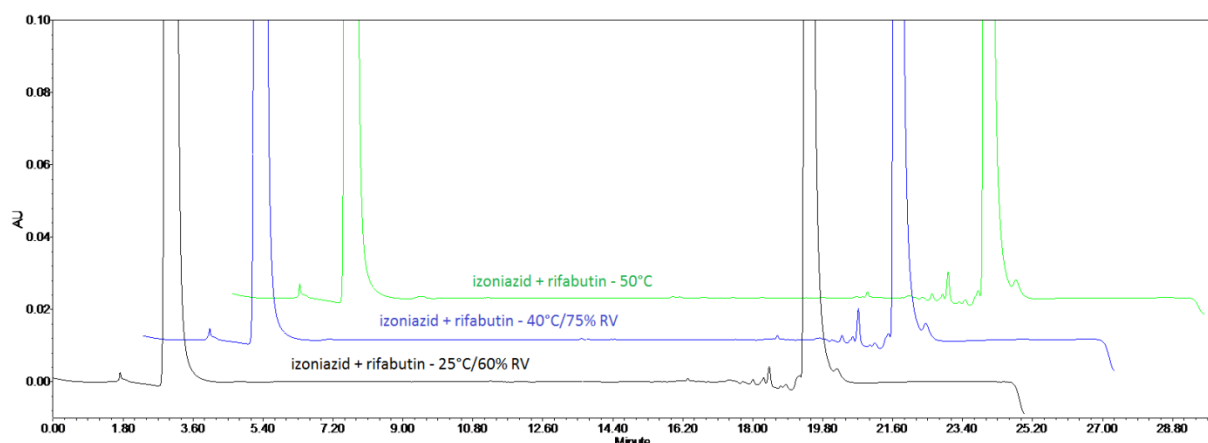
Kompatibilnost izoniazida i rifabutina

Uzorak dvokomponentne smjese, čuvan 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV (uzorak 4, tablica 1) uspoređen je s uzorcima pojedinačnih aktivnih tvari, čuvanim mjesec dana na istim uvjetima čuvanja (uzorak 1 i 2, tablica 1). Uočen je porast dva onečišćenja (slika 28). Prvi pik, s vremenom zadržavanja 18,9 minuta (RRT 0,95), prisutan je i kod uzorka rifabutina s istih uvjeta, ali u manjoj količini (0,2 % prema 0,3 % u dvokomponentnom uzorku). Drugo onečišćenje s vremenom zadržavanja 20,6 minuta (RRT 1,04) nije uočeno kod pojedinačnih aktivnih tvari, a određeno je u količini od 0,6 %. Pregledom kromatograma snimljenih u rasponu 210 – 499 nm, prikupljenih za analizirane uzorke, potvrđeno je da nije bio dodatnih pikova na valnim duljinama različitim od valne duljine detekcije propisane metodom.



Slika 28. Usporedba smjese aktivnih tvari (crni kromatogram) s izoniazidom (plavi kromatogram) i rifabutinom (zeleni kromatogram) čuvanim 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV

Uzorci dvokomponentne smjese s različitih uvjeta, 25 °C i 60 % RV (uzorak 3), 40 °C i 75 % RV (uzorak 4) i 50 °C (uzorak 5) uspoređeni su međusobno (slika 29). Na svim uvjetima uočen je porast ista dva onečišćenja, RRT 0,95 i RRT 1,04.



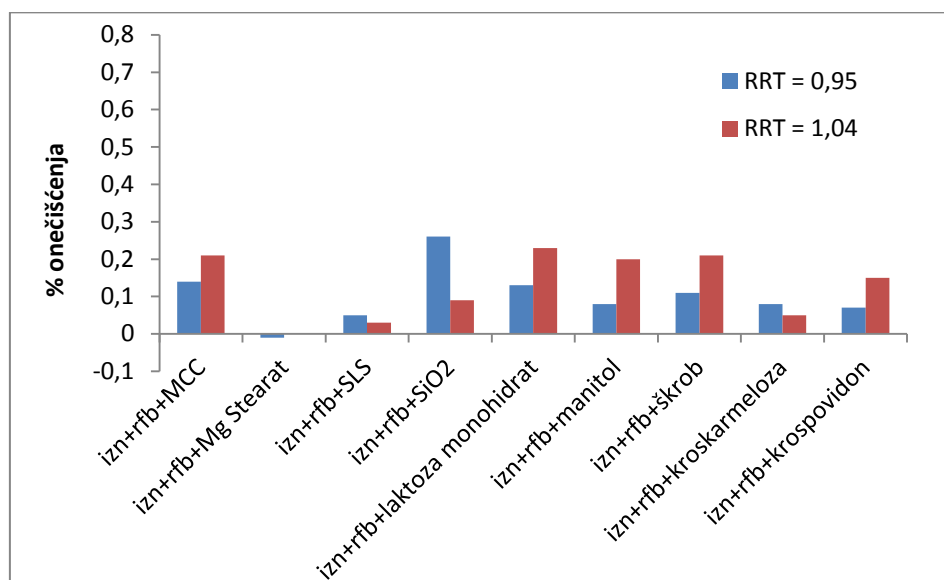
Slika 29. Usporedba dvokomponentne smjese s tri uvjeta čuvanja, 25 °C i 60 % RV (crni kromatogram), 40 °C i 75 % RV (plavi kromatogram) i 50 °C (zeleni kromatogram)

Očekivano, manje rigorozni uvjeti (25 °C i 60 % RV) rezultirali su i nižim količinama onečišćenja, 0,2 % za onečišćenje RRT 0,95 i 0,4 % za onečišćenje RRT 1,04. Na uvjetu 40 °C i 75 % RV onečišćenje RRT 0,95 naraslo je do 0,3 %, a onečišćenje RRT 1,04 do 0,6 %. U uzorku s uvjeta bez vlage (50°C) onečišćenja su narasla do 0,2 % za prvi pik i 0,5 % za drugi. Iako je temperatura viša, kod ovog uvjeta nije bilo vlage, što bi mogao biti razlog nešto nižih izmjerenih rezultata budući da vlaga može pospješiti brzinu reakcije razgradnje.

Za uzorke kompatibilnosti provedena je analiza čistoće pikova. Kut čistoće pikova bio je manji od praga odbacivanja (tablica 25) za sve kromatograme.

Utjecaj pomoćnih tvari na stabilnost formulacije

Analizom uzoraka 6 – 14 iz tablice 1 ispitan je utjecaj pomoćnih tvari na razgradnju, odnosno na stabilnost aktivnih komponenti. Svi uzorci čuvani su 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV kako bi se potaknule interakcije. Trokomponentne smjese (izoniazid + rifabutin + pomoćna tvar) evaluirane su usporedbom s dvokomponentnom smjesom izoniazida i rifabutina (uzorak 4). Razlika nastalih onečišćenja pripisana je utjecaju pomoćne tvari. Količina pojedinog onečišćenja izračunata je kao razlika u odnosu prema istom onečišćenju u uzorku 4 te prikazana je grafom na slici 30.



Slika 30. Grafički prikaz udjela onečišćenja u trokomponentnim smjesama izoniazida (izn), rifabutina (rfb) i pomoćne tvari (MCC/Mg stearat/SLS/SiO₂/laktoza monohidrat/manitol/škrob/kroskarmeloza/krosповidon) nakon izlaganja 1 mjesec na 40°C i 75 % RV

I kod ovih uzoraka uočena su dva glavna onečišćenja, ista kao i ranije uočena kod smjesa dviju aktivnih komponenti, RRT 0,95 i 1,04. Onečišćenje RRT 0,95 ima najveći porast u smjesi sa silicijevim dioksidom, i to u količini 0,26 %. Istovremeno, porast onečišćenja RRT 1,04 bio je manji od 0,1 %, ali na kromatogramu tog uzorka uočen je i dodatni pik na 8,3 minuta u količini 0,16 %. Kombinacije s manitolom, škrobom i laktozom su bile najnepovoljnije za onečišćenje RRT 1,04 budući da je porast za sva tri uzorka bio 0,2 %.

Kod uzorka s Mg stearatom nije bilo porasta onečišćenja u odnosu na kontrolni uzorak koji sadrži samo izoniazid i rifabutin (uzorak 4).

Tablica 25. Analiza čistoće pikova u studiji kompatibilnosti

Uzorci studije kompatibilnosti	izoniazid		rifabutin	
	Kut spektralne čistoće	Prag odbacivanja	Kut spektralne čistoće	Prag odbacivanja
1. izn – 40°C i 75 % RV	0,032	0,448	/	/
2. rfb – 40°C i 75 % RV	/	/	0,068	0,303
3. izn+rfb – 25°C i 60 % RV	0,040	0,500	0,049	0,316
4. izn+rfb – 40°C i 75 % RV	0,045	0,531	0,055	0,315
5. izn+rfb – 50°C	0,041	0,473	0,072	0,319
6. izn+rfb+MCC – 40°C i 75 % RV	0,047	0,517	0,054	0,314
7. izn+rfb+Mg stearat – 40°C i 75 % RV	0,042	0,507	0,049	0,314
8. izn+rfb+SLS – 40°C i 75 % RV	0,045	0,523	0,047	0,316
9. izn+rfb+SiO ₂ – 40°C i 75 % RV	0,048	0,593	0,048	0,323
10. izn+rfb+laktoza x H ₂ O – 40°C i 75 % RV	0,028	0,726	0,204	0,386
11. izn+rfb+manitol – 40°C i 75 % RV	0,050	0,708	0,136	0,366
12. izn+rfb+škrob – 40°C i 75 % RV	0,059	0,827	0,142	0,375
13. izn+rfb+kroškarmeloza – 40°C i 75 % RV	0,037	0,525	0,078	0,317
14. izn+rfb+krospovidon – 40°C i 75 % RV	0,041	0,494	0,073	0,320

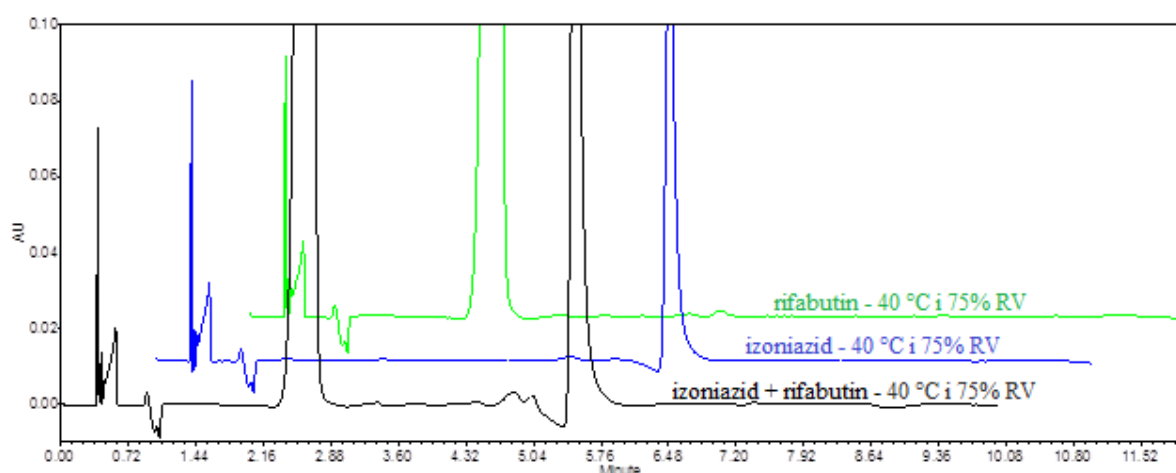
Analiza čistoće pikova i pregled kromatograma prikupljenih u spektru valnih duljina od 200 do 499 nm potvrdili su da nema dodatnih razgradnih produkata (tablica 25).

Iako je analiza kompatibilnosti pomoćnih tvari otkrila manje i više kompatibilne pomoćne tvari, ipak ni jedna od ispitanih nije prouzrokovala značajnu razgradnju aktivnih tvari.

4.4.2. Određivanje SFC metodom

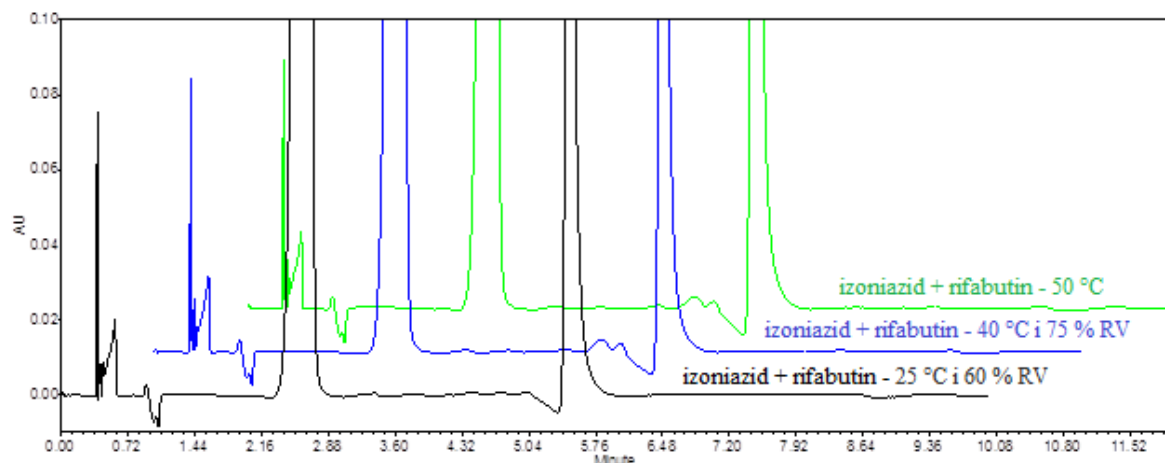
Kompatibilnost izoniazida i rifabutina

Kompakti dviju aktivnih tvari analizirani su ortogonalnom SFC metodom. Kao i kod analiza UHPLC metodom, kromatogram uzorka 4 (smjesa izoniazida i rifabutina izloženi uvjetima 40 °C i 75 % RV) uspoređen je s uzorcima pojedinačnih aktivnih tvari čuvanih na istim uvjetima (uzorak 1 i 2 iz tablice 1). Kromatogrami su prikazani na slici 31. Kod uzorka smjese aktivnih tvari uočen je porast dva nepoznata onečišćenja. Prvi pik, s vremenom zadržavanja na 4,8 minute (RRT 0,88 prema aktivnoj tvari koja eluira posljednja, izoniazidu) bio je u količini 0,5 %. Ni jedna od aktivnih tvari, čuvana na istom uvjetu, nije imala onečišćenje s istim vremenom zadržavanja. Drugo onečišćenje eluiralo je sa zadržavanjem na 5,0 minute i RRT 0,92 (prema izoniazidu). Određeno je u količini 0,3 % i s porastom od 0,14 % u odnosu na količinu određenu u uzorku rifabutina. Količine i broj nastalih onečišćenja odgovaraju rezultatima dobivenim analizom UHPLC metodom za iste uzorke. Pretpostavljeno je da analit s RRT 0,92 s obzirom na količinu odgovara analitu relativnog vremena zadržavanja 0,95 kod UHPLC analize (0,3 %). Prvi analit s RRT 0,88 bi u tom slučaju odgovarao onečišćenju uočenom na RRT 1,04 kod UHPLC analize. Rezultati ovog onečišćenja prema dvije metode za uzorak smjese bili su u skladu (0,61 % i 0,53 %). Malu razliku (0,08 %) moguće je pripisati nesigurnosti određivanja. SFC metodom oba su onečišćenja dobro odvojena od pripadajuće aktivne tvari te im je u odnosu na UHPLC zamijenjen redoslijed eluiranja.



Slika 31. Usporedba smjese aktivnih tvari (crni kromatogram) s izoniazidom (plavi kromatogram) i rifabutinom (zeleni kromatogram) čuvanim 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV

Nadalje, uspoređeni su uzorci smjese s različitih uvjeta čuvanja, 25 °C i 60 % RV (uzorak 3), 40 °C i 75 % RV (uzorak 4) i 50 °C (uzorak 5). Kromatogrami ovih uzoraka prikazani su na slici 32.



Slika 32. Usporedba dvokomponentne smjese izoniazida i rifabutina s tri uvjeta čuvanja, 25 °C i 60 % RV (crni kromatogram), 40 °C i 75 % RV (plavi kromatogram) i 50 °C (zeleni kromatogram)

Uzorak s uvjeta 25 °C i 60 % RV sadržavao je 0,05 % onečišćenja RRT 0,88 i 0,04 % onečišćenja RRT 0,92. Na uvjetu 40 °C i 75 % RV zabilježen je značajan porast onečišćenja RRT 0,88 (do 0,5 %). Onečišćenje RRT 0,92 određeno je u količini 0,3 %. Slično je određeno i u uzorku s uvjeta bez vlage (50°C), 0,5 % za prvo onečišćenje i 0,3 % za drugo.

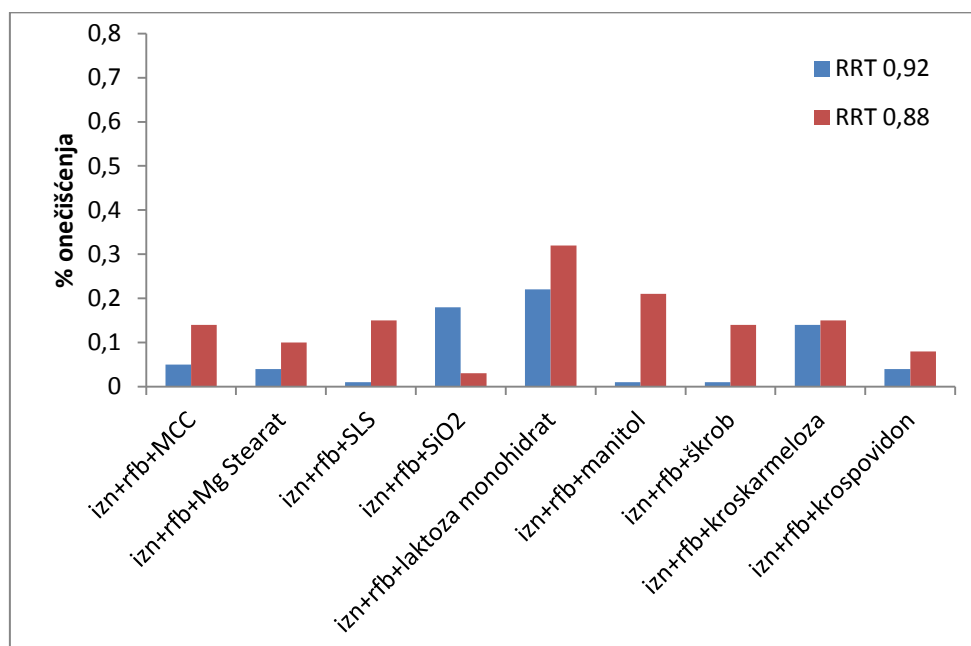
Malu razliku u određenim količinama, koja se može uočiti između rezultata UHPLC i SFC metoda, osobito kod uzorka s uvjeta 25 °C i 60 % RV, moguće je objasniti specifičnošću uzoraka. Analizirani uzorci nisu primjeri gotove formulacije, stoga je nesigurnost rezultata nešto veća. Dodatno, SFC metoda ima nešto slabiju osjetljivost pa se kod niskih koncentracija, kakve su prisutne kod uzorka s uvjeta 25 °C i 60 % RV, može očekivati i veća nesigurnost određivanja. Ipak, prema obje analize uočena su samo dva razgradna produkta.

Pregledom kromatograma u spektralnom rasponu 210 – 499 nm, prikupljenim za analizirane uzorke, potvrđeno je da nije bio dodatnih pikova na valnim duljinama različitim od valne duljine detekcije propisane metodom, a kut čistoće pikova je bio manji od praga odbacivanja (tablica 26).

Utjecaj pomoćnih tvari na stabilnost formulacije

Kompakti trokomponentnih smjesa, uzorci 6 – 14 (tablica 1), također su analizirani SFC metodom. Rezultati ove analize uspoređeni su s uzorkom koji je sadržavao samo izoniazid i rifabutin, bez dodatka pomoćnih tvari. Količina pojedinog onečišćenja izračunata je kao razlika u odnosu prema istom onečišćenju u uzorku 4. Tako je procijenjen utjecaj svake pojedinačne pomoćne tvari (slika 33).

Iako značajnija razgradnja u nijednoj trokomponentnoj smjesi nije uočena, i u ovim uzorcima detektirana su dva glavna onečišćenja, RRT 0,88 i RRT 0,92. Oba su uočena i kod smjese koja nije sadržavala pomoćne tvari (uzorak 4). Najmanje prikladna pomoćna tvar bila je laktoza monohidrat, uz porast onečišćenja do 0,3 %. Laktoza monohidrat je i prema UHPLC analizi jedna od manje prikladnih pomoćnih tvari.



Slika 33. Grafički prikaz udjela onečišćenja u trokomponentnim smjesama izoniazida (izn), rifabutina (rfb) i pomoćne tvari (MCC/Mg stearat/SLS/SiO₂/laktoza monohidrat/manitol/škrob/kroskarmeloza/krospovidon) nakon izlaganja 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV

Prisustvo silicijevog dioksida u smjesi utjecalo je na porast onečišćenja s RRT 0,92, slično kako je uočeno kod UHPLC metode za onečišćenje 0,95. Onečišćenje RRT 0,88 dodatno je značajnije poraslo i u uzorku koji je uz aktivne tvari sadržavao manitol. Rezultati pokazuju sličan trend porasta kao i rezultati analize UHPLC metodom.

Izostanak koeluiranja razgradnih produkata potvrđen je analizom spektralne čistoće. Kut spektralne čistoće pika bio je niži od praga odbacivanja (tablica 26).

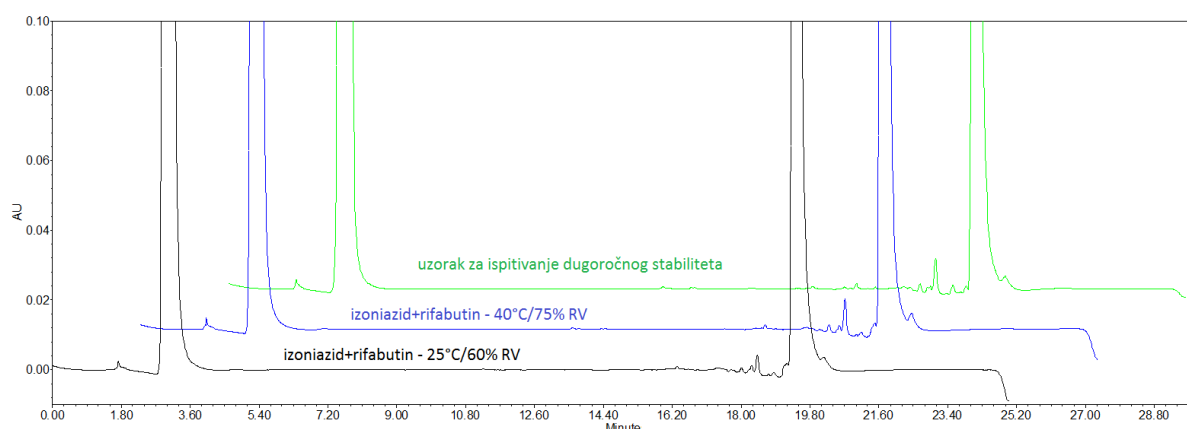
Tablica 26. Analiza čistoće pikova u studiji kompatibilnosti

Uzorci studije kompatibilnosti	izoniazid		rifabutin	
	Kut spektralne čistoće	Prag odbacivanja	Kut spektralne čistoće	Prag odbacivanja
1. izn – 40°C i 75 % RV	0,164	5,076	/	/
2. rfb – 40°C i 75 % RV	/	/	0,060	0,791
3. izn+rfb – 25°C i 60 % RV	0,142	5,505	0,059	0,884
4. izn+rfb – 40°C i 75 % RV	0,153	5,337	0,060	0,835
5. izn+rfb – 50°C	0,137	3,560	0,062	0,922
6. izn+rfb+MCC – 40°C i 75 % RV	0,186	6,675	0,064	0,924
7. izn+rfb+Mg stearat – 40°C i 75 % RV	0,185	6,256	0,076	0,898
8. izn+rfb+SLS – 40°C i 75 % RV	0,161	4,441	0,053	0,832
9. izn+rfb+SiO ₂ – 40°C i 75 % RV	0,144	4,705	0,067	0,862
10. izn+rfb+laktoza x H ₂ O – 40°C i 75 % RV	0,155	5,030	0,065	0,840
11. izn+rfb+manitol – 40°C i 75 % RV	0,158	4,689	0,056	0,862
12. izn+rfb+škrob – 40°C i 75 % RV	0,187	5,040	0,066	0,855
13. izn+rfb+kroškarmeloza – 40°C i 75 % RV	0,175	5,249	0,067	0,837
14. izn+rfb+krospovidon – 40°C i 75 % RV	0,143	4,367	0,057	0,868

4.4.3. Rezultati dugoročne stabilnosti smjese izoniazida i rifabutina

Uzorci kompatibilnosti otkrili su onečišćenja koja bi mogla nastati u novoj FDC formulaciji. Iako značajnija razgradnja nije uočena, mora se naglasiti da su uzorci čuvani na uvjetima ubrzanog starenja. Kako bi utvrdili stvarni potencijal razgradnje, uzorak smjese za kapsuliranje rifabutin kapsula s tržišta, kojem je dodan izoniazid u omjeru 1:1 prema rifabutinu, čuvan je na sobnim uvjetima kroz 18 mjeseci.

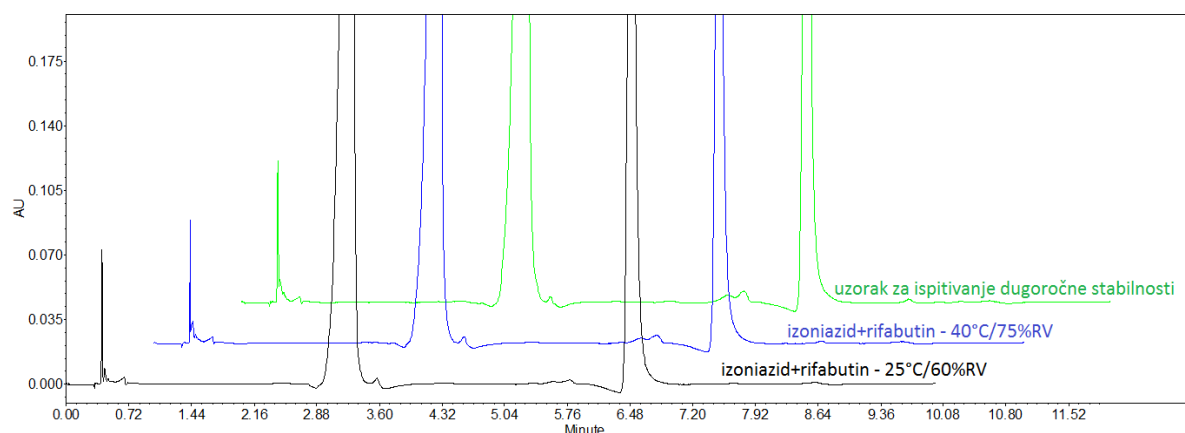
Osim dva nepoznata onečišćenja koja su ranije uočena na uzorcima kompatibilnosti, analiza ovog uzorka nije pokazala dodatne razgradne produkte (slika 34). Količina onečišćenja u uzorku starom 18 mjeseci bila je nešto niža za onečišćenje RRT 0,95 (0,4 %) u odnosu na smjesu izoniazida i rifabutina, čuvanu 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV (0,6 %). Onečišćenje RRT 1,04 također je bilo niže (0,1 %) od rezultata određenim na kompaktima. Iz uzorka je određen sadržaj izoniazida od 103,5 % i rifabutina 102,1 %.



Slika 34. Usporedba kromatograma s dugoročnih uvjeta (18 mjeseci na sobnim uvjetima, (zeleni kromatogram)) sa smjesom aktivnih tvari čuvanom 1 mjesec na 25 °C i 60 % RV (crni kromatogram) i smjesom aktivnih tvari čuvanom 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV (plavi kromatogram); analizirano UHPLC tehnikom primjenom uvjeta opisanih u poglavlju 4.1.10.

Uzorak čuvan kroz 18 mjeseci na sobnim uvjetima ispitan je i SFC metodom. Ni ovom metodom nije uočena dodatna razgradnja (slika 35). Onečišćenje RRT 0,88 je bilo na razini 0,2 %, a onečišćenje RRT 0,92 na razini 0,4 %. Sadržaj izoniazida je bio 103,9 % a rifabutina 100,8 %. Rezultati određivanja SFC metodom bili su usporedni rezultatima UHPLC

određivanja i unutar zahtjeva monografija za tablete izoniazida i kapsule rifabutina američke farmakopeje.³²



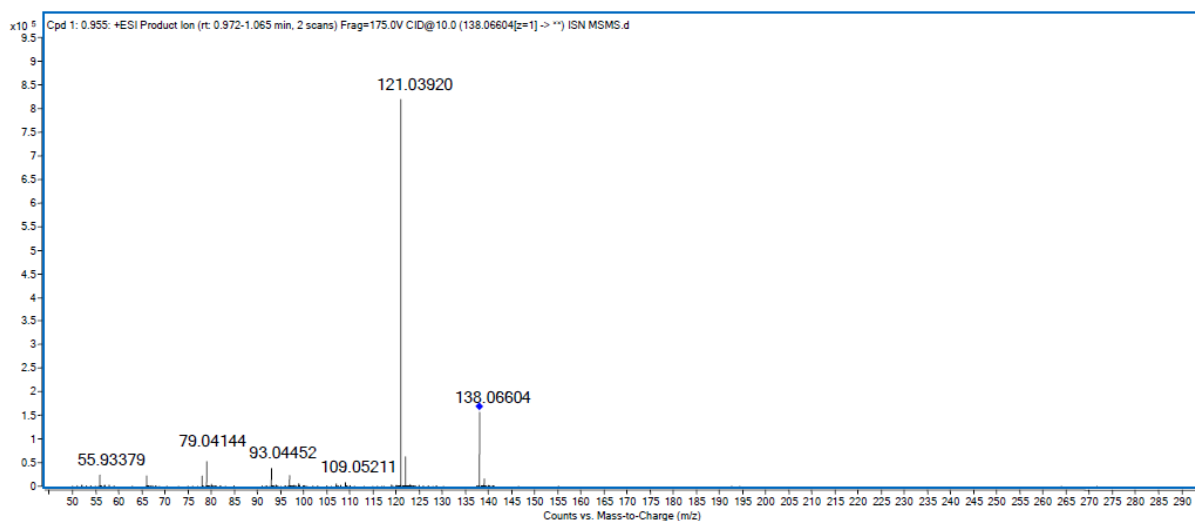
Slika 35. Usporedba kromatograma s dugoročnih uvjeta (18 mjeseci na sobnim uvjetima, (zeleni kromatogram)) sa smjesom aktivnih tvari čuvanom 1 mjesec na 25 °C i 60 % RV (crni kromatogram) i smjesom aktivnih tvari čuvanom 1 mjesec na 40 °C i 75 % RV (plavi kromatogram); analizirano SFC tehnikom primjenom uvjeta opisanih u poglavlju 4.2.7.

4.4.4. Određivanje nepoznatih onečišćenja spektrometrijom masa

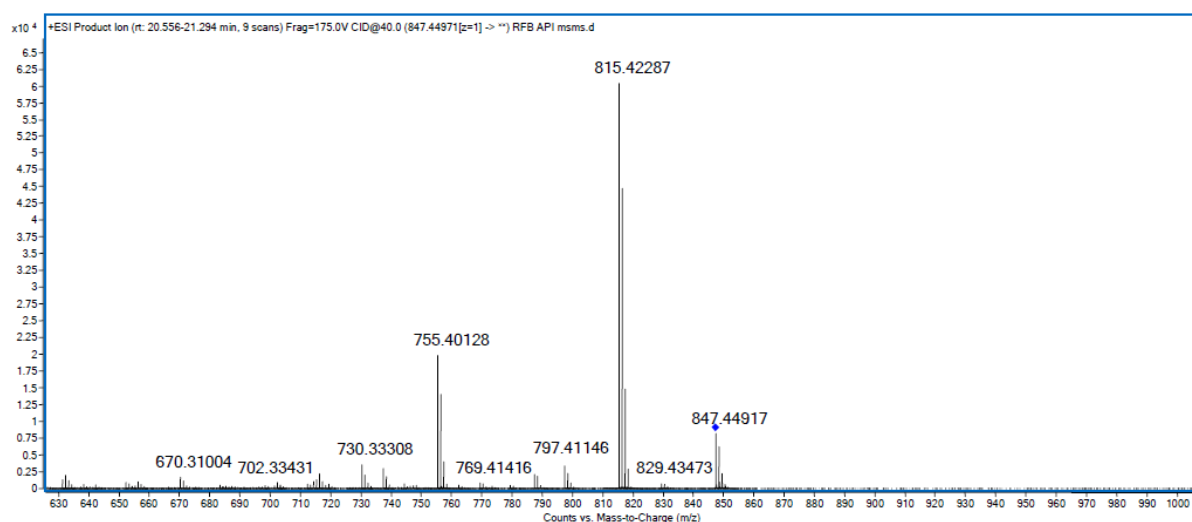
Dva onečišćenja, RRT 0,95 i RRT 1,04, uočena u uzorcima kompatibilnosti, karakterizirana su spektrometrijom masa (MS) i tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS).

U svrhu identifikacije navedenih onečišćenja prvo je bilo potrebno provesti MS i MS/MS analize za izoniazid i rifabutin. U pozitivnom načinu snimanja, s kolizijskom energijom od 10 eV, za izoniazid je dobivena m/z vrijednost molekulskog iona 138,0660 $[M+H]^+$, a glavni fragment imao je m/z vrijednost od 121,0392 $[M+H]^+$, što je rezultat gubitka NH_3 skupine iz molekule izoniazida (slika 36a).

Rifabutin je sniman s kolizijskom energijom od 40 eV. Potvrđen je molekulski ion čija je m/z vrijednost iznosila 847,4494 $[M+H]^+$ te fragmenti s m/z 815,4229 i 755,4013 koji ukazuju na gubitak CH_3OH te H_2O i CH_2CO iz molekule rifabutina (slika 36b). MS/MS fragmentacija odgovarala je jednom od ranije objavljenih fragmentacijskih puteva iz studiji Prasad i suradnika.¹⁶⁶



a)

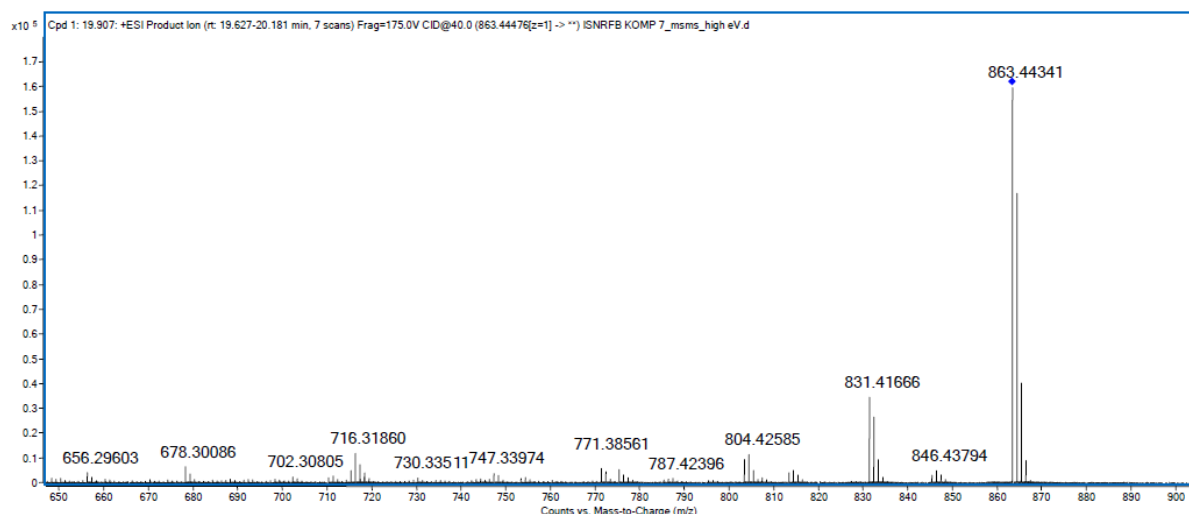


b)

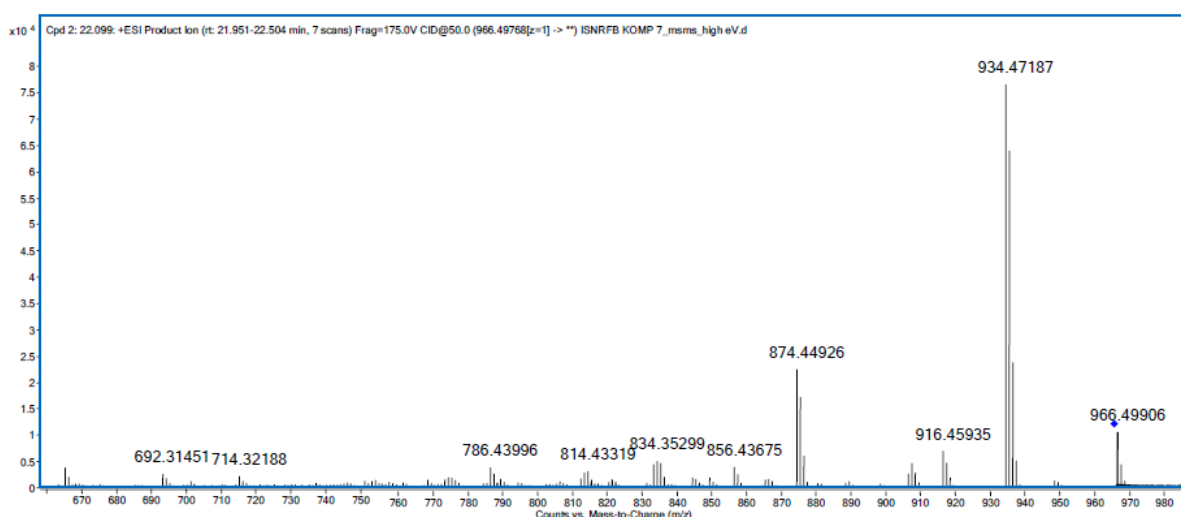
Slika 36. MS/MS spektri izoniazid (a) i rifabutin (b)

Na isti način kao za izoniazid i rifabutin, snimljeni su MS i MS/MS spektri za dva nepoznata onečišćenja uočena u uzorcima kompatibilnosti. Za onečišćenje RRT 0,95 glavni signal uočen je pri m/z 863,4434 $[M+H]^+$, a za onečišćenje RRT 1,04 pri m/z 966,4984 $[M+H]^+$. Onečišćenja su podvrgnuta kolizijskim energijama u rasponu od 10 do 50 eV u razmacima od po 10 eV.

Za molekularni ion 863,4434 $[M+H]^+$ MS/MS analizom dobiveni su fragmenti s m/z vrijednostima 831,4167, koji odgovara gubitku CH_3OH , i 716,3186 koji odgovara dodatnom gubitku $C_6H_{13}NO$ (slika 37a). Prvi dio fragmentacije analogan je fragmentacijskom putu rifabutina dok u drugom dijelu dolazi do fragmentacije šesteročlanog piperidinskog prstena.



a)



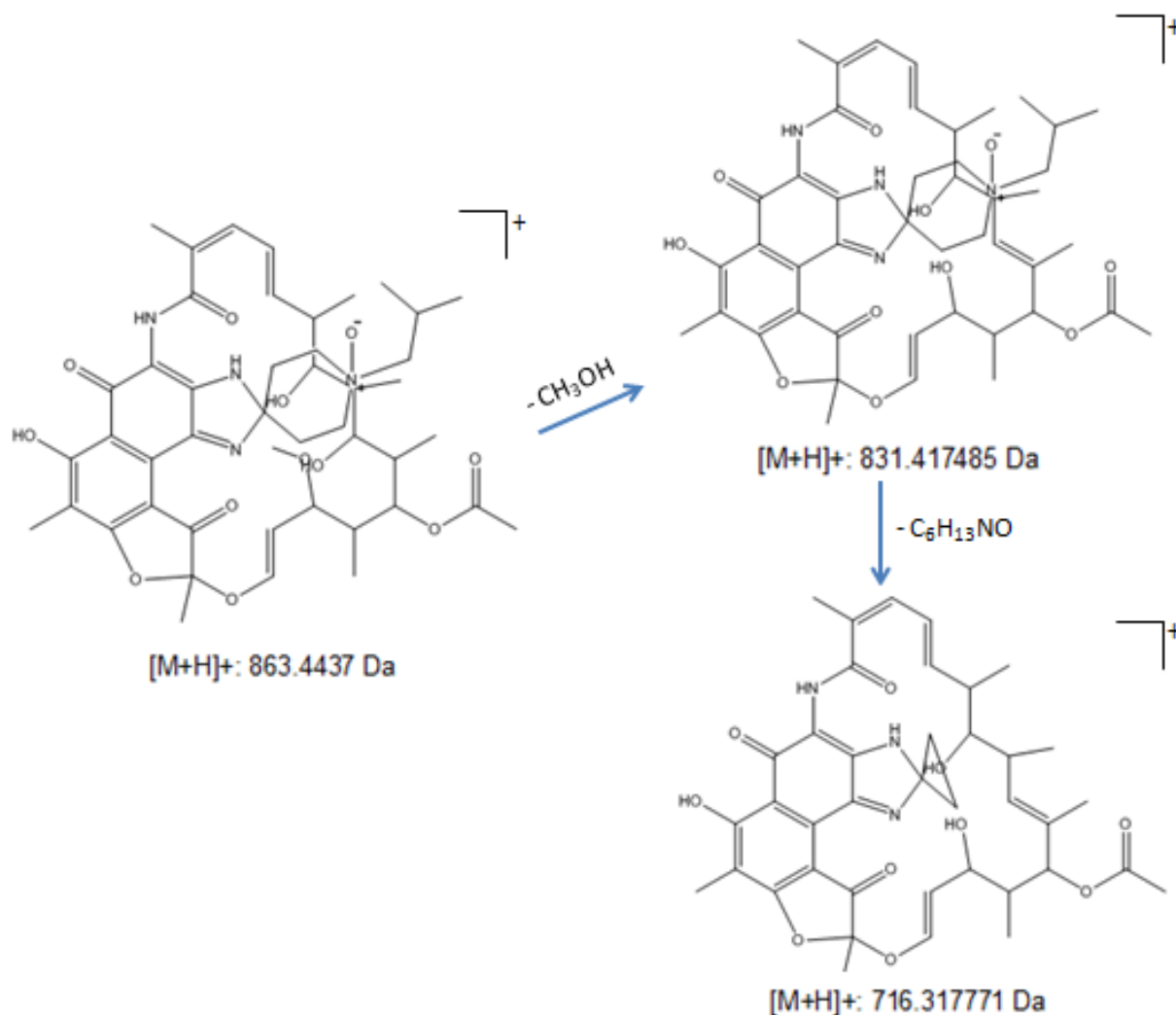
b)

Slika 37. MS/MS spektri za nepoznate pikove RRT 0,95 (a) i RRT 1,04 (b)

Uz pomoć generatora molekulske formule (engl. *Molecular Formula Generator*, MFG), u sklopu računalnog programa koji pokreće spektrometar masa, predložen je elementarni sastav za ispitivani analit. Molekulska formula $C_{46}H_{62}N_4O_{12}$ predložena je s greškom < 3 ppm (0,01 ppm) između teoretske i eksperimentalno dobivene mase.

Molekulska formula, kao i razlika mase molekulskog iona u odnosu na masu molekulskog iona rifabutina koja je iznosila 16, upućuju na to da bi nepoznato onečišćenje moglo biti *N*-oksid rifabutina (slika 38). Pretpostavljeno je da se oksidacija događa na tercijarnom aminu piperidinskog prstena. Nastajanje *N*-oksida na tercijarnom aminu je znatno lakše i učestalije no što je to slučaj za sekundarne i primarne amine, a reakcija je i pH ovisna.⁷⁵ Iz dobivenih

rezultata studije kompatibilnosti moguće je zaključiti da prisustvo izoniazida ima mali utjecaj na porast ovog razgradnog produkta.



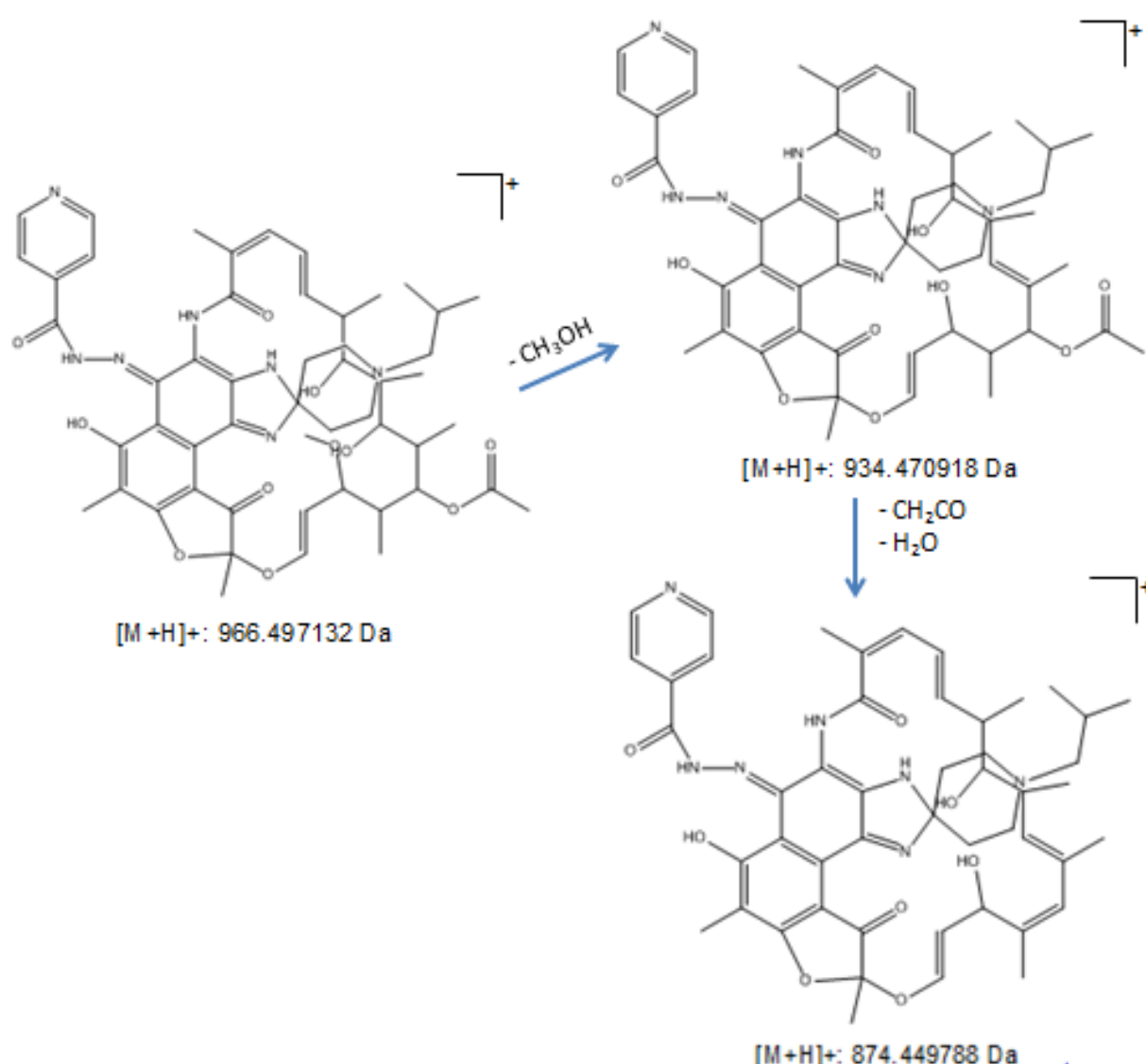
Slika 38. Fragmentacijski put analita s RRT 0,95

Fragmentacija molekulskog iona m/z 966,4984 [M+H]⁺ drugog nepoznatog onečišćenja, RRT 1,04, također je provedena primjenom MS/MS tehnike. Korištene su kolizijske energije u rasponu od 10 eV do 40 eV u razmacima od 10 eV. Za ovaj analit uočeni su fragmenti s m/z vrijednostima 934,4719 koji odgovara gubitku CH₃OH skupine, 916,4594 koji odgovara gubitku H₂O i 874,4493 koji odgovara gubitku CH₂CO (slika 37b).¹⁶⁷

Prema MFG predložena je molekulska formula C₅₂H₆₇N₇O₁₁ s razlikom < 3 ppm (samo 1,36 ppm) između eksperimentalne i teoretske vrijednosti mase.

U odnosu na masu molekulskog iona rifabutina, nepoznato onečišćenje ima masu veću za 119, što dovodi do pretpostavke da je onečišćenje rezultat intramolekularne kondenzacije primarnog amina izoniazida na karbonilnu grupu rifabutina. U reakciji nastaje hemiaminal uz eliminaciju vode (slika 39).¹⁶⁷ Ovakve reakcije odvijaju se u širokom pH rasponu pa se podešavanjem pH formulacije nije moguće specifično djelovati na smanjivanje brzine reakcije razgradnje kao što je to moguće za prvo onečišćenje.

Uočeni fragmenti pokazuju mehanizam fragmentacije sličan fragmentaciji rifabutina pri čemu nastaju fragmenti mase uvećane za 119 u odnosu na fragmente rifabutina.



Slika 39. Fragmentacijski put analita s RRT 1,04

4.5. *In vitro* oslobađanje

Ranije objavljivane studije pokazale su kako zbog nekompatibilnosti dolazi do razgradnje rifamicinskih antibiotika u prisustvu izoniazida u kiselom mediju kakav je prisutan u želucu.⁷⁻⁹

Kako bi procijenili stabilnost FDC formulacije koja sadrži izoniazid i rifabutin, ispitano je *in vitro* oslobađanje prema metodi iz USP monografije za kapsule rifabutina,³⁴ u kiselom mediju.

Metoda propisuje oslobađanje rifabutina iz kapsula u 900 mL 0,01 mol L⁻¹ HCl USP aparaturom 1, uz okretanje košarica od 100 okreta po minuti i uzorkovanje u 45. minuti.

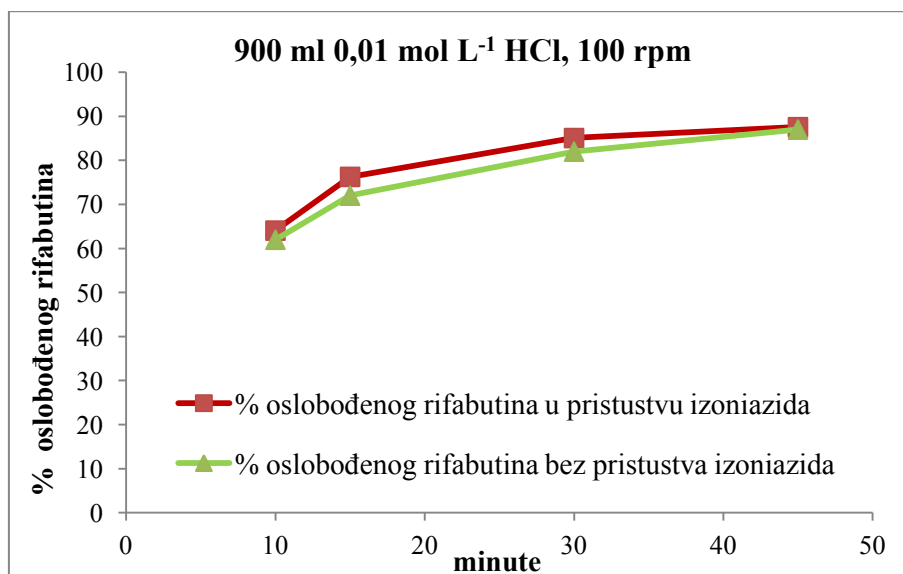
Ispitano je oslobađanje komercijalno dostupnih kapsula rifabutina (150 mg) sa i bez prisustva izoniazida. Na taj način procijenjen je utjecaj izoniazida na sadržaj i oslobađanje rifabutina. Oba eksperimenta napravljena su na 12 jedinica (tablica 27).

Za potrebe analize profila oslobađanja, uzorkovane su dodatne vremenske točke, 10., 15. i 30. minuta, uz vraćanje medija i korekciju za vraćeni medij u izračunu oslobođene količine lijeka.

U ispitivanju s obje aktivne tvari izoniazid je dodan u posude u količini jednakoj dozi rifabutina u kapsulama, 150 mg. Prije i nakon dodatka izoniazida izmjeren je pH medija. Dodatak izoniazida nije utjecao na promjenu pH. Konačna koncentracija obje aktivne tvari u posudama je bila 0,17 mg mL⁻¹. Koncentracija aktivnih supstanci bila je unutar radnog područja za UHPLC metodu, a s obzirom da je medij u kojem je ispitano oslobađanje u potpunosti vodeni medij, određivanje UHPLC metodom bilo je prikladnije nego SFC metodom. Uzorci su analizirani na 280 nm kako je navedeno u USP monografiji, ali je sniman i spektar u rasponu 210 – 400 nm. Pregledom kromatograma u navedenom spektralnom rasponu nisu uočeni pikovi koji bi upućivali na razgradnju aktivnih tvari.

Tablica 27. Rezultati *in vitro* oslobađanja rifabutina u prisustvu i bez izoniazida

oslobađanje rifabutina iz kapsule rifabutina																
Vrijeme / minute	oslobodeno / %															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	< % >	min.	max.	RSD / %
10	67	51	69	47	46	52	67	85	68	65	61	71	62	46	85	18,6
15	75	61	78	60	58	65	80	83	79	78	72	78	72	58	83	12,4
30	79	70	77	86	71	84	85	88	84	84	85	85	82	70	88	7,4
45	83	76	84	88	77	87	87	90	88	88	91	87	85	76	91	5,7
sadržaj izoniazida u pokusu u kojem je u posude dodan izoniazid																
Vrijeme / minute	oslobodeno / %															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	< % >	min.	max.	RSD / %
10	101	100	101	101	101	102	99	100	100	101	100	100	101	99	102	0,8
15	102	101	101	102	102	102	100	100	100	101	101	101	101	100	102	0,7
30	102	101	101	102	101	102	100	100	100	101	101	101	101	100	102	0,7
45	102	101	101	101	101	102	100	100	100	101	101	101	101	100	102	0,6
oslobađanje rifabutina iz kapsula rifabutina u pokusu u kojem je u posude dodan izoniazid																
Vrijeme / minute	oslobodeno / %															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	< % >	min.	max.	RSD / %
10	55	70	55	58	69	78	65	70	60	53	65	68	64	53	78	12,2
15	73	76	72	73	80	84	82	80	75	68	69	82	76	68	84	7,2
30	83	81	85	85	86	90	85	88	85	82	85	86	85	81	90	3,0
45	87	85	88	87	87	91	87	90	88	87	88	88	88	85	91	2,0



Slika 40. Grafički prikaz oslobađanja rifabutina u prisustvu i bez prisustva izoniazida

Postignut je postepeni profil oslobađanja rifabutina iz kapsula, uz potpuno oslobađanje nakon 45 minuta (> 85 %). Dodatak izoniazida u medij nije ukazao na promjenu u profilu i ukupnoj količini oslobođenog rifabutina iz kapsula. Za analize s i bez rifabutina izračunat je faktor sličnosti prema jednadžbi 8:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (8)$$

gdje su R_t i T_t udjeli otopljenog analita za referentni lijek (R_t) i ispitivani lijek (T_t) u istoj vremenskoj točki.

Faktor sličnosti (f_2) profila oslobađanja rifabutina za dva ispitivanja bio je visokih 74. Kriterij za opisivanje profila sličnima je $f_2 \geq 50$.¹⁶⁸

Na slici 40 prikazan je i profil oslobađanja izoniazida koji je potpun već u prvoj točki uzorkovanja (10 minuta). Očekivano visoke vrijednosti već od početka ispitivanja rezultat su toga što je izoniazid dodan kao aktivna komponenta, a ne kao gotova formulacija u medij. Osim navedenog, njegova topljivosti je visoka u svim vodenim medijima (poglavlje 4.1.1) dok je za razliku od izoniazida, rifabutin je znatno slabije topljiv. Pa iako je u kiselom mediju

moгуće je otopiti samo 2 mg mL^{-1} to je otprilike 12 puta više nego što je primijenjena koncentracija rifabutina u analizi *in vitro* oslobađanja.

Ispitivanja su pokazala kako nema razlike u dostupnosti rifabutina iz formulacije, bilo da se on primjenjuje sam ili uz izoniazid (slika 40).

§ 5. ZAKLJUČAK

U predstavljenom doktorskom radu razvijene su ortogonalne metode primjenom UHPLC i SFC tehnika za istovremeno određivanje sadržaja aktivnih tvari i njihovih onečišćenja iz nove višekomponentne antituberkulotske formulacije koja sadrži izoniazid i rifabutin.

Izoniazid je mala molekula, dobro topljiva u vodi i u svim vodenima otapalima. Rifabutin je znatno veća molekula, hidrofobna i znatno bolje topljiva u organskim otapalima. Zbog različitih fizikalno-kemijskih karakteristika razdvajanje dviju aktivnih komponenti na kromatografskoj koloni nije predstavljalo poteškoće. Ipak, eluiranje jedne i druge komponente unutar iste analize zahtijevalo je velike razlike u svojstvima pokretne faze. Izoniazid je zbog svoje hidrofilnosti slabo zadržan na koloni obrnuto-faznog sustava tekućinske kromatografije. Pogoduje mu vrlo nizak udio organskog otapala u pokretnoj fazi i porast pH vodene komponente pokretne faze.

S druge strane, rifabutin je hidrofobna molekula pa je za njegovo eluiranje potreban visoki udio organske komponente u pokretnoj fazi. Istaknute razlike utjecale su na duljinu vremena analize, ali i na odabir otapala za istovremeno određivanje iz uzorka.

Onečišćenja izoniazida su, kemijski i strukturno vrlo slične molekule, zbog čega se uočavaju poteškoće kod njihovog razdvajanja. Osobito je to slučaj za 3-izoniazid i acetil izoniazid. Većina nepokretnih faza nije uspješno razdvajala jedno ili oba ova onečišćenja od izoniazida. Najbolje razlučivanje postignuto je na nepokretnoj fazi s dvije serijski vezane fenilne skupine. Ligandi s fenilnim skupinama omogućuju drugačiju selektivnost u odnosu na često korištene nepokretne faze s alkilnim ligandima, zbog π - π interakcija s analitima. Ipak, uobičajeno su ovo slabo stabilni ligandi, pa visoki udjeli metanola uzrokuju njihovo otkidanje (engl. *bleed*). Za konačnu odabranu nepokretnu fazu, čiji su ligandi fenilne skupine s pet fluorovih atoma, karakteristično je da koristi više mehanizama za postizanje selektivnosti (hidrofobne, steričke, aromatske, elektrostatske interakcije i vodikove veze). Unatoč nešto slabijem razlučivanju, u usporedbi s bifenilnom kolonom, stabilnost odabrane kolone bila je neusporedivo bolja.

Uz očekivani utjecaj pokretne faze na zadržavanje i razlučivanje analita, DoE ispitivanja ukazala su na utjecaj temperature kolone na razlučivanje acetil izoniazida od izoniazida.

Niska temperatura kolone poboljšala je razlučivanje između dva analita i omogućila provedbu analitičke metode u robusnom području.

Analizom komercijalno dostupnih uzoraka uočeno je koeluiranje pika povezanog s pomoćnim tvarima s jednim od poznatih onečišćenja. Metodi je za potrebe analize tog onečišćenja dodana detekcija spektrometrijom masa.

Za istu primjenu razvijena je i SFC analitička metoda. Razlike dviju aktivnih tvari predstavljale su poteškoće i kod razvoja ove metode. Nepokretne faze pogodne za određivanje izoniazida i njegovih onečišćenja bile su neprihvatljive za istovremeno određivanje rifabutina. Kiralne kolone dobro su razdvajale kritične parove pikova (acetil izoniazid i 3-izoniazid od izoniazida), ali je rifabutin eluirao kroz nekoliko minuta te time prekrivao neka od onečišćenja. Optimalna kromatografija postignuta je na nepokretnoj fazi s dietilaminskim ligandima, a optimizacijom pokretne faze uz pomoć DoE postignuto je razdvajanje na osnovici za sve parove pikova. Matematički modeli, izračunati iz DoE, ukazali su na složenost SFC parametara, njihove međusobne interakcije i nelinearne utjecaje. Najveći utjecaj imala je temperatura kolone, i to na četiri od pet ispitivanih CQA. Sniženje temperature kolone je na tri CQA imalo povoljan (Rs 1, Rs 2 i TF 2), a na jedan CQA nepovoljan utjecaj (Rs 3). Protok je imao izraženiji utjecaj na Rs 1 i Rs 2, ali u suprotnom smjeru. Viši tlak bio je povoljan za Rs 1 i 3, a jača elucijska snaga pokretne faze, zbog nižeg udjela propanola u modifikatoru, za Rs 2. Slabija snaga pokretne faze bila je nešto povoljnija za Rs 3. Modeli su potvrdili utjecaj pokretne faze na oblik pika izoniazida dok je za rifabutin oblik pika bio rezultat utjecaja nepokretne faze, budući da je rifabutin u odnosu na izoniazid znatno slabije zadržan na koloni. Optimalni uvjeti metode odabrani su s obzirom na izmjerene utjecaje, a njihova prikladnost potvrđena je validacijom metode kroz ispitivanje robusnosti.

Analiti su SFC metodom eluirani unutar samo 7 minuta. Značajne strukturno kemijske razlike izoniazida i rifabutina nisu se očitovale u velikoj razlici sastava pokretne faze potrebnim za eluiranje dviju aktivnih tvari ni u njihovom vremenu zadržavanja, kao što je to bio slučaj kod UHPLC metode.

Postignuto je nešto bolje razdvajanje poznatih onečišćenja u odnosu na UHPLC. Jedino izonikotinsku kiselinu nije bilo moguće odrediti SFC metodom zbog velike polarnosti ovog analita.

Kod SFC metode uočena je slabija osjetljivost, zbog čega je koncentracija uzorka povećana u odnosu na UHPLC određivanje. Također, zbog prirode SFC sustava, za pripremu

uzorka bilo je potrebno je koristiti organska otapala u kojima je topljivost izoniazida ograničena. Ipak, upotreba organskih otapala omogućila je bolju stabilnost otopine uzorka. Osobito je to slučaj za određivanje onečišćenja, gdje je otapalo korišteno za UHPLC određivanje smjesa vode i metanola, u jednakom volumnom omjeru, uzrokovalo porast nepoznatih onečišćenja, dok isto nije uočeno kod SFC određivanja.

Selektivnost razvijenih metoda evaluirana je kroz studiju prisilne razgradnje izoniazida i rifabutina. Njihovim izlaganjem kiselom i lužnatom mediju, te promotorima oksidacije uočena je osjetljivost obje aktivne tvari prema lužnatom pH. Posebno je rifabutin osjetljiv na uvjete visokog pH. Za svaki od uvjeta uočeni su glavni razgradni produkti. Ukoliko bi porast ovih onečišćenja bio prepoznat u formulaciji, promjenom pH moguće je utjecati na njenu stabilnost. U slučaju kada je razlog porasta onečišćenja reakcija oksidacije, rješenje je upotreba pomoćnih tvari višeg stupnja čistoće ili dodavanjem antioksidansa u formulaciju.

SFC metoda nije bila dovoljno selektivna za onečišćenje uočeno na uzorku izoniazida tretiranom s kiselinom i lužinom pa je moguće zaključiti da je SFC metoda u prednosti za određivanje poznatih onečišćenja dok je UHPLC pogodnija za određivanje nepoznatih onečišćenja.

Ortogonalnost dviju metoda potvrđena je zamjenom redoslijeda eluiranja analita.

UHPLC i SFC metodom za određivanje izoniazida i rifabutina i njihovih onečišćenja analizirani su uzorci za ispitivanje kompatibilnosti dviju aktivnih i devet pomoćnih tvari. Dva su glavna onečišćenja uočena kod smjese izoniazida i rifabutina, a kasnije i kod trokomponentnih smjesa s pomoćnim tvarima. Usporedbom količina svakog od njih pretpostavljeno je da su zamijenili redoslijed eluiranja kao što je i očekivano za određivanje ortogonalnim metodama. Onečišćenje RRT 0,95 prema UHPLC metodi je odgovaralo onečišćenju 0,92 prema SFC metodi, a onečišćenje RRT 1,04 onečišćenju RRT 0,88. Prvo od onečišćenja (RRT 0,95 prema UHPLC metodi i 0,92 prema SFC metodi) određeno je i u uzorku rifabutina. Prema rezultatima MS i MS/MS spektara predložena je struktura *N*-oksida rifabutina za ovo onečišćenje.

Za drugo onečišćenje (RRT 1,04 prema UHPLC metodi i 0,88 prema SFC metodi), uočeno u studiji kompatibilnosti, potvrđen je način fragmentacije sličan fragmentaciji rifabutina. Za njega je prema MS i MS/MS analizi predložena struktura koja nastaje intramolekularnom kondenzacijom primarnog amina izoniazida na karbonilnu skupinu rifabutina uz eliminaciju vode.

Porast udjela onečišćenja zbog prisustva pomoćnih tvari nije bio toliko značajan. Najveći porast zabilježen je u kompaktima s laktoza monohidratom, mikrokristaliničnom celulozom i škrobom, i to najviše do 0.3 %, u odnosu na smjesu dviju aktivnih tvari. Pomoćne tvari su u kompakte dodane u najvišim dozvoljenim količinama za suhe lijekovite pripravke pa su interakcije malo izraženije nego što bi bile u gotovoj formulaciji. Stoga, zabilježeni nepovoljan utjecaj nije ocijenjen kao značajan.

Dugoročno ispitivanje stabilnosti formulacije pokazalo je da je porast onečišćenja manji nego je to uočeno kod uzoraka kompakata. Razlog tome mogao bi biti utjecaj uvjeta na kojima su uzorci čuvani, ali i činjenica da je kod uzorka za dugoročno praćenje stabilnosti smjesa nije bila kompaktirana. To je osiguralo manji doticaj dviju aktivnih komponenti unutar formulacije nego što je to bio slučaj kod kompaktiranih uzoraka. Moguće je zaključiti da bi formulacija bila nešto stabilnija u obliku kapsula. Ipak, u slučaju odabira tabletnog gotovog oblika stabilnost je moguće osigurati uvođenjem višeslojne formulacije kod koje bi aktivne komponente bile formulirane u različitim slojevima.

Kako su ranija saznanja o nekompatibilnosti antituberkulotika prisutnih u dostupnim FDC formulacijama potekla od niskih rezultata *in vivo* bioraspoloživosti i *in vitro* oslobađanja iz gotovih oblika, provedeno je ispitivanje *in vitro* oslobađanja za predloženu FDC formulaciju. U tu svrhu korištena je metoda za *in vitro* oslobađanje opisana u USP monografiji za kapsule rifabutina. Istraživanje je pokazalo jednako oslobađanje rifabutina u prisustvu i bez prisustva izoniazida. Nije uočena razgradnja zbog prisustva izoniazida kakva je ranije prijavljivana za slične antituberkulotike iz rifamicinske skupine antibiotika, rifampicin i rifapentin.

Na temelju cjelokupnih rezultata istraživanja provedenih u sklopu ovog doktorskog rada zaključuje se da su izoniazid i rifabutin prikladni za FDC formulaciju.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ABPR – engl. *Automated Back-Pressure Regulator*

ACN – acetonitril

AQbD – engl. *Analytical Quality by Design*

2-PrOH – 2-propanol

CPP – engl. *Critical Process Parameters*

CQA – engl. *Critical Quality Attributes*

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DoE – engl. *Design of Experiments*

DSC – engl. *Differential Scanning Calorimetry*

ESI – engl. *Electrospray Ionization*

EtOH – etanol

f_2 – faktor sličnosti

FD – engl. *Forced Degradation*

FDC – engl. *Fixed Dose Combination*

FT-IR – engl. *Fourier Transform-Infrared Spectroscopy*

GC – engl. *Gas Chromatography*

HEPT – engl. *Height Equivalent to Theoretical Plate*

HIV – engl. *Human Immunodeficiency Virus*

HILIC – engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*

HSM – engl. *Hot Stage Microscopy*

IC – engl. *Ion Chromatography*

ICH – engl. *International Conference on Harmonisation*

IST – engl. *Isothermal Stress Testing*

LC – engl. *Liquid Chromatography*

LC-MS – engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*

LOD – engl. *Limit of Detection*

LOQ – engl. *Limit of Quantitation*

MB – engl. *Mass balance*

MDR-TB – engl. *Multidrug Resistent Tuberculosis*

MeOH – metanol

MFG – engl. *Molecular Formula Generator*

MS – engl. *Mass Spectrometry*

MS/MS (MSⁿ) – engl. *tandem Mass Spectrometry*

NMR – engl. *Nuclear Magnetic Resonance*

NMP – N-metil-2-pirolidon

NP – engl. *normal phase*

OOS – engl. *out of specification*

OOT – engl. *out of trend*

PAS – para-amino salicina kiselina

PEG – polietilen glikol

PXRD – engl. *Powder X-ray Diffraction*

QDa – kvadrupolni spektrometar masa

QbD – engl. *Quality by Design*

RNA – ribonukleinska kiselina

Rs – razlučivanje

RRT – engl. *Relative Retention Time*

r^2 – koeficijent determinacije

RSD – engl. *Relative Standard Deviation*

RV – relativna vlaga

SEC – engl. *Size Exclusion Chromatography*

SEM – engl. *Scanning Electron Microscopy*

SFC – engl. *Supercritical Fluid Chromatography*

SLS – engl. *Sodium Lauril Sulphate*

s/n – engl. *Signal to Noise*

ST – Sobna temperatura

TB – tuberkuloza

TEA – engl. *triethylamine*

T_f – engl. *Tailing factor*

TFA – trifluorooctena kiselina

t_G – engl. *Gradient Time*

TGA – engl. *Thermogravimetric Analysis*

TOF – engl. *Time of Flight*

UHPLC – engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

UN – engl. *United Nations*

USP – Američka farmakopeja, engl. *United States Pharmacopeia*

UV-Vis – engl. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*

WHO – engl. *World Health Organization*

XDR-TB – engl. *Extradrug Resistant Tuberculosis*

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (preuzeto 15. siječnja 2020. god.)
2. <https://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/> (preuzeto 20. kolovoza 2019. god.)
3. <https://www.tbfacts.org> (preuzeto 20. kolovoza 2019. god.)
4. https://www.who.int/tb/publications/2017/dstb_guidance_2017/en/ (preuzeto 20. kolovoza 2019. god.)
5. G. C. Lima, E. V. Silva, P. de O. Magalhães i J. S. Naves, *Braz. J. Microbiol.* **48** (2017) 198–207.
6. C. J. Shishoo, S. A. Shah, I. S. Rathod, S. S. Savale, J. S. Kotecha i P. B. Shah, *Int. J. Pharm.* **190** (1999) 109–123.
7. S. Singh, T. T. Mariappan, N. Sharda, S. Kumar i A. K. Chakraborti, *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6** (2000) 405–410.
8. S. Singh, T. T. Mariappan, R. Sankar, N. Sarda i B. Singh, *Int. J. Pharm.* **228** (2001) 5–17.
9. R. Sankar, N. Sharda i S. Singh, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **29** (2003) 733–738.
10. S. Singh, H. Bhutani i T. T. Mariappan, *Indian J. Tuberc.* **53** (2006) 201–205.
11. F. D. Freire, M. B. Câmara, M. G. Dantas, C. F. Soares Aragão, T. F. Accioly de Lima e Moura i F. N. Raffin, *Brazilian J. Pharm. Sci.* **50** (2014) 749–756.
12. C. J. Shishoo, S. A. Shah, I. S. Rathod, S. S. Savale i M. J. Vora, *Int. J. Pharm.* **228** (2001) 53–67.
13. H. Bhutani, S. Singh i K. C. Jindal, *Pharm. Dev. Technol.* **10** (2005) 517–524.
14. B. Prasad, H. Bhutani i S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 1438–1441.
15. M. Narita, J. J. Stambaugh, E. S. Hollender, D. Jones, A. E. Pitchenik i D. Ashkin, *Clin. Infect. Dis.* **30** (2000) 779–783.
16. W. J. Burman, K. Gallicano i C. Peloquin, *Clin. Infect. Dis.* **28** (1999) 419–429.
17. W. J. Burman, K. Gallicano i C. Peloquin, *Clin. Pharmacokinet.* **40** (2001) 327–341.
18. T. A. Berger, *Supercritical Fluid Chromatography – primer*, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, 2015, str. 1–186.
19. A. G. G. Perrenoud, J. L. Veuthey i D. Guilleme, *J. Chromatogr. A* **1266** (2012) 158–167.
20. T. Tol, N. Kadam, N. Raotole, A. Desai i G. Samanta, *J. Chromatogr. A* **1432** (2016) 26–38.
21. C. Boussès, L. Ferey, E. Vedrines i K. Gaudin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **115** (2015) 114–122.
22. A. H. Schmidt i I. Molnár, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **78–79** (2013) 65–74.
23. https://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf?ua=1 (preuzeto 16. siječnja 2020. god.)
24. I. Barberis, N. L. Bragazzi, L. Galluzzo i M. Martini, *J. Prev. Med. Hyg.* **58** (2017) E9–E12.
25. A. M. Kelly, *Nurs Clin North Am.* **54** (2019) 193–205.
26. E. Cambau i M. Drancourt, *Clin. Microbiol. Infect.* **20** (2014) 196–201.
27. R. Walker i C. Whittlesea, *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, Elsevier, London,

- 2012, str. 608-620.
28. J. F. Murray, D. E. Schraufnagel i P. C. Hopewell, *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12** (2015) 1749–1759.
29. https://www.who.int/tb/publications/pmdt_companionhandbook/en/ (preuzeto 20. kolovoza 2019. god.)
30. J. A. Caminero, A. Piubello, A. Scardigli i G. B. Migliori, *Eur. Respir. J.* **50** (2017) 1-9.
31. J. A. Caminero i A. Scardigli, *Eur. Respir. J.* **46** (2015) 887–893
32. S. Agrawal, I. Singh, K. J. Kaur, S. R. Bhade, C. L. Kaul i R. Panchagnula, *Int. J. Pharm.* **276** (2004) 41–49.
33. G. A. Ellard, D. R. Ellard, B. W. Allen, D. J. Girling, A. J. Nunn, S. K. Teo, T.H. Tan, H. K. Ng i S. L. Chan, *Am. Rev. Respir. Dis.* **133** (1986) 1076–1080.
34. <https://www.uspnf.com/> (preuzeto 13. veljače 2020. god.)
35. B. Blomberg, S. Spinaci, B. Fourie i R. Laing, *Bull. World Health Organ.* **79** (2001) 940–946.
36. G. Acocella, L. Bonollo, M. Garimoldi, M. Mainardi, L. T. Tenconi i F. B. Nicolis, *Gut* **13** (1972) 47–53.
37. R. P. Mouton, H. Mattie, K. Swart, J. Kreukniet i J. De Wad, *J. Antimicrob. Chemother.* **5** (1979) 447–454.
38. P. Y. Norval, B. Blomberg, M. E. Kitler, C. Dye i S. Spinaci, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **3** (1999) 292–300.
39. G. Acocella, A. Nonis, G. Gialdroni-Grassi i C. Grassi, *Am. Rev. Respir. Dis.* **138** (1988) 882–885.
40. G. Acocella, *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* **64** (1989) 38–40.
41. W. Fox, *Tuberc. Lung Dis.* **73** (1990) 241–245.
42. World Health Organization, *Tuberc. Lung Dis.* (1994) 180–181.
43. G. A. Ellard i P. B. Fourie, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **3** (1999) 16–19.
44. M. W. Long, D. E. Snider i L. S. Farer, *Am. Rev. Respir. Dis.* **119** (1979) 879–894.
45. A. A. Suryanto, J. Van Den Broek, M. Hatta, R. De Soldenhoff i M. J. Van Der Werf, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12** (2008) 174–179.
46. C. Lienhardt, S. V. Cook, M. Burgos, V. Yorke-Edwards, L. Rigouts, G. Anyo, K. Sang-Jae, A. Jindani, D. A. Enarson i A. J. Nunn, *J. Am. Med. Assoc.* **305** (2011) 1415–1423.
47. J. T. Wu, C. T. Chiu, Y. F. Wei i Y. F. Lai, *Clinics* **70** (2015) 429–434.
48. J. M. L. Lai, S. L. Yang i R. Avoi, *J. Glob. Infect. Dis.* **11** (2019) 2–6.
49. A. S. Albanna, B. M. Smith, D. Cowan i D. Menzies, *Eur. Respir. J.* **42** (2013) 721–732.
50. S. Battini, M. K. C. Mannava i A. Nangia, *J. Pharm. Sci.* **107** (2018) 1667–1679.
51. A. N. Unissa, S. Subbian, L. E. Hanna i N. Selvakumar, *Infect. Genet. Evol.* **45** (2016) 474–492.
52. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00951> (preuzeto 20. kolovoza 2019. god.)
53. D. J. Horne, C. Spitters i M. Narita, *Int J Tuberc Lung Dis.* **15** (2011) 1485–1489.
54. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rifabutin> (preuzeto 20. kolovoza 2019. god.)
55. S. Tiberi, L. D’Ambrosio, R. Centis i G. B. Migliori, *Int. J. Infect. Dis.* **65** (2017) 133–134.
56. H. Lee, S. Ahn, N. Y. Hwang, K. Jeon, O. J. Kwon, H. J. Huh, N. Y. Lee i W. J. Koh, *Int. J. Infect. Dis.* **65** (2017) 135–141.

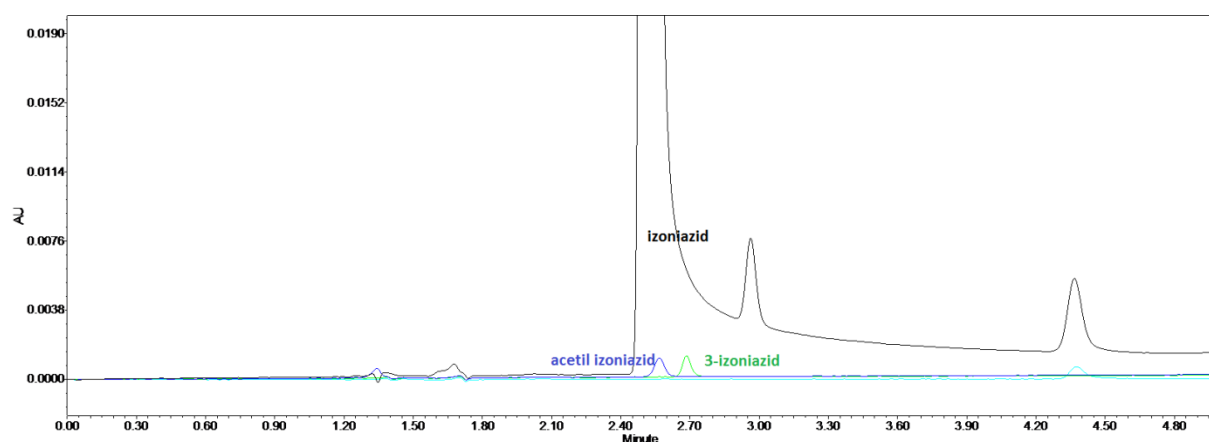
57. S. Schwander, S. Rüscher-Gerdes, A. Mateega, T. Lutalo, S. Tugume, C. Kityo, R. Rubaramira, P. Mugenyi, A. Okwera, R. Mugerwa, T. Aisu, R. Moser, K. Ochen, B. M'Bonye i M. Dietrich, *Tuber. Lung Dis.* **76** (1995) 210–218.
58. C. Grassi i V. Peona, *Clin. Infect. Dis.* **22** (1996) S50–S54.
59. G. R. Davies, S. Cerri i L. Richeldi, *Cochrane Database Syst. Rev.* **4** (2007).
60. K. W. Jo, W. Ji, Y. Hong, S. D. Lee, W.S. Kim, D.S. Kim i T. S. Shim, *Respir. Med.* **107** (2013) 292–297.
61. F. A. Sirgel, R. M. Warren, E. C. Böttger, M. Klopper, T. C. Victor i P. D. van Helden, *PLoS One* **8** (2013).
62. S. R. Byrn, W. Xu i A. W. Newman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48** (2001) 115–136.
63. M. Li, *Organic chemistry of drug degradation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2012, str. 150–164.
64. D. D. Wirth, S.W. Baertschi, R. A. Johnson, S. R. Maple, M. S. Miller, D. K. Hallenbeck i S. M. Gregg, *J. Pharm. Sci.* **87** (1998) 31–39.
65. R. C. Rowe, P. J. Sheskey i M. E. Quinn, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press and the American Pharmacist Association, Washington DC, 2009.
66. T. Lessen i D. C. Zhao, *J. Pharm. Sci.* **85** (1996) 326–329.
67. A. E. Troup i H. Mitchner, *J. Pharm. Sci.* **53** (1964) 375–379.
68. K. T. Koshy, A. E. Troup, R. N. Duvall, R. C. Conwell i L. L. Shankle, *J. Pharm. Sci.* **56** (1967) 1117–1121.
69. A.B. Thakur, K. Morris, J. A. Grosso, K. Himes, J. K. Thottathil, R. L. Jerzewski, D. A. Wadke i J. T. Carstensen, *Pharm. Res.* **10** (1993) 800–809.
70. J. Wong, L. Wiseman, S. Al-Mamoon, T. Cooper, L.-K. Zhang i T.-M. Chan, *Anal. Chem.* **78** (2006) 7891–7895.
71. K. C. Waterman, W. B. Arikpo, M. B. Fergione, T. W. Graul, B. A. Johnson, B. C. Macdonald, M. C. Roy i R. J. Timpano, *J. Pharm. Sci.* **97** (2008) 1499–1507.
72. T. Huang, M. E. Garceau i P. Gao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31** (2003) 1203–1210.
73. W. R. Wasylaschuk, P. A. Harmon, G. Wagner, A. B. Harman, A. C. Templeton, H. Xu i R. A. Reed, *J. Pharm. Sci.* **96** (2006) 106–116.
74. K. J. Hartauer, G. N. Arbuthnot, S. W. Baertschi, R. A. Johnson, W. D. Luke, N. G. Pearson, E. C. Rickard, C. A. Tingle, P. K. Tsang i R. E. Wiens, *Pharm. Dev. Technol.* **5** (2000) 303–310.
75. S. W. Baertschi, K. M. Alsante i R. A. Reed, *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*, Informa Healthcare, Colchester, 2011, str. 168–192.
76. X. Fang, R. T. Bibart, S. Mayr, W. Yin, P. A. Harmon, J. Finnegan McCafferty, R. J. Tyrrell i R.A. Reed, *J. Pharm. Sci.* **90** (2001) 1800–1809.
77. J. D. Franolic, G. J. Lehr, T. L. Barry i G. Petzinger, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26** (2001) 651–663.
78. Y. Sato, D. Breslin, H. Kitada, W. Minagawa, T. Nomoto, X. Z. Qin i S. B. Karki, *Int. J. Pharm.* **390** (2010) 128–133.
79. C. M. Ofner, Y. E. Zhang, V. C. Jobeck i B. J. Bowman, *J. Pharm. Sci.* **90** (2001) 79–88.
80. G. A. Digenis, T. B. Gold i V. P. Shah, *Am. Chem. Assoc.* **83** (1994) 915–921.
81. A. L. Jacobs, A. E. Dilatush, S. Weinstein i J. J. Windheuser, *J. Pharm. Sci.* **55** (1966) 893–895.
82. J. W. Ludvigsson, H. Wikström, T. Andersson i P. O. Norrby, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **158** (2018) 82–87.

83. M. Aucamp, W. Liebenberg, T. Okaecwe, M. Geldenhuys i N. Stieger, *Pharmazie* **74** (2019) 350–351.
84. G. G. G. de Oliveira, A. Feitosa, K. Loureiro, A. R. Fernandes, E. B. Souto i P. Severino, *Saudi Pharm. J.* **25** (2017) 99–103.
85. R. Chadha i S. Bhandari, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 82–97.
86. R. Kaur i V. R. Sinha, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **161** (2018) 144–158.
87. S. S. Bharate, S. B. Bharate i A. N. Bajaj, *J. Excipients Food Chem.* **1** (2010) 3–26.
88. B. Tita, A. Fullas, G. Bandur i E. Marian, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56** (2011) 221–227.
89. K. Liltorp, T. G. Larsen, B. Willumsen i R. Holm, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55** (2011) 424–428.
90. W. Wollinger, R. A. da Silva, A. B. da Nóbrega, R. S. C. Lopes, C. C. Lopes i G. B. C. A. Slana, *J. Braz. Chem. Soc.* **27** (2016) 826–833.
91. G. C. Ceschel, R. Badiello, C. Ronchi i P. Maffei, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32** (2003) 1067–1072.
92. L. M. da Silveira, A. B. Fiorot, T. P. Xavier, M. I. Yoshida i M. A. de Oliveira, *Eur. J. Pharm. Sci.* **112** (2018) 146–151.
93. V. H. Thomas i M. Naath, *Int. J. Pharm.* **359** (2008) 150–157.
94. Dong, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2006, str. 1–47.
95. C. Brunelli, M. Dunkle, S. Morris i P. Sandra, *Chromatogr. Today* (2009) 5–8.
96. M. Taleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam i A. Hafeez, *Austin J. Anal. Pharm. Chem.* **2** (2015) 1–5.
97. https://www.chromacademy.com/lms/sco3/Theory_Of_HPLC_Band_Broadening.pdf (preuzeto 12. prosinca 2019. god.)
98. R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons Ltd., New York, 2003.
99. W. M. A. Niessen, *Liquid chromatography-mass spectrometry*, CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, 2006.
100. A. Witkowski, M. Majkut i S. Rulik, *Arch. Thermodyn.* **35** (2014) 117–140.
101. V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte i L. Nováková, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 56–71.
102. A. Nguyen, Method development in Supercritical Fluid Chromatography (SFC) using Design of Experiments (DoE) and Design Space (DS): Application to the separation optimization of an anti-epileptic drug substance and its impurities, Magistarski rad, Sveučilište u Liege, 2017, str.14
103. Z. Wang, H. Zhang, O. Liu i B. Donovan, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 2311–2319.
104. J. Liu, E. L. Regalado, I. Mergelsberg i C. J. Welch, *Org. Biomol. Chem.* **11** (2013) 4925.
105. A. L. Blilie i T. Greibrokk, *Anal. Chem.* **57** (1985) 2239–2242.
106. W. Zou, J. G. Dorsey i T. L. Chester, *Anal. Chem.* **72** (2000) 3620–3626.
107. C. West i E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* **1087** (2005) 64–76.
108. E. Lesellier i C. West, *J. Chromatogr. A* **1382** (2015) 2–46.
109. C. West, J. Melin, H. Ansouri i M. Mengue Metogo, *J. Chromatogr. A* **1492** (2017) 136–143.
110. C. West, *Chromatogr. Today* (2013) 22–27.
111. C. Brunelli, Y. Zhao, M. H. Brown i P. Sandra, *J. Chromatogr. A* **1185** (2008) 263–

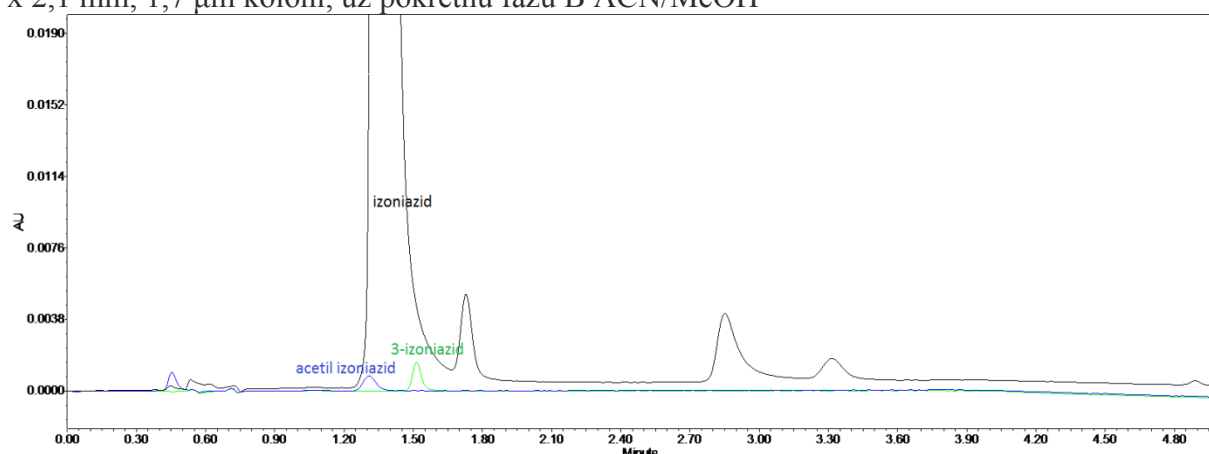
- 272.
112. Y. Wu, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **27** (2004) 1203–1236.
113. https://www.edqm.eu/en/european_pharmacopoeia_10th_edition (preuzeto 19. siječnja 2020. god.)
114. R. Bhandari i I. P. Kaur, *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **03** (2012) 1-5.
115. M. S. Kamel, B. N. Barsoum i M. M. A. Diab, *Res. J. Agric. Biol. Sci.* **4** (2008) 471–484.
116. A. Hemanth Kumar, V. Sudha i G. Ramachandran, *SAARC J. Tuberc. Lung Dis. HIV/AIDS* **9** (2013) 26–29.
117. K. J. M. Medikundu i R. T. Vijayabhaskara, *Int. J. Pharma. Res. Dev.* (2010) 49–55.
118. L. C. Winchester, A. T. Podany, J. S. Baldwin, B. L. Robbins i C. V. Fletcher, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **104** (2015) 55–61.
119. S. H. Song, S. H. Jun, K. U. Park, Y. Yoon, J. H. Lee, J. Q. Kim i J. Song, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21** (2007) 1331–1338.
120. J. Zhang, L. Zhu, M. Stonier, J. Coumbis, X. Xu, Y. Wu, D. Arian, A. Farajallah i R. Bertz, *J. Antimicrob. Chemother.* **66** (2011) 2075–2082.
121. D. H. Shewiyo, E. Kaale, P. G. Risha, B. Dejaegher, J. Smeyers-Verbeke i Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* **1260** (2012) 232–238.
122. M. A. M. Hagga i S. Sultana, *Orient. J. Chem.* **32** (2016) 3081–3087.
123. A. Begum Sk, D. R. Basavaraju i N. Rama Rao, *Chemistry*, **5** (2013) 419–426.
124. P. Prajapati i Y. K. Agrawal, *J. Supercrit. Fluids* **95** (2014) 597–602.
125. H. J. Kim, K. A. Seo, H. M. Kim, E. S. Jeong, J. L. Ghim, S. H. Lee, Y. M. Lee, D. H. Kim i J. G. Shin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **102** (2015) 9–16.
126. R. Gerona, A. Wen, D. Aguilar, J. Shum, A. Reckers, P. Bacchetti, M. Gandhi i J. Metcalfe, *J. Chromatogr. B* **1125** (2019) 121729.
127. Y. Ermolenko, A. Anshakova, N. Osipova, M. Kamentsev, O. Maksimenko, V. Balabanyan i S. Gelperin, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **85** (2017) 55–60.
128. H. Bartels i R. Bartels, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **686** (1996) 235–240.
129. G. Singh i A. K. Srivastava, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **9** (2018) 3903–3907.
130. J. Kuhlman, M. G. G. Sturkenboom, S. Ghimire, I. Margineanu, S. H. J. van den Elsen, N. Simbar, O. W. Akkerman, E. M. Jongedijk, R. A. Koster, J. Bruchfeld, D. J. Touw i J. W. C. Alffenaar, *Clin. Mass Spectrom.* **14** (2019) 34–45.
131. L. C. Winchester, A. T. Podany, J. S. Baldwin, B. L. Robbins i C. V. Fletcher, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **104** (2015) 55–61.
132. S. Jaiswal, A. Sharma, M. Shukla i J. Lal, *J. Chromatogr. Sci.* **55** (2017) 617–624.
133. P. Prajapati i Y. K. Agrawal, *Anal. Methods* **7** (2015) 7776–7783.
134. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q8-r2-pharmaceutical-development> (preuzeto 29. siječnja 2020. god.)
135. S. Orlandini, S. Pinzauti i S. Furlanetto, *Anal. Bioanal. Chem.* **405** (2013) 443–450.
136. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf (preuzeto 29. siječnja 2020. god.)
137. <http://molnar-institute.com/drylab/> (preuzeto 16. prosinca 2019. god.)
138. https://www.jmp.com/en_us/home.html (preuzeto 16. prosinca 2019. god.)
139. S. Beg i S. Hasnain, *Pharmaceutical Quality by Design: Principles and Applications*, Elsevier Inc., London, 2019, str 77–108.
140. S. Schmidtsdorff, A. H. Schmidt i M. K. Parr, *J. Chromatogr. A* **1577** (2018) 38–46.

141. R. Panchagnula, A. Sood, N. Sharda, K. Kaur i C. L. Kaul, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18** (1999) 1013–1020.
142. C. Horváth, W. Melander, i I. Molnár, *J. Chromatogr. A* **125** (1976) 129–156.
143. I. Molnar, *J. Chromatogr. A* **965** (2002) 175–194.
144. J. Terzić, I. Popović i B. Jančić-Stojanović, *Arh. Farm. (Belgr).* **64** (2014) 205–219.
145. J. Terzić, I. Popović, A. Stajić, A. Tumpa i B. Jančić-Stojanovic, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **125** (2016) 385–393.
146. C. West, E. Lemasson, S. Bertin, P. Hennig i E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* **1440**, (2016) 212–228.
147. A. G. G. Perrenoud, W. P. Farrell, C. M. Aurigemma, N. C. Aurigemma, S. Fekete i D. Guillarme, *J. Chromatogr. A* **1360** (2014) 275–287.
148. S. Khater, C. West i E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* **1319** (2013) 148–159.
149. C. West i E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* **1110** (2006) 200–213.
150. C. West i E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* **1110** (2006) 191–199.
151. C. West i E. Lesellier, *J. Chromatogr. A* **1115** (2006) 233–245.
152. K. Anton i C. Siffrin, *Analisis* **27** (1999) 691–701.
153. T. A. Berger i J. F. Deye, *J. Chromatogr. Sci.* **29** (1991) 280–286.
154. A. J. Alexander, T. F. Hooker i F. P. Tomasella, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **70** (2012) 77–86.
155. C. Muscat Galea, D. Mangelings i Y. Vander Heyden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **132** (2017) 247–257.
156. C. Hamman, D. E. Schmidt, M. Wong i M. Hayes, *J. Chromatogr. A* **1218** (2012) 7886–7894.
157. A. G. G. Perrenoud, J. Boccard, J. L. Veuthey i D. Guillarme, *J. Chromatogr. A* **1262** (2012) 205–213.
158. A. Cazenave-Gassiot, R. Boughtflower, J. Caldwell, L. Hitzel, C. Holyoak, S. Lane, P. Oakley, F. Pullen, S. Richardson i G. J. Langley, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 6441–6450.
159. A. Dispas, P. Lebrun, P. Y. Sacré i P. Hubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **125** (2016) 339–354.
160. A. Dispas, V. Desfontaine, B. Andri, P. Lebrun, D. Kotoni, A. Clarke, D. Guillarme i P. Hubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **134** (2017) 170–180.
161. C. Muscat Galea, D. Didion, D. Clicq, D. Mangelings i Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* **1526** (2017) 128–136.
162. E. Landagaray, C. Vaccher, S. Yous i E. Lipka, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **120** (2016) 297–305.
163. E. Forss, D. Haupt, O. Stålberg, M. Enmark, J. Samuelsson i T. Fornstedt, *J. Chromatogr. A* **1499** (2017) 165–173.
164. D. Åsberg, M. Enmark, J. Samuelsson i T. Fornstedt, *J. Chromatogr. A* **1374** (2014) 254–260.
165. V. Petruševska, I. Krtalić, A. Rašić i A. Mornar, *Anal. methods* **11** (2019) 1777–1787.
166. B. Prasad i S. Singh, *Eur. J. Pharm. Sci.* **41** (2010) 173–188.
167. M. B. Smith i J. March, *March's Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2001, str.1172-1298.
168. <https://www.fda.gov/media/70936/download> (preuzeto 20. veljače 2020. god.)

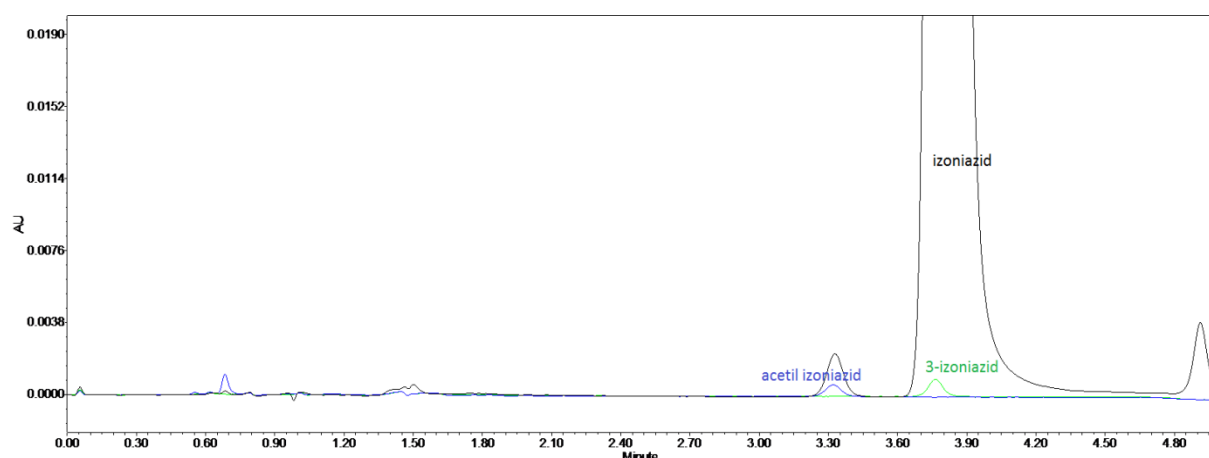
§ 8. DODATAK



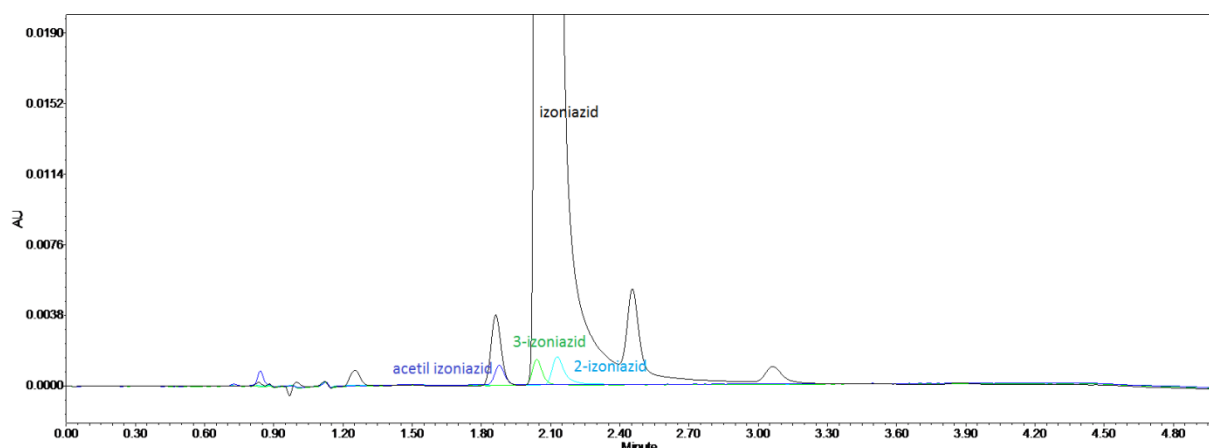
Slika A1. Koeluiranje acetil izoniazida (plavi kromatogram) i 3-izoniazida (zeleni kromatogram) s izoniazidom (crni kromatogram) na Waters Acquity CSH Phenyl Hexil 150 x 2,1 mm, 1,7 µm koloni, uz pokretnu fazu B ACN/MeOH



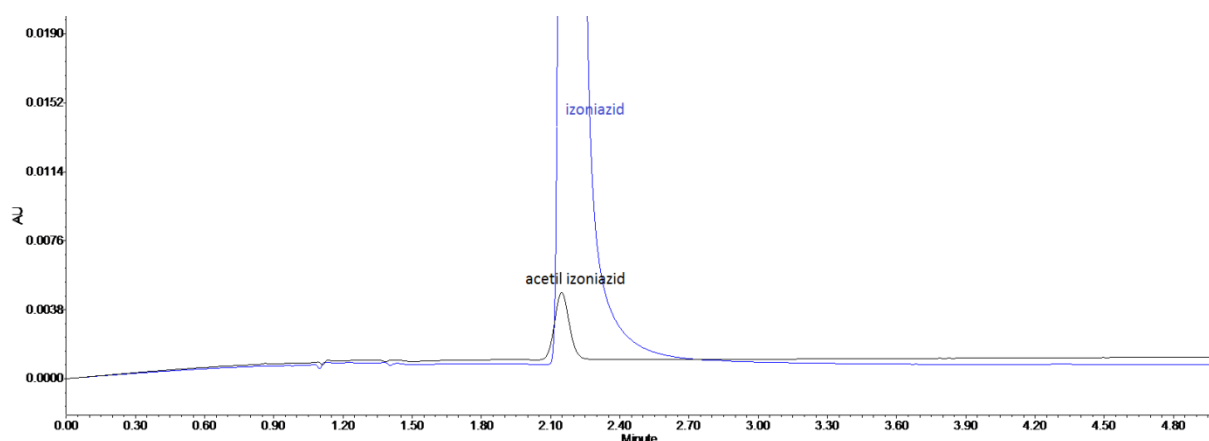
Slika A2. Koeluiranje acetil izoniazida (plavi kromatogram) i 3-izoniazida (zeleni kromatogram) s izoniazidom (crni kromatogram) na Waters Acquity HSS T3, 50 x 2,1 mm, 1,8 µm koloni; uz pokretnu fazu B ACN/MeOH



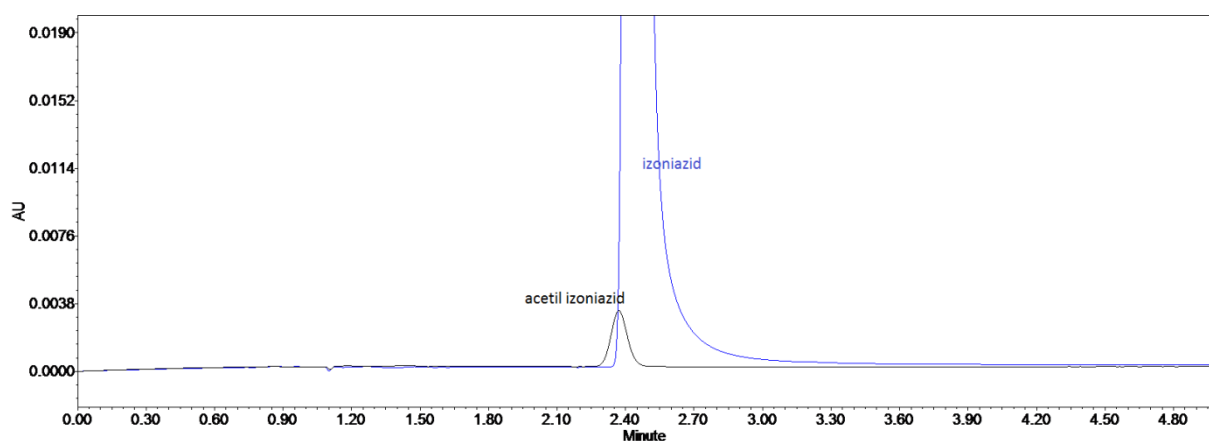
Slika A3. Koeluiranje 3-izoniazida (zeleni kromatogram) i izoniazida (crni kromatogram) na Waters Acquity HSS PFP, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm koloni; uz pokretnu fazu B ACN/MeOH



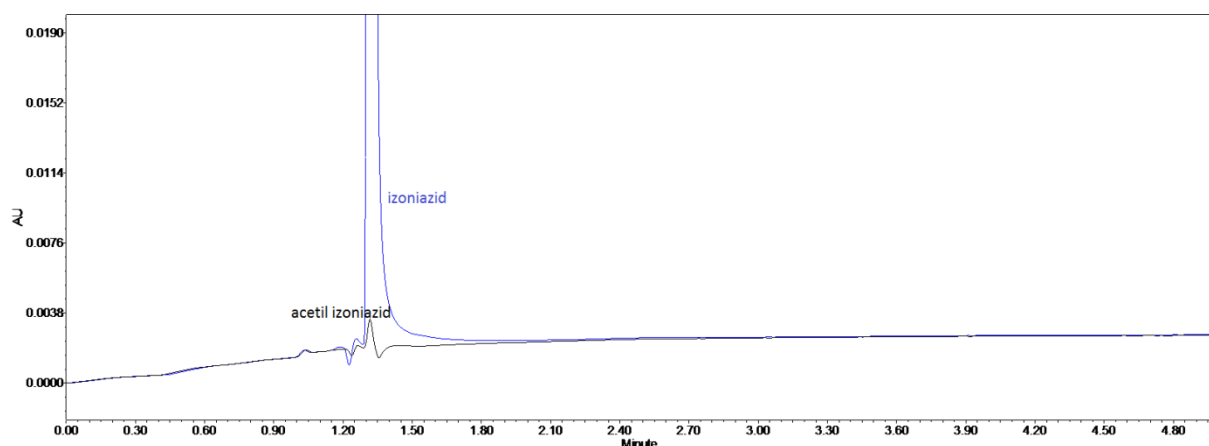
Slika A4. Koeluiranje 2-izoniazida (svijetlo plavi kromatogram) i 3-izoniazida (zeleni kromatogram) s izoniazidom (crni kromatogram) na Waters Acquity HSS Cyano, 50 x 2,1 mm, 1,8 µm koloni; pokretna faza B ACN/MeOH



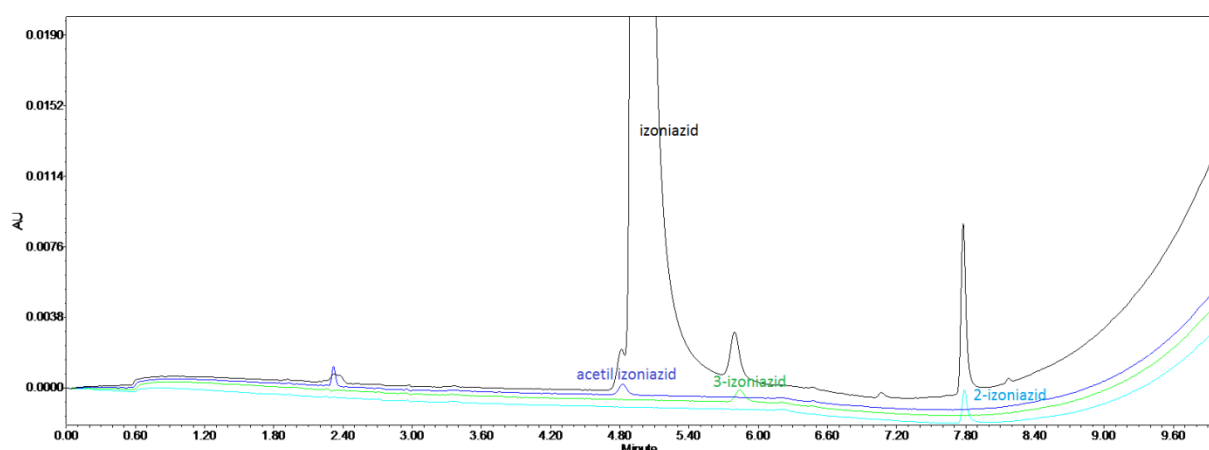
Slika A5. Koeluiranje acetil izoniazida (crni kromatogram) i izoniazida (plavi kromatogram) na Phenomenex Kinetex C8, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm koloni; pokretna faza B ACN/MeOH



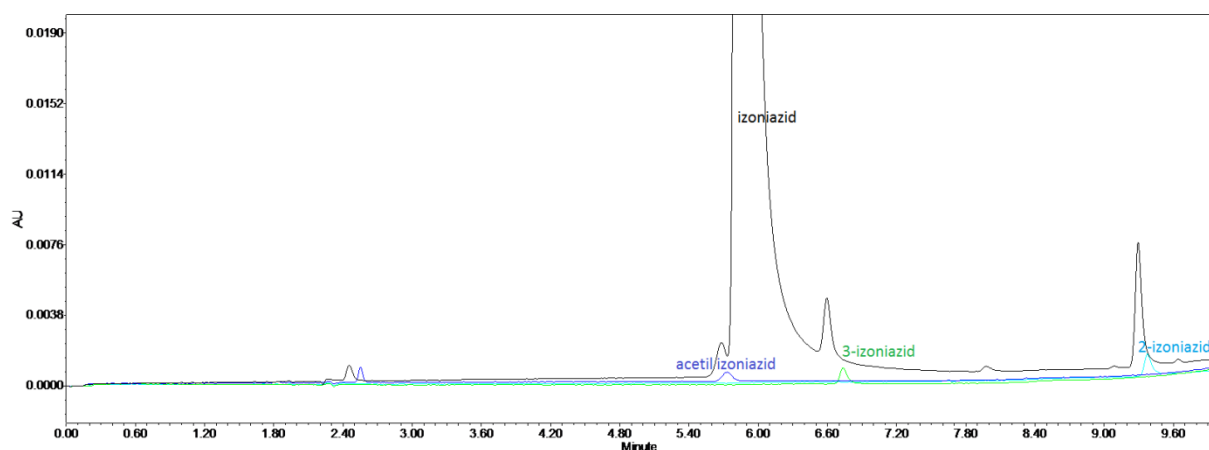
Slika A6. Koeluiranje acetil izoniazida (crni kromatogram) i izoniazida (plavi kromatogram) na Phenomenex Kinetex C8, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm koloni; pokretna faza B 100 % MeOH



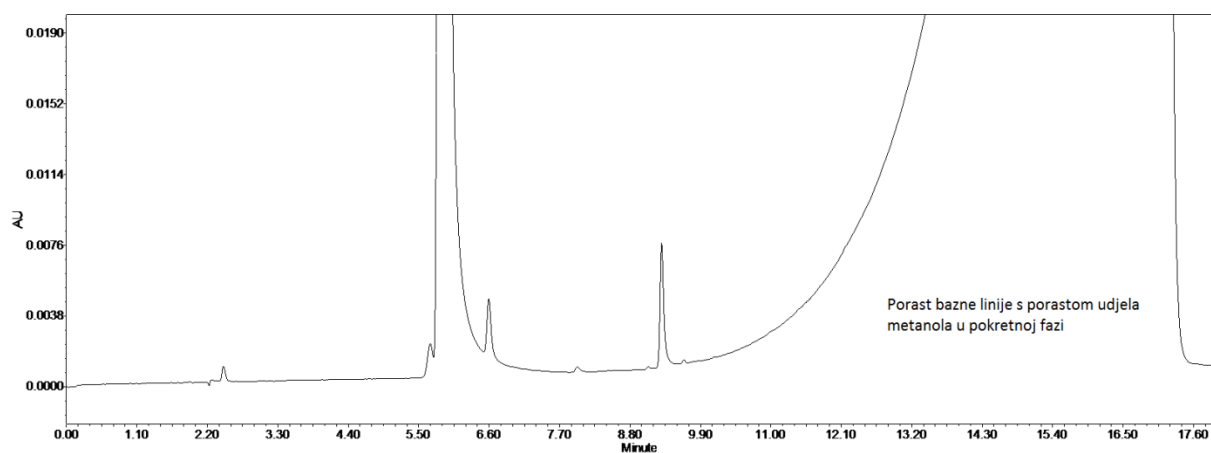
Slika A7. Koeluiranje acetil izoniazida (crni kromatogram) i izoniazida (plavi kromatogram) na Phenomenex Kinetex C8, 150 x 2,1 mm, 1,7 µm koloni; pokretna faza B 100 % 2-PrOH



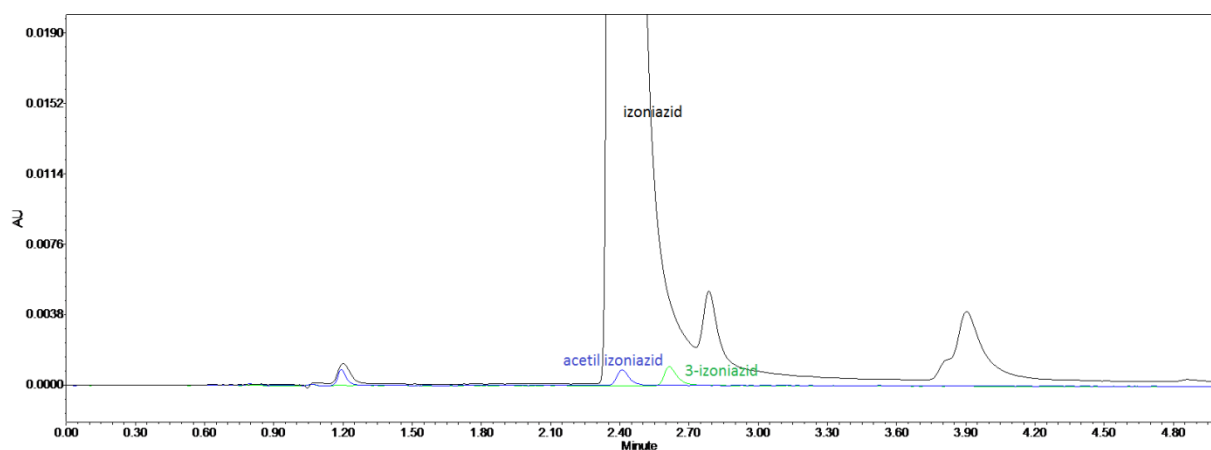
Slika A8. Eluiranje acetil izoniazida (plavi kromatogram), 2-izoniazida (svijetlo plavi kromatogram), 3-izoniazida (zeleni kromatogram) i izoniazida (crni kromatogram) na Phenomenex Kinetex Biphenyl, 150 x 3,0 mm, 2,6 µm koloni; pokretna faza B ACN/MeOH



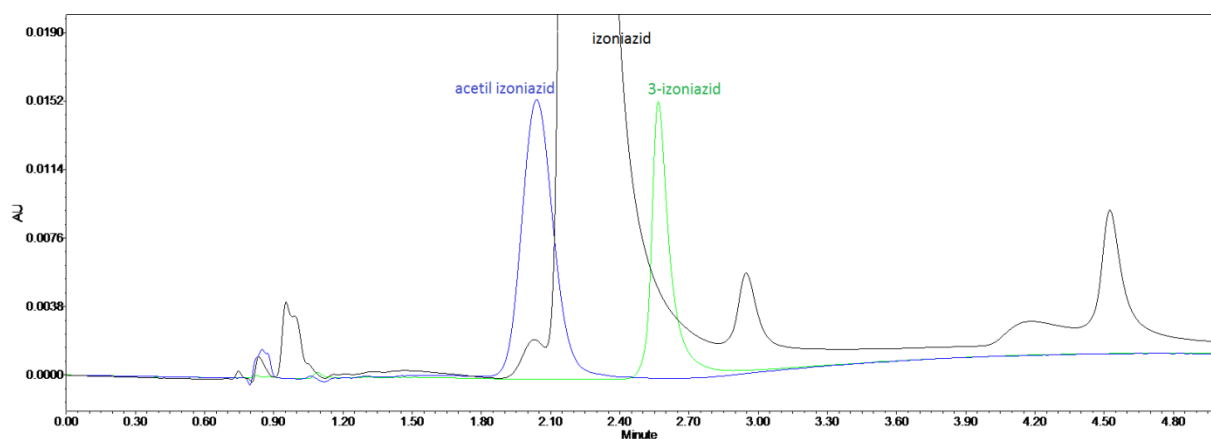
Slika A9. Eluiranje acetil izoniazida (plavi kromatogram), 2-izoniazida (svijetlo plavi kromatogram), 3-izoniazida (zeleni kromatogram) i izoniazida (crni kromatogram) na Phenomenex Kinetex Biphenyl, 150 x 3,0 mm, 2,6 µm koloni; pokretna faza B 100 % MeOH



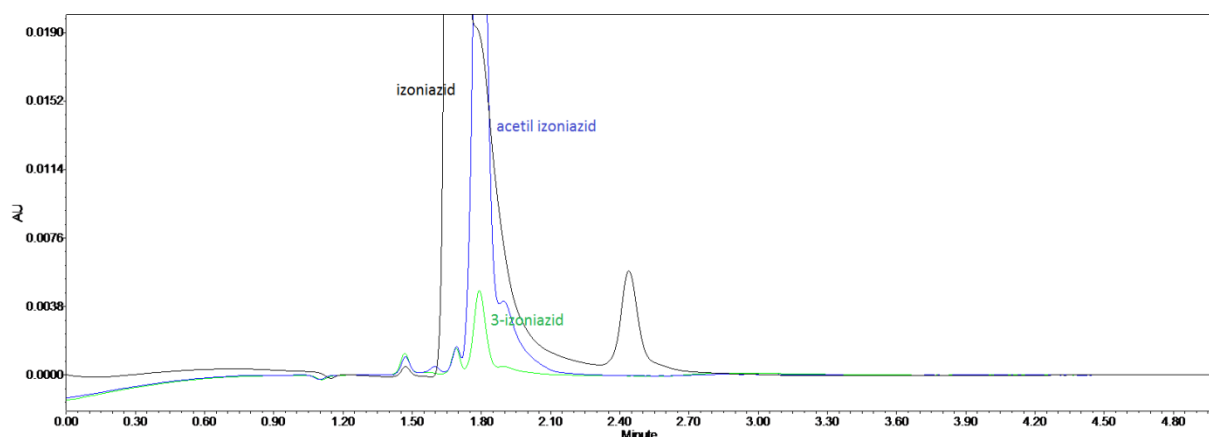
Slika A10. Porast bazne linije kod velikog udjela pokretne faze B na Phenomenex Kinetex Biphenyl, 150 x 3,0 mm, 2,6 μm koloni; pokretna faza B 100 % MeOH



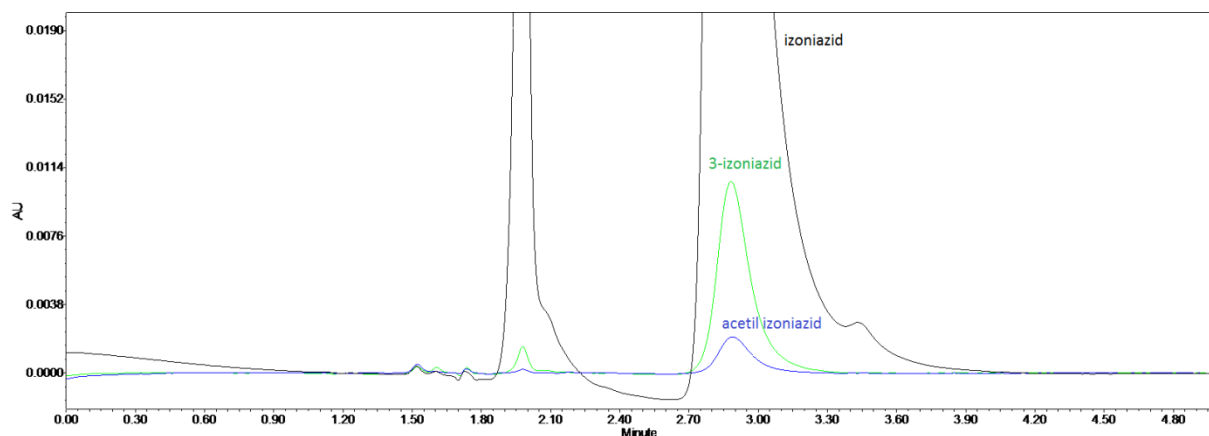
Slika A11. Koeluiranje acetil izoniazida (plavi kromatogram), 3-izoniazida (zeleni kromatogram) i izoniazida (crni kromatogram) na Fortis Diphenil, 100 x 2,1 mm, 1,7 μm ; pokretna faza B 100 % MeOH



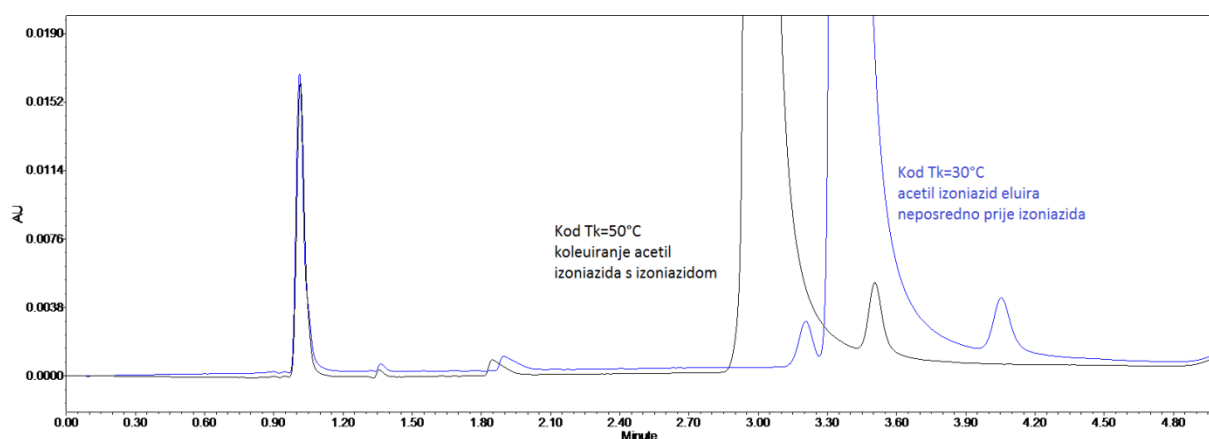
Slika A12. Eluiranje acetil izoniazida (plavi kromatogram), 3-izoniazida (zeleni kromatogram) i izoniazida (crni kromatogram) na Phenomenex Kinetex F5 150 x 2,1 mm, 1,7 μm ; pokretna faza B 100 % MeOH



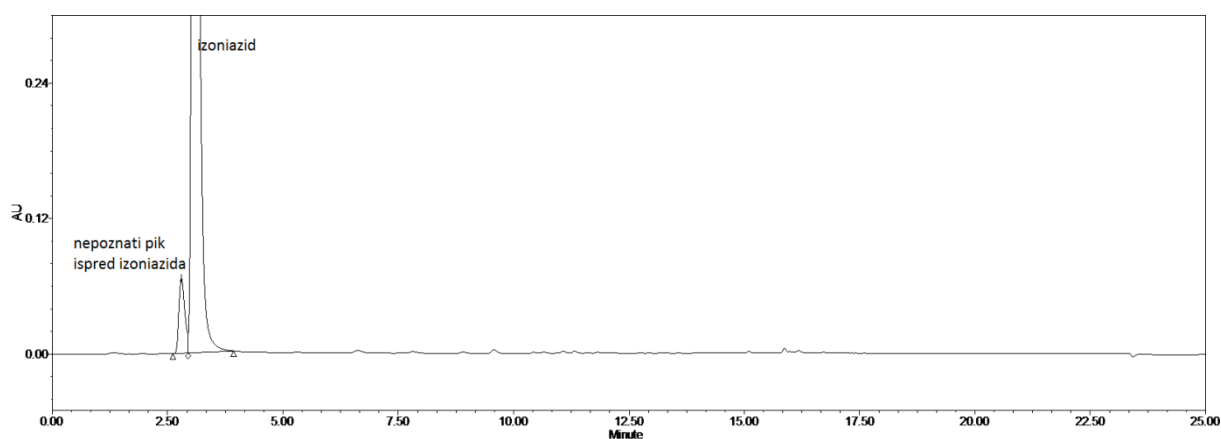
Slika B1. Koeluiranje kritičnih parova pikova: acetil izoniazid (**plavi kromatogram**), izoniazid (crni kromatogram) i 3-izoniazid (**zeleni kromatogram**) pri pH 2,0 pokretne faze A; pokretna faza B je metanol a početni udio metanola 2 %



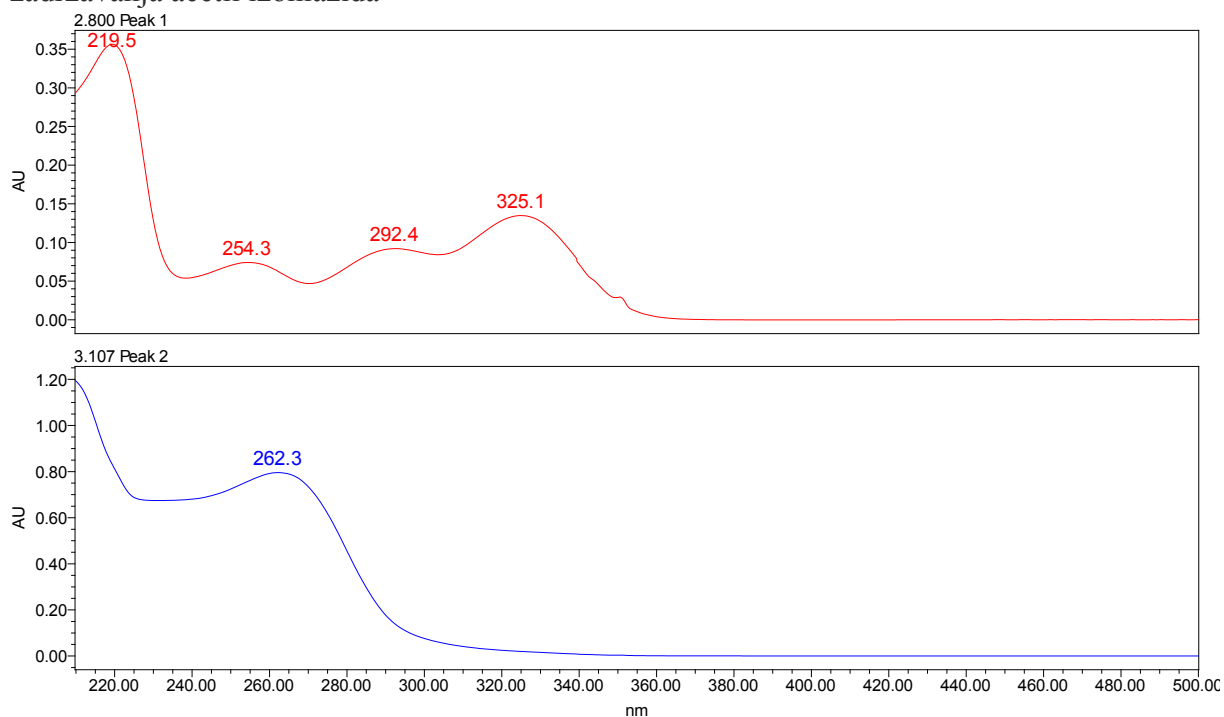
Slika B2. Koeluiranje kritičnih parova pikova: acetil izoniazid (**plavi kromatogram**), izoniazid (crni kromatogram) i 3-izoniazid (**zeleni kromatogram**) kod pH 3,6 pokretne faze A; pokretna faza B je metanol a početni udio metanola 2 %



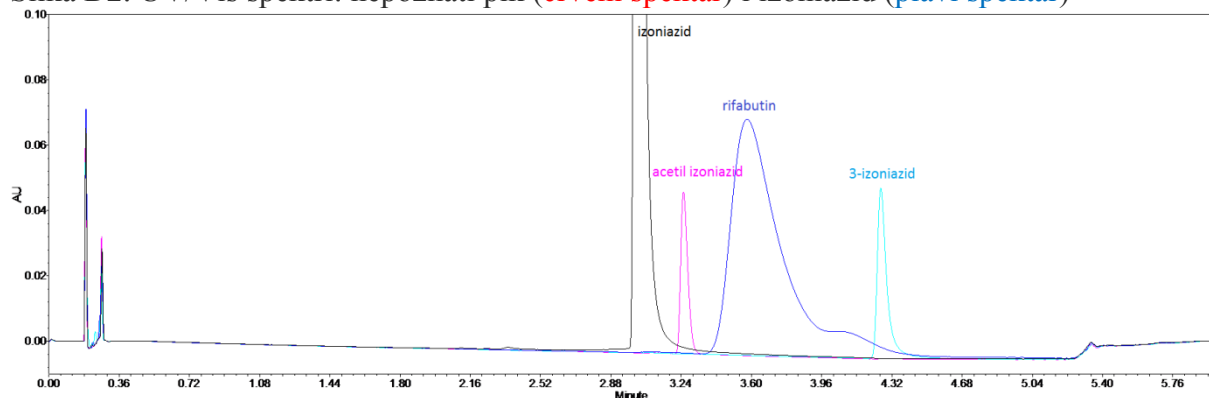
Slika C1. Utjecaj temperature kolone na razlučivanje acetil izoniazida od izoniazida, Tk=50 °C (crni kromatogram) vs. Tk=30 °C (**plavi kromatogram**), ispitano na koloni Phenomenex Kinetex Biphenyl, 150 x 3,0 mm, 2,6 µm



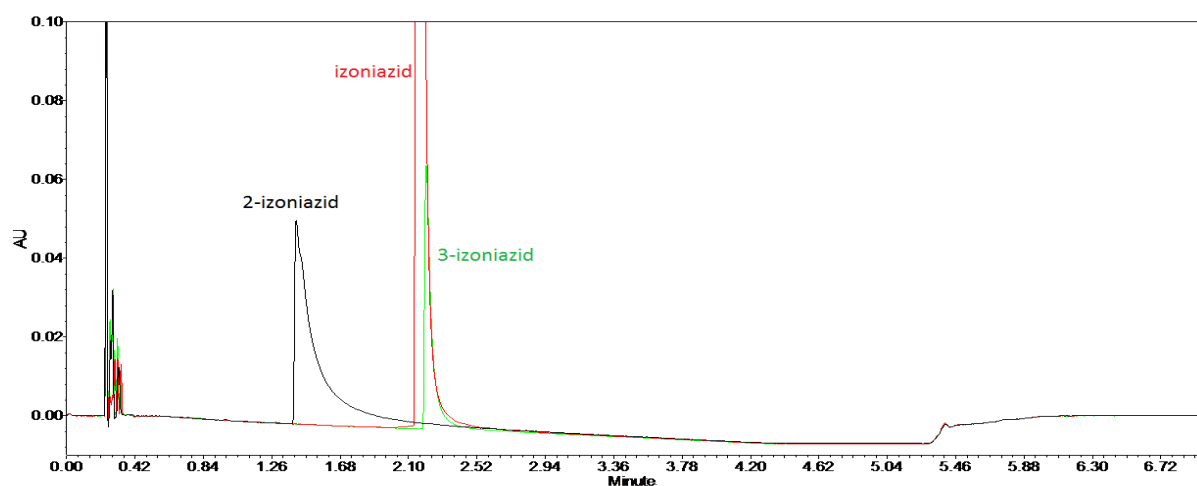
Slika D1. Kromatogram uzorka tableta izoniazida; nepoznati pik uočenu na vremenu zadržavanja acetil izoniazida



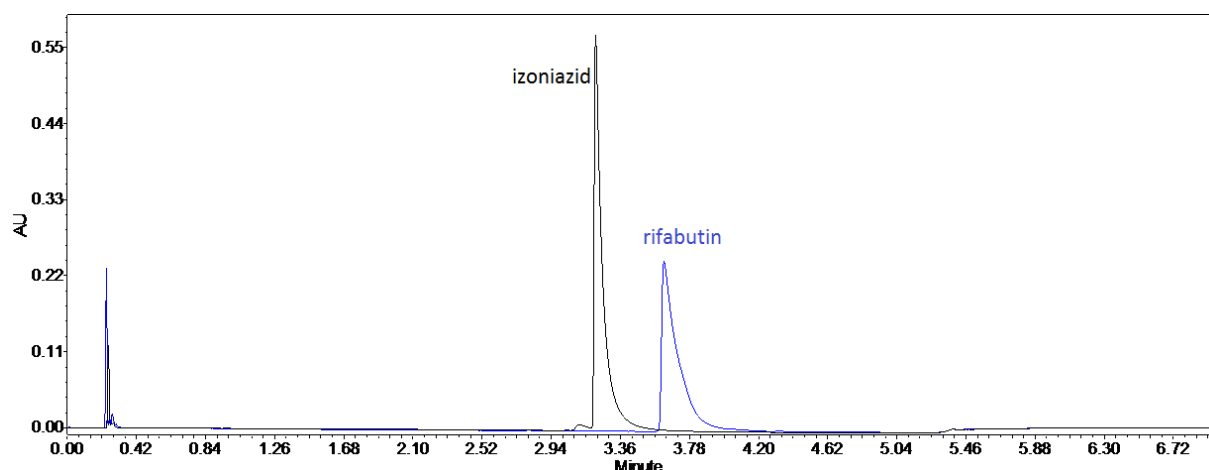
Slika D2. UV/Vis spektri: nepoznati pik (crveni spektar) i izoniazid (plavi spektar)



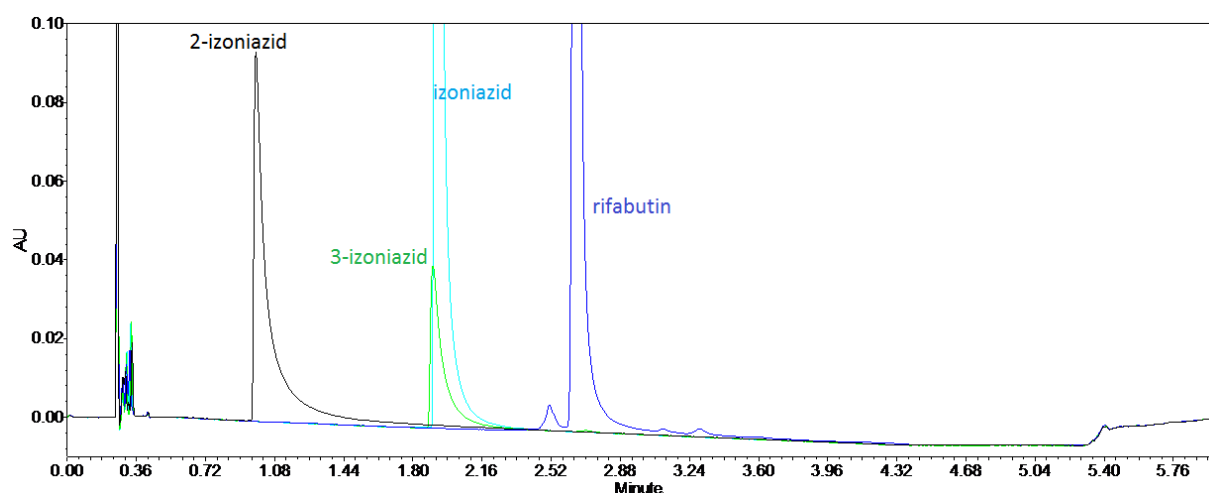
Slika E1. Razvlačenje pika rifabutina (tamno plavi kromatogram) na Trefoil™ AMY1, 2,5 μm , 3,0 x 150 mm koloni uz razdvajanje acetil izoniazida (ružičasti kromatogram) i 3-izoniazid (svijetlo plavi kromatogram) od izoniazida (crni kromatogram)



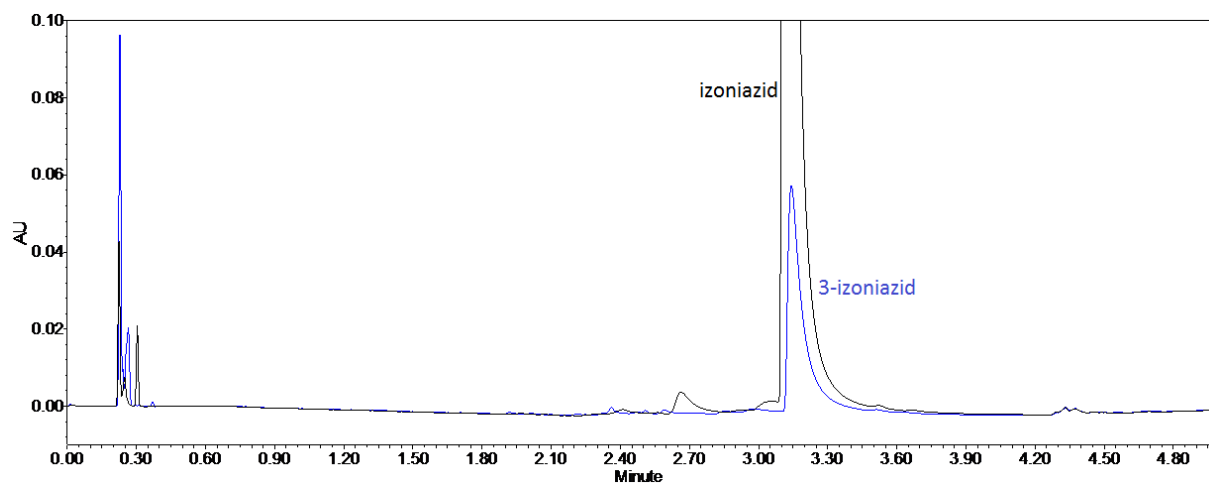
Slika E2. Loš oblik pika 2-izoniazida (crni kromatogram) te koleuiranje izoniazida (crveni kromatogram) i 3-izoniazida (zeleni kromatogram) koeluiraju na koloni Waters Acquity UPC²® CSHTM Fluoro-Phenyl 1,7 μ m, 3,0 x 100 mm



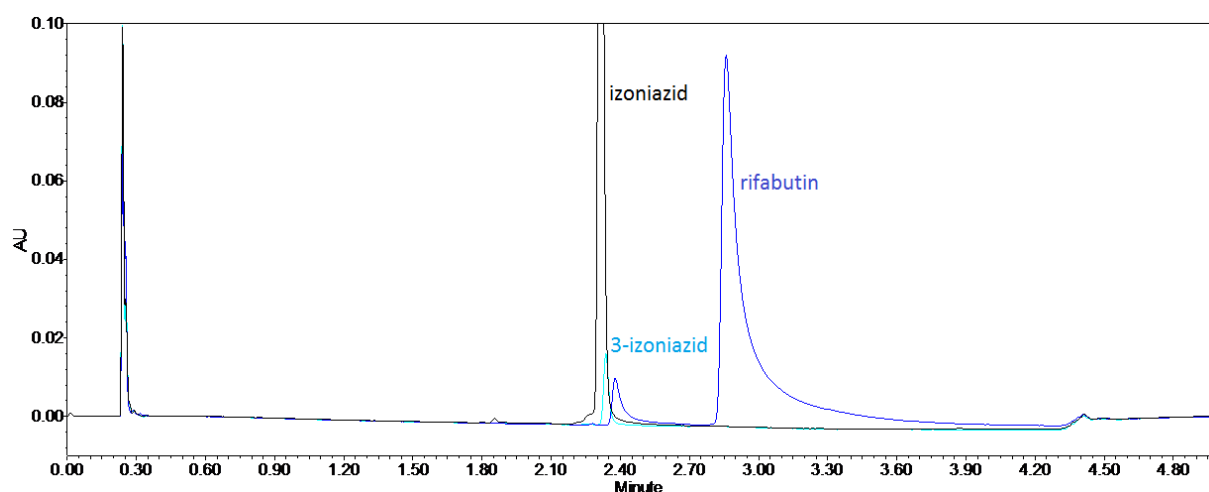
Slika E3. Isoniazid (crni kromatogram) i rifabutin (plavi kromatogram) na koloni Waters Acquity UPC^{2TM} HSS C18 SB 1,8 μ m, 3,0 x 100 mm



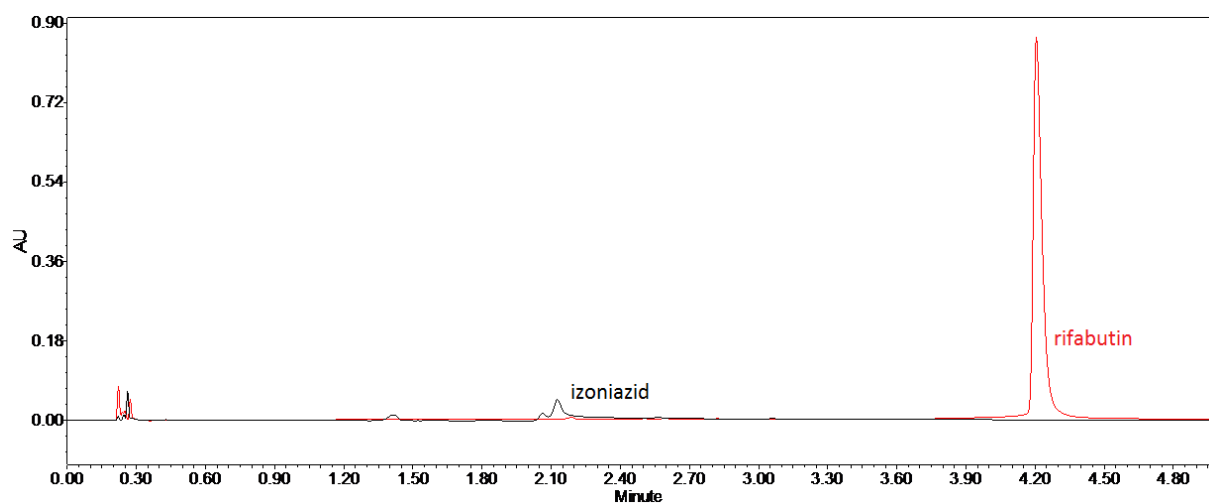
Slika E4. 2-izoniazid eluira s lošim peak shapeom (crni kromatogram), 3-izoniazid (zeleni kromatogram) i izoniazid (svjetlo plavi kromatogram) koeluiraju na koloni Waters Acquity UPC^{2TM} BEH 2-EP, 1,7 μ m, 3,0 x 100 mm



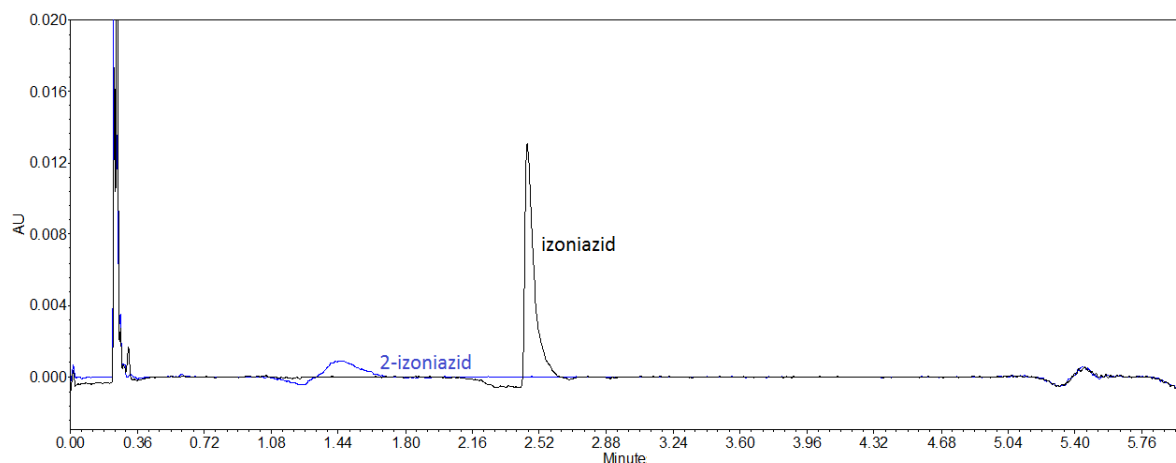
Slika E5. Koeluiranje 3-izoniazida (plavi kromatogram) i izoniazida (crni kromatogram) na koloni Acquity UPC² Torus Diol 1,7 μ m, 3,0 x 100 mm



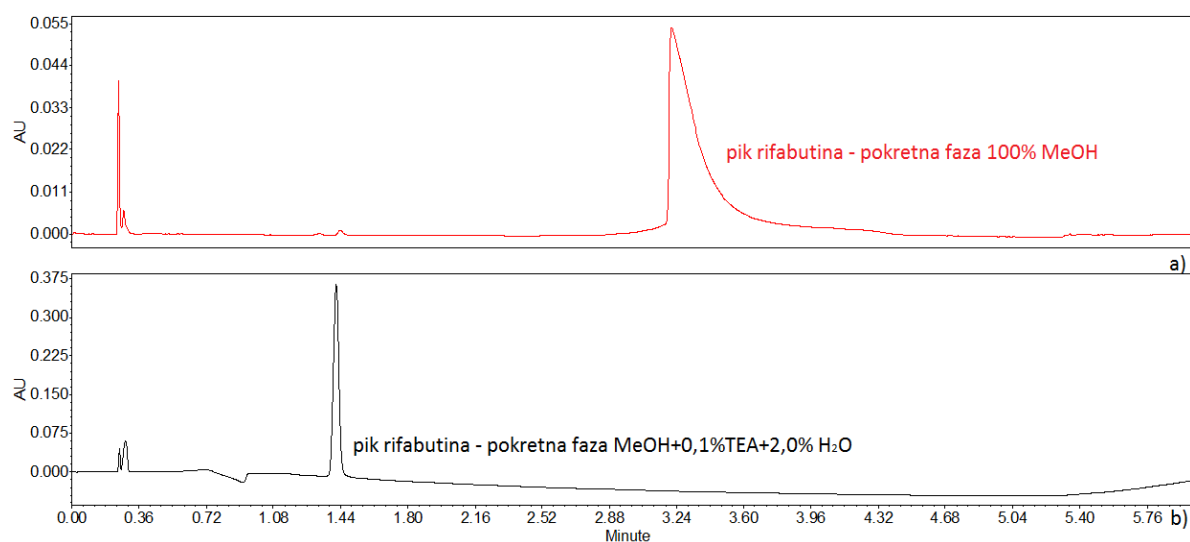
Slika E6. Koeluiranje izoniazida (crni kromatogram) i 3-izoniazida (svjetlo plavi kromatogram) te loš oblik pika rifabutina (plavi kromatogram) na koloni Waters Acquity UPC² BEH 1,7 μ m, 3,0 x 100 mm



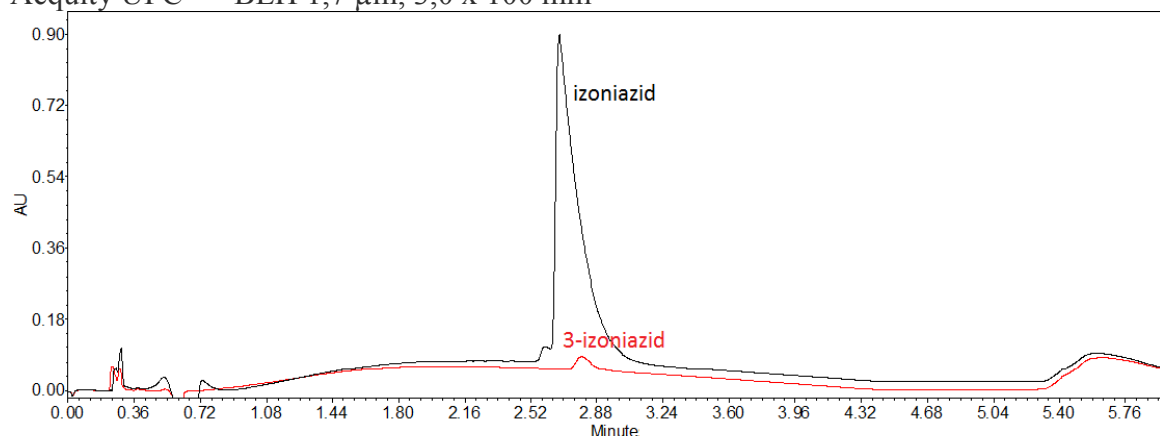
Slika E7. Značajna razlika odaziva izoniazida i rifabutina prilikom eluiranja na koloni Waters Acquity UPC² Torus 2-PIC



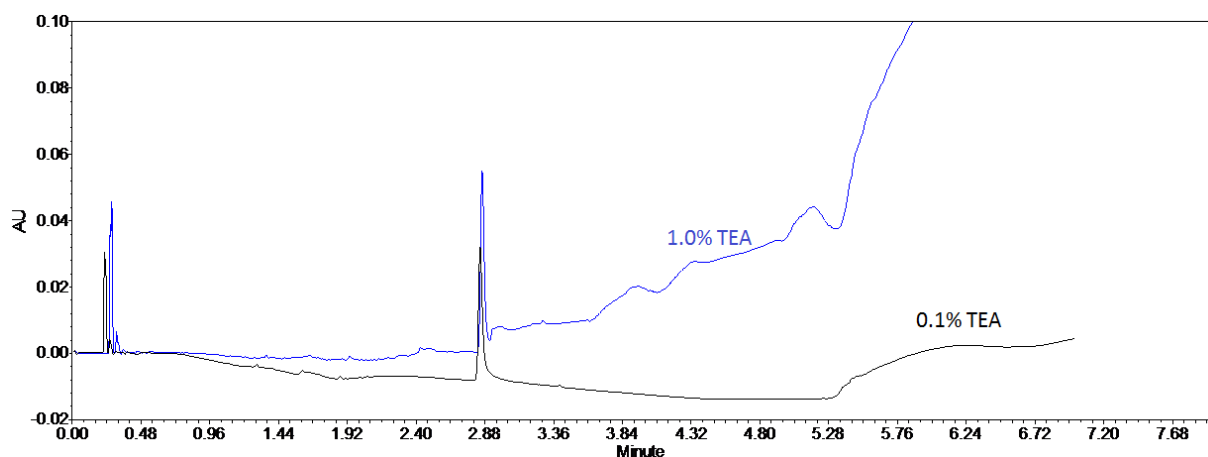
Slika F1. Metanol u pokretnoj fazi zamijenjen smjesom acetonitrila i metanola, analizirano na Waters Acquity UPC²™ BEH 1,7 μ m, 3,0 x 100 mm; oblik pikova neodgovarajući



Slika F2. Poboljšani oblik pika dodatkom TEA i H₂O u pokretnu fazu, analizirano na Waters Acquity UPC²™ BEH 1,7 μ m, 3,0 x 100 mm



Slika F3. Ispitivanje etanola s 0,1 % TEA i 2,0 % H₂O kao modifikatora - koeluiranje 3-izoniazida (crveni kromatogram) i izoniazida (crni kromatogram), analizirano na Waters Acquity UPC²™ BEH 1,7 μ m, 3,0 x 100 mm



Slika G1. Porast šuma bazne linije kod povećanja udjela TEA u pokretnoj fazi; kromatogram 3-izoniazida s 0.1 % TEA (crni kromatogram) vs. 1.0 % TEA (plavi kromatogram)

§ 9. ŽIVOTOPIS

Valentina Petruševska rođena je u Šibeniku 24. siječnja 1982. Osnovnu školu i jezičnu gimnaziju završila je u Šibeniku. 2000. godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer farmacija. 2005. godine završava diplomski studij te od siječnja do prosinca 2006. godine odrađuje stručno usavršavanje u ljekarni. Polaganjem stručnog ispita stječe pravo samostalnog rada kao ljekarnik te se zapošljava u ljekarni kao magistra farmacije. Od svibnja 2007. godine zaposlena je u Istraživanju i razvoju Plive, u odjelu Analitika farmaceutskih proizvoda. Radi kao kao istraživač analitičar te kasnije kao glavni istraživač analitičar na razvoju analitičkih metoda za određivanje sadržaja aktivnih tvari, onečišćenja, genotoksičnih onečišćenja, pomoćnih tvari te *in vitro* oslobađanja iz gotovih farmaceutskih oblika. Od lipnja 2017. godine do ožujka 2020. godine radi kao Glavni znanstveni suradnik – Voditelj projekata u Analitici. Od travnja 2020. godine zapošljava se kao *Scientific programme manager* u Europskoj farmakopeji u Strasbourgu, u Francuskoj. Poslijediplomski studij kemije, smjer Analitička kemija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisuje krajem 2012. godine.

Prvi je autor jednog objavljenog znanstvenog rada i još jednog rada u postupku objavljivanja. Sudjelovala je na znanstvenim skupovima s dva posterska priopćenja. Oba znanstvena rada i posterska priopćenja su vezana uz temu doktorske disertacije.

Znanstveni radovi u časopisima:

1. Petruševska, Valentina; Krtalić, Iva; Rašić, Andrea; Mornar, Ana, *Anal. methods* 11 (2019), 13; 1777-1787
2. Petruševska, Valentina; Lasić, Kornelija; Mornar, Ana, Compatibility investigation for a new antituberculous fixed dose combination with an adequate drug delivery (prihvaćen za objavljivanje u časopisu *Drug Development and Industrial Pharmacy*)

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. Petruševska, Valentina; Krtalić, Iva; Mornar, Ana, *Usporedba tehnika UHPLC i SFC za razdvajanje izoniazida i njegovih onečišćenja*, 6th Croatian Congress of Pharmacy with international participation / 4-7.04.2019. Dubrovnik, Hrvatska (poster)
2. Petruševska, Valentina; Makarić, Sandro; Dinter, Gordan; Mornar, Ana, *Važnost odabira prikladnog otapala za stabilnost otopine uzorka na primjeru DMSO-a*, 26th Croatian meeting of chemists and chemical engineers / 9-12.04.2019. Šibenik, Hrvatska (poster)