Razvoj i validacija spektroskopijske metode bliskoga infracrvenoga zračenja za određivanje udjela vode u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C

Fabijanić, Ines

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:333906

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Ines Fabijanić

RAZVOJ I VALIDACIJA SPEKTROSKOPIJSKE METODE BLISKOGA INFRACRVENOGA ZRAČENJA ZA ODREĐIVANJE UDJELA VODE U CJEPIVU PROTIV MENINGOKOKA SEROGRUPA A I C

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Anita Slavica

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Ines Fabijanić

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEAR-INFRARED SPECTROSCOPIC METHOD FOR WATER CONTENT DETERMINATION IN MENINGOCOCCAL VACCINE SEROGROUPS A AND C

DOCTORAL DISERTATION

Supervisor:

Ph.D. Anita Slavica, Full Professor

Zagreb, 2021.

Tema doktorskog rada pod naslovom „Razvoj i validacija spektroskopijske metode bliskoga infracrvenoga zračenja za određivanje udjela vode u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C“ prihvaćena je na sjednici Fakultetskog Vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Sveučilišta u Zagrebu održanoj 29. rujna 2020. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 16. ožujka 2021.

Informacije o mentoru

Prof. dr. sc. Anita Slavica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Prof. dr. sc. Anita Slavica rođena je u Šibeniku 08. svibnja 1970. godine. Po završetku srednje škole upisuje Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu (PBF SuZ), na kojem je diplomirala Biokemijsko inženjerstvo. Od 1996. radi u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo (Zavod za BI) PBF SuZ, gdje sudjeluje u nastavi, znanstveno-istraživačkom radu i pohađa poslijediplomski znanstveni magistarski studij Biotehnologija. Magistrirala je 2002. godine iz područja Biotehničkih znanosti, znanstveno polje Biotehnologija. U ak. god. 2002./2003. upisuje poslijediplomski znanstveni doktorski studij *Technical Chemistry* na *Graz University of Technology*. Paralelno na *Faculty for Chemistry, Chemical- and Process Engineering, and Biotechnology* i *Research Centre for Applied Biocatalysis* sudjeluje u istraživanjima na više međunarodnih znanstveno-istraživačkih projekata, a primarno na projektu *Determination and improvement of operational stability of enzymes*, kojeg podupire tvrtka Sandoz. Ovdje usvaja cijeli niz novih znanja i vještina iz područja molekularne biotehnologije i bioprocesnog inženjerstva, kao i pravila znanstveno-istraživačkog rada i upravljanja i zaštite intelektualnog vlasništva. Sve predmete propisane doktorskim studijem *Technical Chemistry* je položila s prosječnom ocjenom 1,2 (4,8) i svoj doktorski rad obranila 2006. godine mit *Auszeichnung bestandene* na *Graz University of Technology* (https://online.tugraz.at). Time je stekla akademski stupanj *Doktorin der technichen Wissenschaften* (Doctor technicae, Dr. techn.). Rješenjem Agencije za znanost i visoko obrazovanje Republike Hrvatske je stekla akademski stupanj doktor tehničkih znanosti (dr. sc.). Nakon toga, nastavlja svoj znanstveno-istraživački i nastavni rad u Zavodu za BI, gdje je 2017. izabrana za redovitu profesoricu. Nositelj je i suradnik na nekoliko predmeta na preddiplomskim i diplomskim studijskim programima; poslijediplomskom sveučilišnom doktorskom studiju Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam; i sveučilišnom interdisciplinarnom poslijediplomskom specijalističkom studiju Intelektualno vlasništvo (http://intvla.unizg.hr). Uvela je najnovije sadržaje i priredila nastavne materijale za nekoliko predmeta, koji se izvode na SuZ. Odlukom Matičnog odbora za biotehničke znanosti od 27. veljače 2019. izabrana je u znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u trajnom zvanju.

Znanstvenim istraživanjima, inovativnim tehnologijama i transferom tehnologija bavila se i bavi se u okviru nacionalnih i međunarodnih znanstveno-istraživačkih projekta, jednim *Proof*

of Concept i jednim nacionalnim stručnim projektom. Od 2018. do danas nositeljica je potpore istraživanjima primjene robusnih biokatalizatora u održivoj biotehnološkoj proizvodnji biokemikalija i drugih proizvoda visoke dodane vrijednosti na PBF SuZ. Objavila je 20 znanstvenih radova, autorica je jednog patenta (HR P20100074 A2) i suradnica na tekstu iz područja biotehnologije u Hrvatskoj tehničkoj enciklopediji. Uređuje međunarodne znanstvene časopise i recenzirala je više od 50 znanstvenih radova, organizirala više od 20 međunarodnih znanstvenih skupova, sudjelovala na više od 30 međunarodnih znanstvenih skupova i predsjedala sesijama na šest međunarodnih znanstvenih kongresa. Održala je niz plenarnih i pozvanih predavanja na međunarodnim i nacionalnim znanstvenim skupovima kao i devet predavanja na *Graz University of Technology*. Mentor je osam završnih radova, 25 diplomskih radova i tri doktorska rada. Dobitnica je nekolika nagrada u zemlji i inozemstvu.

(Su)Osnivačica, predsjednica, dopredsjednica i članica je nekoliko znanstvenih međunarodnih i nacionalnih organizacija i stručnih društava kao i različitih Odbora na Fakultetu. Kroz različita predstavnička tijela zastupa interese Republike Hrvatske pri tijelima Europske komisije, prenosi znanstveno utemeljene činjenice iz područja biotehnologije u široj društvenoj zajednici i zastupa kreiranje boljeg, pravednijeg i prosperitetnijeg društva.

Zahvaljujem svojoj mentorici Prof. dr. sc. Aniti Slavici u kojoj sam imala angažiranog sugovornika u znanstvenom dijalogu stvarajući svojim predanim angažmanom znanstveno poticajnu radnu atmosferu do posljednjih redaka ove disertacije.

Također neprocjenjivo poticajnu radnu i istraživačku atmosferu imala sam u Imunološkom zavodu te bi željela zahvaliti svim kolegama u Laboratoriju za kemijsku kontrole kvalitete koji su utkali svoje znanje i iskustvo u moj istraživački rad.

Zahvaljujem Prof. dr. sc. Jadranki Frece na razumijevanju i naklonosti pri realizaciji ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem Prof. dr. sc. Jagodi Šušković i Prof. dr. sc. Blaženki Kos čija me je trajna briga i poticanje pratila na putu prema doktoratu znanosti.

Zahvaljujem kolegama u Plivi koji su predano sudjelovali u eksperimentalnoj fazi istraživačkog rada.

Zahvaljujem Ani Mandac Zubak na neiscrpnoj energiji i idejama koji su pratili naš znanstveno istaživački rad.

Hvala svima koji ovdje nisu spomenuti, a koji su svojim zalaganjem pomogli u izradi ove disertacije.

Zahvaljujem svojoj majci i sestri što su dugo i strpljivo čekale ovaj trenutak, koji velikim dijelom pripada i njima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski (doktorski) studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo
UDK: 546.212:615.371:66.085.1(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

RAZVOJ I VALIDACIJA SPEKTROSKOPIJSKE METODE BLISKOGA INFRACRVENOGA ZRAČENJA ZA ODREĐIVANJE UDJELA VODE U CJEPIVU PROTIV MENINGOKOKA SEROGRUPA A I C

Ines Fabijanić, dipl. ing. biotehnologije

Rad je izrađen u Imunološkom zavodu, Zagreb, Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te u Pliva Hrvatska, Zagreb.

Mentor: Prof. dr. sc. Anita Slavica

Kratki sažetak doktorskog rada

Cilj ovog rada je bio razviti i validirati nove spektroskopijske metode bliskoga infracrvenoga zračenja (NIR) za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C i pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe (PMPS) A i C prema sustavnom pristupu procesne analitičke tehnologije (PAT). Novi eksperimetalni dizajn temeljen na metodi standardnog dodavanja u liofilizirana cjepiva omogućio je procjenu točnosti predikcije NIR modela, obuhvativši mjerne nesigurnosti NIR modela i sustavnu pogrešku referentne Karl-Fischer metode. Utvrđeno je da na rezultate određivanja ostatne vode u liofiliziranom cjepivu standardnom Karl-Fischer metodom utječe atmosferska vlaga te je osmišljena Karl-Fischer metoda koja udovoljava kriterijima za referentnu metodu. Profil točnosti potvrdio je da NIR model točno određuje udjel vode u liofiliziranom cjepivu u rasponu od 1,0 - 6,7 %. Izvedbene karakteristike optimalnih NIR modela za određivanje udjela vode u djelatnim tvarima, PMPS A i PMPS C procijenjene su na temelju kemometrijskih parametara. Rezultati ovog rada upućuju na potencijal primjene novih NIR metoda u praćenju kritičnog parametra kvalitete - udjela vode u stvarnom vremenu u svim fazama proizvodnje liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C prema sustavnom PAT pristupu skraćujući vrijeme za puštanje serije lijeka u promet.

Broj stranica: 171
Broj slika: 60
Broj tablica: 30
Broj literaturnih navoda: 123
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Karl-Fischer titracija, liofilizirano cjepivo protiv meningokoka serogrupa A i C, NIR spektroskopija, određivanje udjela vode, profil točnosti

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček
3. Dr. sc. Marin Roje, viši znanstveni suradnik
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske.14, Zagreb.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Ph. D. Thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate university (doctoral) study Biotechnology and Bioprocess Engineering
UDK: 546.212:615.371:66.085.1(043.3)
Scientific Area: Biotechnical sciences
Scientific Field: Biotechnology

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEAR-INFRARED SPECTROSCOPIC METHOD FOR WATER CONTENT DETERMINATION IN MENINGOCOCCAL VACCINE SEROGROUPS A AND C

Ines Fabijanić, dipl. ing. biotechnology

Thesis performed at Institute of Immunology, Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb and Pliva Croatia, Zagreb.

Supervisor: Ph.D. Anita Slavica, Full professor

Short abstract

The aim of the present study was to develop and validate near-infrared (NIR) spectroscopic methods for water content determination in freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C and purified meningococcal polysaccharides serogroups (PMPS) A and C in accordance with Process Analytical Technology (PAT). A novel approach based on the standard addition method in freeze-dried vaccines is proposed to clearly demonstrate the NIR model's ability to give accurate predictions, by evaluating not only uncertainties associated with the NIR calibration model, but also systematic error arising from the reference Karl-Fischer method. However, results for water content in freeze-dried vaccine obtained by standard Karl-Fischer method were influenced by atmospheric moisture. Consequently, the suitability of the newly proposed Karl-Fischer for a reference method was confirmed. The accuracy profile showed that the NIR model successfully determined water content over the 1.0–6.7 % range. In addition, the best NIR models for drug substances, PMPS A and PMPS C were evaluated based on chemometric parameters. The present study confirmed that NIR methods could be used in the PAT concept for monitoring of critical quality parameter - water content in all production phases of freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C in a timely manner therefore reducing a batch release time.

Number of pages: 171
Number of figures: 60
Number of tables: 30
Number of references: 123
Original in: Croatian

Key words: Karl-Fischer titration, freeze-dried meningococcal vaccine, NIR spectroscopy, water content determination, accuracy profile

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Ph. D. Jagoda Šušković, Full professor
2. Ph. D. Višnja Gaurina Srček, Full professor
3. Ph. D. Marin Roje, Senior research associate
4. Ph. D. Blaženka Kos (substitute), Full professor

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14, Zagreb.

SAŽETAK

Postupak liofilizacije se vrlo često primjenjuje u svrhu očuvanja kvalitete proizvedenog cjepiva. Naime, procesi razgradnje većine liofiliziranih pripravaka temelje se na reakcijama hidrolize, te je voda faktor s najvećim utjecajem na kvalitetu i stabilitet pripravaka. Karl-Fischer titracija je apsolutna metoda, prihvaćena kao standardna metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranim cjepivima. Iako je ova analitička tehnika pod strogo kontroliranim uvjetima pouzdana, atmosferska vlaga kao najčešći uzrok pogreške Karl-Fischer titracije može značajno utjecati na rezultate određivanja udjela vode u higroskopnim uzorcima liofilizata s izrazito niskim udjelom vode.

Primjena spektroskopije bliskoga infracrvenoga zračenja (NIR) za kvantifikaciju vode u liofiliziranim proizvodima je u značajnom porastu kao brza i nedestruktivna alternativa konvencionalnim analitičkim metodama.

Cilj ovog rada je bio razviti i procijeniti točnost nove kvantitativne NIR analitičke metode za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C evaluacijom ne samo nesigurnosti koje proizlaze iz NIR kalibracijskog modela i NIR snimanja spektara, već i sustavne pogreške Karl-Fischer referentne metode. Naime, točnost referentnih vrijednosti dobivenih referentnom metodom preduvjet je za formiranje kvalitetnog NIR modela.

Utvrđena je visoka korelacija između relativne vlažnosti zraka i rezultata određivanja ostatne vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Stoga je razvijena i validirana nova referentna Karl-Fischer volumetrijska metoda koja se temelji na otapanju liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C u zatvorenim bočicama kako bi se izlaganje atmosferskim utjecajima svelo na najmanju mjeru.

Istraživanje je provedeno na 11 proizvodnih serija cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C koje su podijeljene u dva seta – kalibracijski set i optimizacijski test set. Odabirom relativno velikog broja proizvodnih serija cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (n = 11) nastojalo se obuhvatiti varijabilnost fizikalnih i kemijskih svojstava koji proizlaze iz proizvodnog procesa. Radi proširenja relativno uskog raspona udjela ostatne vode koji je svojstven proizvodnim uzorcima, ciljani raspon udjela vode za NIR model dobiven je u laboratoriju dodavanjem vode u proizvodne uzorke cjepiva. U svrhu uklanjanja efekata koji nastaju uslijed difuzne refleksije svjetlosti te isticanja spektralnih informacija o kemijskom sastavu korištena je metoda matematičke transformacije NIR spektara - standardna normalna variata (SNV). Nadalje,

selektirano je spektralno područje u rasponu valnih brojeva od 5462-3842 cm^{-1} s dobro razlučenom spektralnom vrpcom specifičnom za molekulu vode, koju karakterizira kombinacijska vrpca O-H istezanja i H-O-H savijanja. Kako bi se analizirala raspodjela uzorka na kalibracijski set i optimizacijski test set provedena je eksploracijska analiza na temelju analize glavnih komponenata (PCA). Formirani su NIR predikcijski modeli temeljeni na metodi parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS). Konvencionalni kemometrijski kriteriji poput koeficijenta korelacije (R^2 = 0,99), korijena srednje kvadratne pogreške kalibracije (RMSEC = 0,18 %) i korijena srednje kvadratne pogreške predikcije (RMSEP = 0,14 %) omogućili su odabir preliminarnog NIR modela s dva PLS faktora. Međutim, navedeni kemometrijski parametri nisu dostatni za procjenu točnosti predikcije NIR modela tijekom rutinske primjene validirane analitičke metode u budućnosti. Shodno tome, osmišljen je novi eksperimentalan dizajn temeljen na metodi standardnog dodavanja (SAM) u liofiliziranom cjepivo za procjenu ukupne pogreške NIR analitičkog sustava. Multivarijatan kalibracijski model tj. PLS regresijski model s dva faktora primijenjen na SNV transformiranim NIR spektralnim podacima u spektralnom području 5462-3842 cm^{-1} odabran je za procjenu ukupne pogreške. Profil točnosti temeljen na *β-expectation tolerance interval* (*βETI*) je korišten za procjenu točnosti NIR analitičkog sustava i definiranje valjanog raspona analitičke metode. Profil točnosti potvrdio je da NIR model točno određuje udjel vode u rasponu od 1,0 - 6,7 %.

Dodatno, razvijene su nove NIR analitičke metode za određivanje udjela vode u djelatnim tvarima - pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogroupe A i C prema referentnim vrijednostima dobivenim referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Formirani su NIR kalibracijski modeli na osnovi PLS regresijske analize. Najbolji kalibracijski NIR modeli dobiveni su sa SNV transformiranim spektrima u spektralnom području 5500-3800 cm^{-1}. Koeficijent korelacije R^2 = 1,00, odsječak na osi ordinate od 0,05 %, nagib pravca od 1,00 te RMSEC i RMSEP vrijednosti redom od 0,18 % i 0,20 % dobiveni su za NIR model za određivanje udjela vode u pročišćeno meningokoknim polisaharidima serogrupe A, odnosno koeficijent korelacije R^2 = 0,98, odsječak na osi ordinate od 0,23 %, nagib pravca od 0,98 te RMSEC i RMSEP vrijednosti, redom, od 0,18 % i 0,22 % dobiveni su za NIR model za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C.

Rezultati ovog rada upućuju na izuzetan potencijal primjene novih brzih, neinvazivnih, nedestruktivnih NIR metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranom meningokoknom cjepivu serogrupa A i C kao i djelatnim tvarima - pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i C, u skladu sa sustavnim pristupom procesne analitičke tehnologije (PAT).

Novi eksperimentalni dizajn omogućio je procjenu ukupne proporcionalne pogreške na osnovi nagiba pravca od 1,01. Istraživanja su potvrdila prikladnost za svrhu predloženog NIR analitičkog sustava za određivanje udjela vode u liofiliziranom meningokoknom cjepivu serogrupa A i C.

Novim eksperimentalnim dizajnom (SAM) omogućena je jednoznačna interpretacija povezanosti selektiranih spektralnih varijabli i ciljnog analita - vode, uz konstantne sastojke matriksa.

Zaključno, procjena značajnosti ukupne proporcionalne pogreške upućuje na sposobnost točnije procjene prirasta odnosno razlika u udjelu vode ovom NIR analitičkom metodom u odnosu na referentnu Karl-Fischer metodu, s potencijalnom primjenom u stabilitetnim studijama te procjeni intra i inter varijabilnosti proizvodnih serija cjepiva.

Ključne riječi: Karl-Fischer titracija, liofilizirano cjepivo protiv meningokoka serogrupa A i C, NIR spektroskopija, određivanje udjela vode, profil točnosti

ABSTRACT

Lyophilization (freeze-drying) is widely applied for the preservation and storage of vaccines. Because for most freeze-dried products decomposition proceeds through hydrolysis, water content is the factor with the highest impact on quality and stability of the products. Karl-Fischer titration is an absolute method accepted as the standard method for water content determination in freeze-dried vaccines. Although this analytical technique is reliable under carefully controlled conditions, atmospheric moisture is the biggest single cause of error in Karl-Fischer titrations and may affect the results of water content determination in hygroscopic freeze-dried samples with extremely low water content.

Near-infrared (NIR) spectroscopy is increasingly applied technique for the quantification of water in freeze-dried products, as a non-destructive and rapid alternative to conventional analytical methods.

The purpose of this study was to assess the accuracy of a newly developed quantitative NIR analytical method for water content determination in a freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C by evaluating not only uncertainties associated with the NIR calibration model and NIR measurement procedures, but also systematic error arising from the reference Karl-Fischer method. Accuracy of reference values obtained by the reference method is essential to ensure the quality of a NIR model.

Nevertheless, a high correlation between residual water content determined in a freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C by standard Karl-Fischer volumetric method and relative humidity was observed. Therefore, a new reference Karl-Fischer volumetric method was developed based on dissolution of freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C in septum bottles to minimize interference from atmospheric moisture, and subsequently validated.

This study was conducted on 11 production batches of freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C in total divided into two sets - calibration set and optimization test set. Total sample set comprised a relatively large number of batches of freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C (n = 11) to encompass chemical and physical variabilities of the production process. While production samples alone provide a too narrow water content range, the desired water content range was obtained by overdosing production samples in the laboratory. NIR spectral variability arising from diffuse reflectance was reduced by standard normal variate (SNV) transformation to highlight important information regarding chemical composition. Furthermore, the spectral region between 5462-3842 cm^{-1} with a well-resolved

water-sensitive band corresponding to combination band of O–H stretching and H–O–H bending was selected. The specific samples to be included in calibration set and optimization test set were further evaluated by exploratory analysis based on principal components analysis (PCA). NIR prediction models based on partial least squares (PLS) were developed. Conventional criteria such as the coefficient of correlation (R^2 = 0,99), the root mean square of calibration (RMSEC = 0,18 %) and the root mean square of prediction (RMSEP = 0,14 %) enabled the selection of the preliminary NIR model with two PLS factors. However, such criteria did not clearly demonstrate the model's ability to give accurate predictions in future routine analysis. Consequently, a novel experimental design based on the standard addition method (SAM) in freeze-dried vaccines is proposed for total error assessment of the NIR analytical system. The multivariate calibration model, *i.e.* a PLS regression model with two factors applied to SNV-corrected NIR spectra in the 5462-3842 cm^{-1} range was selected as a candidate for total error assessment. Accuracy profile analysis based on the β-expectation tolerance interval (βETI) was used to evaluate the accuracy of the NIR analytical system and define a valid range of analyte content. The accuracy profile showed that the NIR model successfully determined water content over the 1.0 - 6.7 % range.

In addition, the water content in drug substances, purified meningococcal polysaccharides serogroups A and C was successfully determined by newly developed NIR methods using Karl-Fischer volumetric titration as a reference method. NIR calibration models were built using PLS regression analysis. The best calibration NIR models were obtained with SNV-corrected spectra over the 5500-3800 cm^{-1} spectral range. A coefficient of correlation R^2 value of 1.00 was obtained for a NIR model for water quantification in purified meningococcal polysaccharide serogroup A. An intercept value of 0.05 % and a slope of 1.00 were observed, while RMSEC and RMSEP were 0.18 % and 0.20 %, respectively. Subsequently, a coefficient of correlation R^2 value of 0.98, an intercept value of 0.23 %, a slope of 0.98, RMSEC of 0.18 % and RMSEP of 0.22 %, were obtained for a NIR model for water detremination in purified meningococcal polysaccharide serogroup C.

The present study showed that NIR spectroscopy is an excellent choice for the process analytical technology (PAT) concept as non-invasive, non-destructive and fast technique for water content determination in a freeze-dried meningococcal vaccine serogroups A and C as well as in drug substances, purified meningococcal polysaccharides serogroups A and C.

The novel SAM experimental design enabled overall proportional error assessment, which yielded a slope of 1.01. The present study confirmed the suitability of the proposed NIR analytical method for the determination of water content in freeze-dried meningococcal vaccine

serogroups A and C. Furthermore, the SAM provided constant sample matrix constituents, thus revealing the unequivocal association between the selected variables and the target analyte, *i.e.* water.

Finally, assessment of the overall proportional error proved that the NIR analytical method could be used to accurately estimate differences in water content, therein surpassing the reference method as the method of choice for determining intra- or inter-batch variability as well as stability.

Keywords: accuracy profile, freeze-dried meningococcal vaccine, Karl-Fischer titration, NIR spectroscopy, water content determination.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 3
2.1. Karl-Fischer titrimetrijska metoda 3
2.2. NIR spektroskopija 5
2.2.1. Tehnike snimanja NIR spektara 6
2.2.2. Teorija vibracijske spektroskopije 9
2.2.3. Interpretacija NIR spektara i kemometrijsko modeliranje 17
2.2.4. NIR spektroskopija u novim konceptima za dizajn, analizu i kontrolu farmaceutskih proizvodnih procesa 19
2.2.5. Primjena NIR analitičkih metoda 20
2.2.6. Razvoj i validacija NIR kvantitativnih analitičkih metoda 22
2.2.6.1. Formiranje uzoraka 23
2.2.6.2. Matematička transformacija spektralnih podataka 26
2.2.6.3. Regresija 31
2.2.6.4. Validacija 32
2.2.7. Utjecaj referentne metode na pouzdanost predikcije NIR multivarijatnog modela 36
2.3. Novi koncepti i metodologije u validaciji analitičkih metoda 38
2.3.1. Totalna pogreška i mjerna nesigurnost 39
2.3.2. Profil točnosti 43
2.3.3. Rizik dobivanja rezultata izvan granica prihvatljivosti 45
2.3.4. Sustavna pogreška 45
2.4. Statistička kontrola procesa (SPC) 47
2.4.1. Kontrolne karte 47
3. MATERIJALI I METODE 49
3.1. Materijali 49
3.1.1. Uzorci pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupa A i C i liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C 49
3.1.2. Standardi i kemikalije za Karl-Fischer volumetrijske titracije 49
3.1.3. Mjerni uređaji, instrumenti i programski paketi 50
3.1.4. Pribor 51
3.2. Metode 51
3.2.1. Karl-Fischer volumetrijske metode 51
3.2.1.1. Standardna Karl Fischer volumetrijska metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C 51
3.2.1.2. Referentna Karl-Fischer volumetrijska metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C 53
3.2.1.2.1. Test sukladnosti 55
3.2.1.2.2. Validacija 56
3.2.1.3. Karl-Fischer volumetrijska metoda za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i C 57

3.2.2. Spektroskopijske NIR metode ... 58
3.2.2.1. Spektroskopijska NIR metoda za određivanje udjela ostatne vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C ... 58
3.2.2.2. Spektroskopijska NIR metoda za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i C ... 60
3.2.3. Statistička analiza ... 61
3.2.3.1. Deskriptivna statistika ... 61
3.2.3.2. CuSum analiza ... 62
3.2.3.3. Test iskorištenja ... 63
3.2.3.4. Analiza varijance ... 63
3.2.3.5. Linearna regresija ... 64
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 66
4.1. Određivanje udjela ostatne vode u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom ... 66
4.2. Razvoj i validacija referentne Karl-Fischer metode za određivanje ostatne vode u cjepivu protiv meningokoka grupe A i C ... 81
4.2.1. Test sukladnosti ... 82
4.2.2. Odstupanje od prave vrijednosti ... 84
4.2.3. Preciznost ... 87
4.2.3.1. Preciznost- standard s 1 % vode ... 87
4.2.3.2. Preciznost- liofilizirano cjepivo protiv meningokoka serogrupa A i C ... 89
4.2.4. Linearnost ... 96
4.3. Razvoj i validacija kvantitativne NIR metode za određivanje udjela ostatne vode u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C ... 99
4.3.1. Razvoj i optimizacija NIR kalibracijskog modela ... 99
4.3.1.1. Formiranje kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta ... 99
4.3.1.2. Snimanje NIR spektara ... 100
4.3.1.3. Određivanje referentnih vrijednosti udjela vode ... 101
4.3.1.4. Matematička transformacija i selekcija varijabli NIR spektra ... 103
4.3.1.5. PCA eksploracijska analiza ... 107
4.3.1.6. Multivarijatna regresija ... 110
4.3.2. Procjena prikladnosti za svrhu NIR analitičkog sustava na temelju procjene ukupne pogreške ... 113
4.3.2.1. Novi eksperimentalni dizajn za procjenu ukupne pogreške NIR analitičkog sustava ... 114
4.3.2.2. Odstupanje od prave vrijednosti ... 120
4.3.2.3. Preciznost ... 121
4.3.2.4. Točnost ... 123
4.3.2.5. Linearnost ... 126
4.3.2.6. Granica kvantifikacija ... 129
4.3.3. Proporcionalna i konstantna sustavna pogreška NIR analitičkog sustava ... 130
4.4. Razvoj i validacija novih NIR metoda za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i C ... 132

4.4.1. Razvoj i validacija nove NIR metode za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A 132
4.4.1.1. Formiranje podgrupa uzoraka 132
4.4.1.2. Snimanje NIR spektara 132
4.4.1.3. Određivanje referentnih vrijednosti udjela vode 134
4.4.1.4. Matematička transformacija i selekcija varijabli NIR spektra 135
4.4.1.5. Formiranje kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta 137
4.4.1.6. Multivarijatna regresija 140
4.4.1.7. Validacija NIR kalibracijskog modela 144
4.4.2. Razvoj i validacija nove NIR metode za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C 146
4.4.2.1. Formiranje podgrupa uzoraka 146
4.4.2.2. Snimanje NIR spektara 146
4.4.2.3. Određivanje referentnih vrijednosti udjela vode 148
4.4.2.4. Matematička transformacija i selekcija varijabli NIR spektra 149
4.4.2.5. Formiranje kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta 151
4.4.2.6. Multivarijatna regresija 153
4.4.2.7. Validacija NIR kalibracijskog modela 156
5. ZAKLJUČCI 159
6. LITERATURA 162

1. UVOD

Voda je kritičan parametar kvalitete s ključnim utjecajem na sigurnost i djelotvornost farmaceutskih proizvoda. Naime, voda značajno utječe na fizikalno-kemijska svojstva kao i mikrobiološku ispravnost djelatnih tvari i gotovih proizvoda (Yoshioka i Stella, 2000). Apsorbirana voda može izazvati kemijsku razgradnju različitim mehanizmima (1) kao reaktant u kemijskoj reakciji, (2) kao produkt specifične reakcije, (3) promjenom polarnosti i reaktivnosti susjednih molekula. Kod većine liofiliziranih materijala razgradnja se odvija reakcijama hidrolize, pri čemu brzina reakcija hidrolize ovisi o udjelu vode u ovim materijalima (Derksen i sur., 1998).

Karl-Fischer titrimetrijska metoda je ustanovljena kao standardna metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranim cjepivima (Clavaud i sur., 2016). Nedostaci Karl-Fischer metode su dugo trajanje analize, korištenje toksičnih reagensa, te destrukcija testnog uzorka (Stockvold i sur., 2002). Dodatno, ova destruktivna metoda nije prikladna kao stabilitetno-indikativna metoda (SIM), jer koristi različite uzorke u različitim testnim točkama, čime se smanjuje sposobnost predikcije stabilitetne studije (Clavaud i sur., 2016).

U posljednje vrijeme sve su izraženija nastojanja u farmaceutskoj i biotehnološkoj proizvodnji da se konvencionalne analitičke metode zamjene pouzdanim, brzim, ekološki prihvatljivijim, neinvazivnim analitičkim tehnikama, koje ne mijenjaju izvorna svojstva uzorka.

Spektroskopijske metode bliskoga infracrvenoga zračenja (NIR) istaknute su kao instrumentalne tehnike koje ispunjavaju sve navedene kriterije (Mantanus i sur., 2009), te se stoga vrlo često povezuju s novim konceptima za dizajn, analizu i kontrolu farmaceutskih i biotehnoloških proizvodnih procesa, kao što su npr. procesna analitička tehnologa (engl. *Process Analytical Technology*, PAT), koncept projektiranja procesa (engl. *Quality by Design*, QbD), te zelene kemije (engl. *Green chemistry*) (De Bleye i sur., 2012). Primjena NIR metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranim proizvodima je u značajnom porastu (Brülls i sur., 2007, Clua-Palau i sur., 2020, Lakeh i sur., 2020, i dr.) iako je razvoj kvantitativnih spektroskopijskih NIR metoda značajno složeniji proces od razvoja konvencionalnih analitičkih metoda i zahtijeva uporabu kemometrije (Hopke, 2003).

NIR spektri sadrže kompleksne analitičke informacije pohranjene u brojnim spektralnim varijablama i to o ciljnom analitu i drugim sastojcima matriksa. Primjenom kemometrije u NIR spektroskopiji moguće je analizirati veliki broj fizikalnih i kemijskih parametara kvalitete i to uspostavom novih, različitih NIR multivarijatnih modela. Ekstrakcija relevantnih spektralnih podataka iz kompleksnih NIR spektara primjenom kemometrijskih algoritama se temelji na najboljoj korelaciji s referentnim vrijednostima. Shodno tome, pogreška referentne metode

ugrađuje se kroz referentne vrijednosti u NIR kalibracijski model, te pogrešku nije moguće detektirati ni u fazi validacije NIR kalibracijskog modela.

Metodologije validacije spektroskopijskih NIR analitičkih metoda u farmaceutskoj i biotehnološkoj proizvodnji, koje se temelje na tradicionalnim kemometrijskim parametrima i/ili ICH (Q2) regulatornim kriterijima su nedostatne sa stajališta procjene prikladnosti za svrhu i vrednovanja pouzdanosti rezultata (De Bleye i sur., 2012).

Nova nastojanja usmjerena su na razvoj novih koncepcija validacije, ne samo na numeričkoj već i na konceptualnoj razini. Sastavni dio tih novih koncepcija je procjena rizika temeljena na mjernoj nesigurnosti i ukupnoj pogrešci koja osigurava da svako rutinsko mjerenje u budućnosti bude dovoljno blizu nepoznatoj pravoj vrijednosti. Profil točnosti temeljen na ukupnoj pogrešci statistički je alat koji omogućava da se već u fazi validacije analitičke metode analiziraju buduće izvedbene karakteristike analitičke metode u odnosu na zadanu granicu prihvatljivosti.

Međutim, za procjenu ukupne pogreške NIR analitičkog sustava za određivanje udjela vode u liofiliziranim cjepivima, koja uključuje i pogrešku referentne Karl-Fischer metode, neophodne su referentne vrijednosti za koje je mjerna nesigurnost za udjel vode zanemariva u odnosu na ukupnu mjernu nesigurnost. Imajući u vidu da za validaciju metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranim cjepivima nisu dostupni certificirani referentni materijali niti slijepe probe, koje bi po svim drugim fizikalno-kemijskim svojstvima bile istovjetne uzorcima liofiliziranih cjepiva, u novom konceptu validacije nedostaje eksperimentalni dizajn koji će omogućiti procjenu prikladnosti za svrhu analitičkih metoda za određivanje udjela vode u liofilizatima općenito (Gonzales i sur., 1999).

Stoga je cilj ovog doktorskog rada bio istražiti i evaluirati mogućnost primjene inovativnoga eksperimentalnoga dizajna i kvantitativnih spektroskopijskih NIR metoda s kemometrijom za praćenje kritičnog parametra kvalitete liofilizata - udjela vode u svim fazama proizvodnje cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C prema sustavnom PAT pristupu.

Istraživanje će obuhvatit analizu utjecaja relativne vlažnosti zraka na rezultate određivanja udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom te razvoj i validaciju nove referentne Karl-Fischer volumetrijske metode bez značajne sustavne pogreške. U svrhu analize prikladnosti za svrhu nove NIR analitičke metode za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C, uz predikciju budućih izvedbenih karakteristika prema konceptu ukupne pogreške koja uključuje pogrešku referentne metode, primjenit će se novi eksperimentalni dizajn temeljen na metodi standardnog dodavanja (Mandac Zubak i sur., 2020).

2. OPĆI DIO

2.1. Karl-Fischer titrimetrijska metoda

Karl-Fischer reakcija (Fischer, 1935) predstavlja modifikaciju reakcije (Bunsen, 1853):

$$I_2 + SO_2 + 2H_2O \rightarrow 2HI + H_2SO_4$$

Karl-Fischer titrimetrijska metoda je apsolutna metoda određivanja vode koja se temelji na stehiometrijskoj reakciji vode i joda u nevodenom mediju u prisutnosti baze s dovoljnim puferskim kapacitetom uz suvišak sumporovog dioksida. Poboljšanje točnosti i brzine titracije ostvareno je razvojem Karl-Fischer reagensa bez piridina s imidazolom kao bazom te detaljnim izučavanjem stehiometrijskih odnosa (Scholz, 1982). Temeljem stehiometrijskih analiza potvrđeno je da u prvom stupnju reakcije nastaje bazični alkil sulfit:

$$ROH + SO_2 + RN \rightarrow [RNH]SO_3R$$

U drugom stupnju odvija se oksido-redukcijska reakcija:

$$[RNH]SO_3R + H_2O + I_2 + 2RN \rightarrow [RNH]SO_4R + 2[RNH]I$$

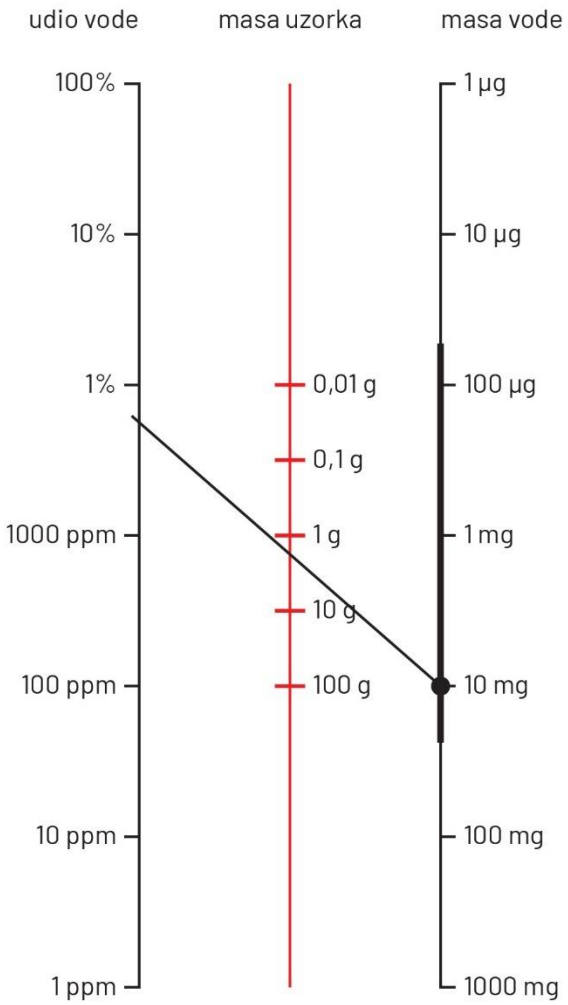
Razlikuju se dvije osnovne tehnike Karl-Fischer titrimetrijskih metoda: volumetrijska semi-mikro metoda i kulometrijska mikro-metoda. U volumetrijskoj titraciji, voda se kvantitativno određuje na temelju volumena utrošenog reagensa dok se u kulometrijskoj titraciji mjeri količina elektriciteta proteklog tijekom elektrolize.

Karl-Fischer metoda je apsolutna metoda te je pouzdana u kontroliranim uvjetima. Ipak, različiti faktori mogu utjecati na točnost rezultata Karl-Fischer titracije, kao što su: atmosferska vlaga, pH vrijednost uzorka, sporedne reakcije između uzorka i Karl-Fischer reagensa, npr. u prisutnosti ketona ili aldehida (Chen i Wang, 2009). Od svih navedenih faktora atmosferska vlaga je najznačajniji izvor sustavne pogreške i može značajno utjecati na rezultate određivanja vode u jako higroskopnim uzorcima s niskim udjelom vode poput liofiliziranih cjepiva (Stokvold i sur., 2002).

Kompleksnost razvoja Karl-Fischer metode za određivanje vode zahtijeva sustavan pristup, koji uključuje postupak priprave uzorka bez značajne apsorpcije atmosferske vlage, istraživanje topljivosti testnog uzorka u nevodenom Karl-Fischer otapalu, ispitivanje kompatibilnosti uzorka s Karl-Fischer reagensima, odabir optimalnih parametara kontrole i parametara

završetka titracije te odabir optimalne mase uzorka za titraciju (Slika 1.). Značajna je optimalna kontrola titracije, pri čemu brzina titracije ovisi o: brzini reakcije između titranta i uzorka, brzini miješanja u posudi za titraciju, kontrolnim algoritmima i kontrolnim parametrima te završnoj točci titracije. Brzina reakcije između reaktanata ovisi o koncentraciji vode, koncentraciji sumporovog dioksida, koncentraciji joda te pH vrijednosti otopine. Kontrolni parametri su: najmanji ($\Delta v_{min,}$ µl) i najveći volumen ($\Delta v_{max,}$ µl) dodanog titranta u vremenskom intervalu od 0,1s; Δv_{max} faktor (%) koji definira redukciju maksimalnog volumena pred kraj titracije te jakost struje polarizacije I_{pol} (µA).

Sukladno tome, predlaže se projektiranje procesa (engl. *Quality by Design*, QbD) u razvoju novih Karl-Fischer metoda te procjena rizika (Zhou i sur., 2010).



Slika 1. Smjernice za odabir optimalne mase uzorka za udjel vode od 1000 ppm do 100% u uzorku (prilagođeno iz Mettler Toledo, 2003).

Nedostaci Karl-Fischer titracije su: dugotrajna analiza, destrukcija uzorka, uporaba toksičnih reagensa koji su štetni za okoliš i ljudsko zdravlje. Vrlo često se Karl-Fischer titracija provodi na reduciranoj veličini uzorka uz uvažavanje principa prihvatljive razine kvalitete (engl. *Acceptance Quality Limit,* AQL) s ciljem smanjenja troškova kontrole kvalitete, koji su djelomično povezani i s visokom vrijednosti farmaceutskih i općenito biotehnoloških formulacija. Redukcijom veličine uzorka prihvaća se i povećan rizik da uzorak neće biti reprezentativan za populaciju koju predstavlja. Nadalje, uzorci liofiliziranog gotovog proizvoda nisu homogeni unutar serije, već postoji određena varijabilnost između bočica s liofilizatom obzirom kako na udjel vode tako i na fizikalno stanje vode u liofilizatu. Varijabilnost unutar serije utječe na pouzdanost procjene korelacije udjela vode i rezultata drugih stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda, poput sadržaja djelatne tvari ili onečišćenja, uključujući i razgradne produkte. Isto tako, varijabilnost unutar serije utjecat će i na točnost izračuna sadržaja određene supstancije na suhu tvar uzorka, bilo da se radi o aktivnoj farmaceutskoj supstanciji ili onečišćenju (Jančić Stojanović i sur., 2012). Nadalje, u stabilitetnoj studiji, u svakoj testnoj točci određivanje vode provodi se na drugom uzorku, te varijabilnost unutar serije utječe na pouzdanost predikcije stabilitetne studije (Derksen i sur., 1998).
Karl-Fischer titracija je prihvaćena kao standardna metoda za određivanje vode u liofiliziranim cjepivima (Ph. Eur., 2019).

2.2. NIR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (engl. *infrared spectroscopy*) proučava interakcije tvari s elektromagnetskim zračenjem u rasponu valnih brojeva ($\tilde{\nu}$) od 12500 cm^{-1} do 10 cm^{-1} (Harris i Bertolucci, 1989). Infracrveno spektralno područje dijeli se na: blisko infracrveno (eng. *Near-infrared*, NIR), srednje infracrveno (eng. *midle infrared*, MIR) i daleko infracrveno (eng. *Far-infrared*, FIR).
Dok se kod atomskih spektara javljaju samo promjene energije izazvane prijelazima elektrona, kod molekulskih spektara moguće su i promjene energije uslijed vibracijskih i rotacijskih prijelaza. Apsorpcija u infracrvenom području odgovara promjenama vibracijskih stanja u molekuli, te se infracrvena spektroskopija naziva i vibracijska spektroskopija.

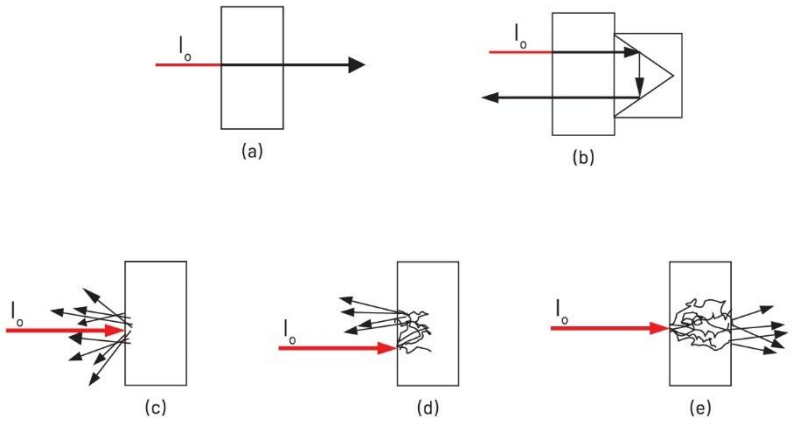
Vibracijska spektroskopija obuhvaća nekoliko različitih tehnika od kojih su najvažnije srednja infracrvena (MIR), bliska infracrvena (NIR) i Raman spektroskopija (Larkin, 2018; Ozaki, 2012).

Spektralne informacije za kvalitativne i kvantitativne NIR modele dobivaju se izlaganjem uzoraka elektromagnetskom zračenju u rasponu valnih duljina (λ) od 750 nm do 2500 nm, odnosno valnih brojeva ($\tilde{\nu}$) od 13333 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} (Pasquini, 2018). Izvor NIR spektara je elektromagnetsko zračenje kojem odgovara energija fotona (hν) u rasponu od 2,65 x 10^{-19} J do 7,96 x 10^{-20} J, pri čemu se apsorbirana energija zračenja prevodi u mehaničku energiju povezanu s gibanjima atoma unutar molekule (Pasquini, 2003).

Energija fotona karakteristična za NIR spektralno područje viša je od energije potrebne za pobuđivanje osnovnih vibracijskih prijelaza, te uglavnom niža od energije elektronskih prijelaza u molekulama. Shodno tome, za razliku od drugih vibracijskih spektroskopija, srednje infracrvene (MIR) i daleke infracrvene (FIR) spektroskopije, interakcija elektromagnetskog zračenja u NIR spektralnom području odvija se prvenstveno pobuđivanjem gornjih ili viših tonova (engl. *overtones*), kombinacija (engl. *combinations*) i rezonancija (engl. *resonance*) koje uključuju osnovna vibracijska stanja molekula (Siesler i sur, 2002; Pasquini, 2018). Elektronski prijelazi iako svojstveni za vidljivi i ultraljubičasti dio spektra, mogući su i u NIR spektralnom području, osobito u rasponu valnih duljina (λ) između 780 nm i 1100 nm. Elektronski prijelazi u NIR spektralnom području javljaju se u oksidima rijetkih zemnih elemenata, te su manje značajni sa stajališta analitike (Williams i Norris, 2001;Pasquini 2003, Ozaki, 2012).

2.2.1. Tehnike snimanja NIR spektara

Različiti načini mjerenja izazvane interakcije NIR elektromagnetskog zračenja i tvari, transmitancija (engl. *transmittance*), transrefleksija (engl. *transreflectance*), difuzna refleksija (engl. *diffuse reflectance*), tehnika interakcije (engl. *interactance*), tehnika transmitancije kroz medij koji raspršuje svijetlost (engl. *transmitance through scattering medium*), mogu se ostvariti različitim geometrijskim postavkama izvora zračenja, uzorka te detektora koji se koriste za prikupljanje analitičkih spektralnih informacija o uzorku (Slika 2.) (Williams i Norris, 2001;Pasquini, 2003; Ozaki, 2012).



Slika 2. Tehnike mjerenja u NIR spektroskopiji. a) transmitancija, b) transrefleksija, c) difuzna refleksija, d) interakcija, e) transmitancija kroz medij koji raspršuju svijetlost (prilagođeno iz Pasquini 2003).

Geometrija izvora elektromagnetskog zračenja s jedne i detektora s druge strane analiziranog uzorka postavke su tehnike transmitancije koja se temelji na transmisiji elektromagnetskog zračenja kroz transparentan uzorak. Mjeri se energija zračenja propuštena kroz uzorak (Slika 2a.).

Transrefleksija je modifikacija transmisije pri čemu se geometrijskim postavkama udvostručuje optički put (engl. *optical path*), tj. zraka svjetlosti usmjerava se i povratno kroz uzorak (Slika 2b.).

Interaktivna tehnika mjerenja temelji se na povećanoj vjerojatnosti interakcije upadne zrake i uzorka, te sukladno tome prikupljene informacije znatno bolje opisuju sastav uzorka tj konstituente (Slika 2d.).

Tehnika mjerenja transmitancije kod gustih čvrstih uzoraka prikladna je za kvantitativno određivanje aktivne tvari u farmaceutskim tabletama, jer prikupljene informacije bolje koreliraju s prosječnim sastavom uzorka zbog unutrašnjeg raspršenja zračenja na duljem optičkom putu (Slika 2e.).

U NIR spektroskopiji prevladava tehnika difuzne refleksije, zbog neinvazivne interakcije čvrstog uzorka i zračenja (Slika 2c.), (Burns i Ciurczak, 2008). Općenito, refleksija zračenja može biti difuzna i spekularna. Spektri u kojima prevladava spekularna ili zrcalna refleksija nemaju finu strukturu i ne sadrže informacije o kemijskim svojstvima uzorka. Stoga se ovi

spektri ne mogu korigirati matematičkim transformacijama, već se svode na najmanju moguću mjeru instrumentalnim dizajnom. Difuzno reflektirana svijetlost, koja se reflektira u velikom broju smjerova, primarni je izvor informacije u NIR spektrima. Apsorpcija i raspršenje zraka na čvrstim česticama uzorka su osnovni fenomeni koji utječu na spektar dobiven difuznom refleksijom (Pasquini, 2018). U skladu s tim, spektar snimljen tehnikom difuzne refleksije ne sadrži samo informacije o kemijskom sastavu uzorka (apsorpcija) već i o njegovoj mikrostrukturi (raspršenje) (Rinnan i sur., 2009). Prisutnost efekata raspršenja zračenja otežava interpretaciju NIR spektara, te se za uklanjanje ovih efekata kako bi se polučio apsorpcijski spektar, primjenjuju *soft model-free* matematičke metode obrade. Spektar dobiven difuznom refleksijom primarno je odraz interakcija površinskog sloja uzorka i elektromagnetskog zračenja. Linearnu zavisnost koncentracije (c) i difuzne refleksije elektromagnetskog zračenja opisuje Kubelka i Munk jednadžba (Kubelka i Munk, 1931):

$$f(c) = \frac{(1-R)^2}{2R} \tag{2.1.}$$

$$R = \frac{I_R}{I_{R0}} \tag{2.2.}$$

gdje je

R koeficijent refleksije (engl. *reflectance*);

I_R intenzitet zračenja nakon refleksije na uzorku;

I_{R0} intenzitet zračenja nakon refleksije na neapsorbirajućem materijalu.

U primjeni je jednostavnija izvedenica Kubelka-Munk jednadžbe:

$$f(c) = log\frac{1}{R} \tag{2.3.}$$

Spektar se prikazuje kao intenzitet, apsorbancija (engl. *absorbance, A*) ili transmitancija (engl. *transmittance, T*) prema valnom broju (engl. *wavenumber,* $\tilde{\nu}$). Valni broj je proporcionalan razlici energije između osnovnog i pobuđenog vibracijskog stanja molekule. Transmitancija (propusnost) je mjera intenziteta zračenja kao funkcija valne duljine nakon prolaska odnosno transmisije zrake kroz uzorak, prema jednadžbi:

$$T\ (\%) = \ 100\frac{I}{I_0} \tag{2.4.}$$

gdje je

I intenzitet transmitiranog (propuštenog) zračenja;

I_0 intenzitet upadnog zračenja.

Apsorbancija je mjera intenziteta apsorbiranog zračenja kao funkcija valne duljine (λ), te je povezana s transmitancijom logaritamskom funkcijom prema sljedećoj jednadžbi:

$$A = \ log\frac{1}{T} \tag{2.5}$$

gdje je

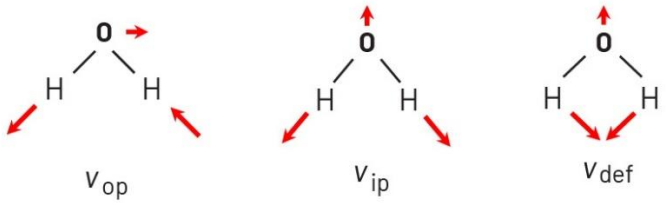
T transmitancija.

2.2.2. Teorija vibracijske spektroskopije

Iako su vibracije u poliatomskim molekulama vrlo složene u usporedbi s dvoatomskim molekulama, sva vibracijska gibanja moguće je izvesti superpozicijom osnovnih vibracijskih modova (engl. *normal modes of vibration*). Općenito, gibanja u molekuli koja su posljedica karakterističnih vibracija, opisana su stupnjevima slobode te će nelinearna molekula s *n* atoma imati *3n-6* osnovnih modova vibracije, dok će za linearnu molekulu broj stupnjeva slobode koji opisuju vibracijska gibanja iznositi *3n-5* (Harris i Bertolucci, 1989; Wilson i sur., 1980; Larkin, 2018).

Osnovne molekulske vibracije čine vibracije istezanja (engl. *stretch*) odnosno kontinuirana promjena internuklearne udaljenosti duž osi koja spaja dva vezana atoma i vibracije svijanja (engl. *deformation or bending*), tijekom kojih se periodički mijenja kut između veza. Vibracije istezanja javljaju se pri kraćim valnim duljinama elektromagnetskog zračenja u odnosu na vibracije svijanja. Nadalje, vibracije istezanja mogu biti simetrične i asimetrične. Upravo klasifikacija molekula po simetriji omogućuje razumijevanje odnosa između molekularne strukture i vibracijskog spektra.

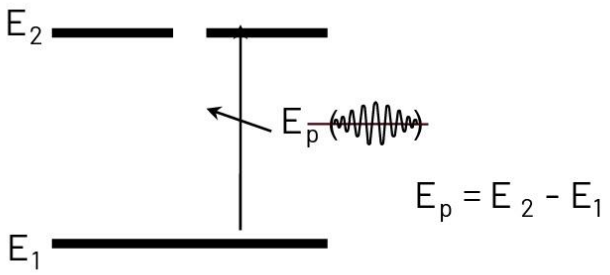
Molekuli vode pridružene su tri osnovne vibracije prema formuli za stupnjeve slobode nelinearne molekule *3n-6* (Slika 3.). Tri osnovne vibracije uključuju simetrično istezanje (engl. *in-phase or symmetric stretch*), asimetrično istezanje (engl. *out-of-phase or asymmetric stretch*), te svijanje (engl. *deformation or bending*) (Larkin, 2018).



Slika 3. Gibanja unutar molekule koja utječu na promjenu udaljenosti između atoma u molekuli vode a) asimetrična (engl. *out-of-phase*) istezanja ν_{op} b) simetrična (engl. *in-phase*) istezanja ν_{ip} c) deformacija ili svijanje ν_{def} (prilagođeno iz Larkin, 2018).

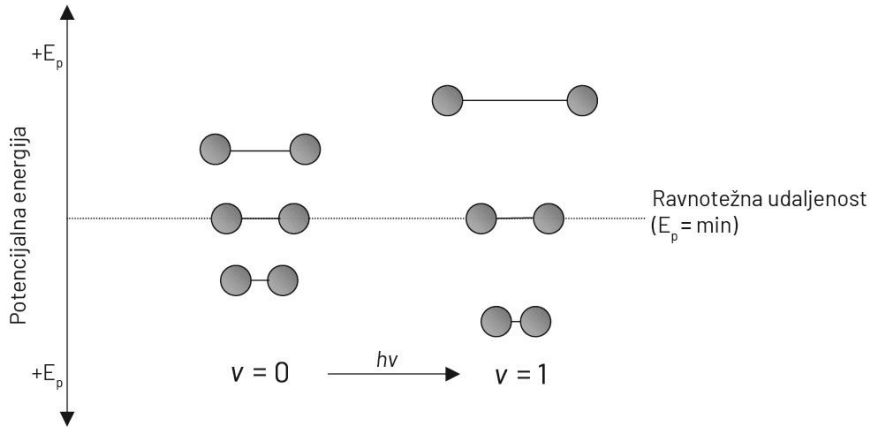
Frekvencija periodičkih gibanja svih atoma unutar molekule u kartezijevom koordinatnom sustavu je istovjetna te svi atomi istodobno prolaze kroz položaj ravnoteže. Pri tom se centar mase ne miče i molekula ne rotira. Relativne vibracijske amplitude mogu se razlikovati u veličini ili smjeru (Larkin, 2018).

Za apsorpciju elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području značajna su frekvencija zračenja i dipolni moment (Larkin, 2018). Molekula apsorbira elektromagnetsko zračenje određene frekvencije čija energija točno odgovara razlici energije između dvaju vibracijskih stanja te prelazi u viša vibracijska energetska stanja (Slika 4.) (Burns i Ciurczak, 2008).



Slika 4. Apsorpcija elektromagnetskog zračenja (prilagođeno iz Larkin, 2018).

Prijelazi između različitih energetskih stanja neke molekule uvijek odgovaraju apsorpciji po jednog fotona određene energije, čime je određena frekvencija apsorbiranog zračenja. Prijenosom energije fotona molekula se prevodi u više energetsko stanje tj. povećava se amplituda vibracije (Slika 5.).



Slika 5. Promjena potencijalne energije i amplitude uslijed apsorpcije energije fotona (prilagođeno iz Pasquini 2003).

Razlike energije između dvaju vibracijskih stanja i njima pridružene energije fotona, tj. frekvencije apsorbiranog zračenja karakteristične su za molekule te čine osnovu selektivnog odgovora molekulskog sustava na upadno zračenje (engl. *incident radiation*). Shodno tome frekvencija NIR elektromagnetskog zračenja podudara se s frekvencijama viših tonova te frekvencijama kombinacija osnovnih vibracijskih modova.

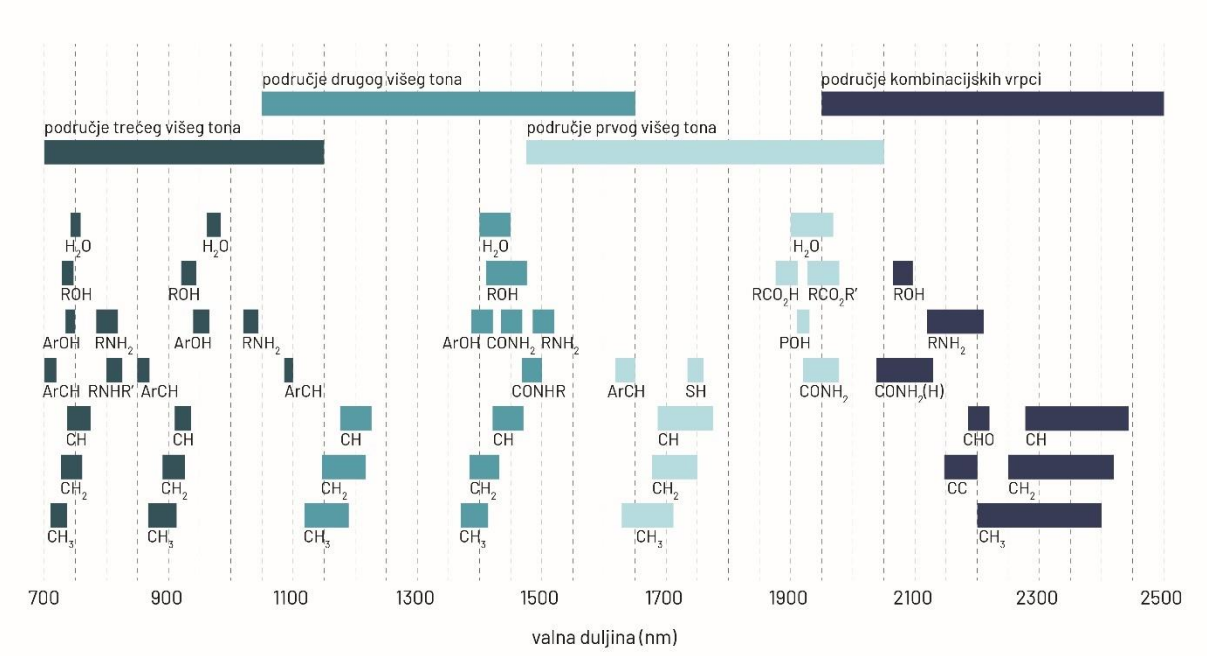
Pri sobnoj temperaturi većina molekula je u osnovnim vibracijskim energetskim nivoima (Burns i Ciurczak, 2008). Atomi ili grupe atoma povezani kemijskim vezama osciliraju određenom frekvencijom. Frekvencija molekulskih vibracija ovisi o masi atoma, njihovom geometrijskom rasporedu te jakosti kemijskih veza (Larkin, 2018).

Vibracijskom prijelazu između osnovnog stanja i prvog energetskog nivoa odgovara fundamentalna ili osnovna vibracijska vrpca, dok se prijelazi između osnovnog stanja i drugog, trećeg ili viših energetskih nivoa nazivaju viši ili gornji tonovi (engl. *overtone*), što odgovara gornjim vibracijskim vrpcama. Istaknuta značajka NIR spektra pojava je brojnih kombinacija

(engl. *combination*) koje nastaju adicijom ili subtrakcijom energija dvaju ili više vibracija čime nastaje jedna kombinacijska vrpca (engl. *combination band*) (Burns i Ciurczak, 2008).

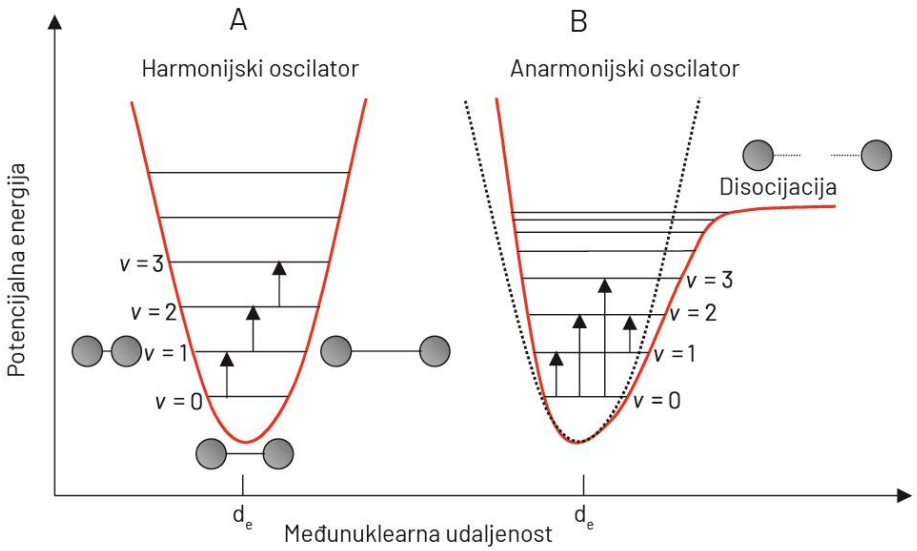
Složenost NIR spektra povećavaju rezonancije (engl. *resonance*) između vibracija iste funkcionalne grupe koje uključuju interakcije s osnovnim vibracijskim stanjem. Fermi rezonancija se javlja između osnovnog stanja i višeg tona kad je pripadna razlika energije vrlo mala, što dovodi do jačeg razdvajanja dviju vrpca i pojačanog intenziteta vrpce višeg tona. Darling Dennison rezonacija može izazvati interakciju između dvaju viših tonova viših redova i kombinacije. Posljedica oba tipova rezonancije u NIR spektru je mogućnost pojave dviju umjesto jedne vrpce u NIR spektralnom području kombinacija (1600 nm-2500 nm) (Pasquini, 2003).

U vibracijskom spektru mogu se približno naznačiti spektralne regije za karakteristične vibracijske prijelaze te pripadne relativne pozicije pojedinih funkcionalnih grupa (Slika 6.).



Slika 6. Relativne pozicije vrpca pojedinih funkcionalnih grupa u NIR području elektromagnetskog zračenja (prilagođeno iz Metroohm, 2013).

Najjednostavniji model koji opisuje koncept molekulske vibracije, odnosno interakciju elektromagnetskog zračenja i tvari u NIR spektralnom području predstavlja harmonijski oscilator (Slika 7A.) (Brdička, 1969; Pasquini, 2003; Larkin, 2018; Bokobza, 1998).



Slika 7. Krivulja potencijala harmonijskog i anharmonijskog oscilatora s energetskim nivoima vibracije; d_e označava internuklearnu udaljenost (prilagođeno iz Pasquini, 2003).

Potencijalna energija harmonijskog oscilatora (E) je funkcija pomaka atoma iz ravnotežnog položaja, koji odgovara minimalnoj energiji, kako je to opisano donjom jednadžbom.

$$E = \frac{1}{2} kx^2 \qquad (2.6.)$$

gdje je

x internuklearna udaljenost;

k konstanta sile veze.

Krivulja potencijala dvoatomskog sustava koja predočava zavisnost potencijalne energije o amplitudi kod harmonijskog oscilatora je parabola simetrična obzirom na ravnotežnu internuklearnu udaljenost (Slika 7A.). Potencijalna energija harmonijskog oscilatora se kontinuirano mijenja, poprima minimalnu vrijednost kad se atomi nađu u položaju ravnoteže, odnosno maksimalnu vrijednost kad se atomi približe na najmanju udaljenost odnosno

razmaknu na najveću udaljenost. Vibracijska energija molekulskih sistema ne prati kontinuirani energetski profil, već može poprimiti samo diskretne energetske vrijednosti, u skladu s kvantnom mehanikom (Wilson i sur., 1980), prema jednadžbi:

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) hv \qquad (2.7.)$$

gdje je

v vibracijski kvantni broj (0,1,2..);

h Planckova konstanta (h = 6,6260693 . 10^{-34} J s);

v fundamentalna frekvencija vibracije.

Apsorbirana energija elektromagnetskog zračenja (ΔE), koja prevodi molekulu u pobuđeno stanje, odgovara razlici energije između dvaju energetskih nivoa, čime je zadana energija fotona, prema donjoj jednadžbi:

$$\Delta E = E_{v_2} - E_{v_1} = \Delta v h v \qquad (2.8.)$$

Energije vibracije koje su moguće prikazuju se ekvidistantnim pravcima (Slika 7A.). Prema modelu harmonijskog oscilatora mogući su vibracijski prijelazi između susjednih energetskih nivoa tj. $\Delta v = \pm 1$.

Anharmonijski oscilator znatno bolje opisuje stvarnu strukturu vibracijskih spektara te uzima u obzir da udaljenosti između atoma ne mogu biti po volji malene zbog odbijanja elektronskih oblaka niti po volji velike zbog disocijacije atoma (Slika 7B.). Potencijalna energija anharmonične dvoatomske molekule može se izraziti aproksimativno jednadžbi prema Morse jednadžbi:

$$V = D_e \left[1 - e^{-a(r - r_e)}\right]^2 \qquad (2.9.)$$

gdje je

D_e spektralna energija disocijacije;

a konstanta karakteristična za molekulu;

r_e ravnotežna udaljenost između atomskih jezgri;

r udaljenost između atomskih jezgri.

Energija za moguće energetske nivoe može se izračunati pomoću valne mehanike prema jednadžbi:

$$E = hv\left(v + \frac{1}{2}\right) - x_m hv\left(v + \frac{1}{2}\right)^2 \quad (2.10.)$$

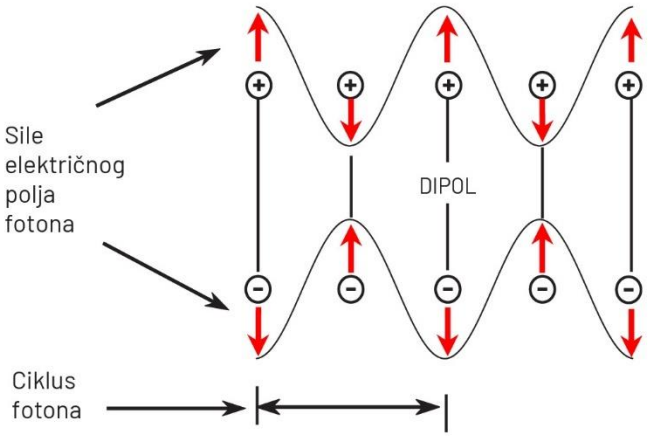
gdje je

x_m konstanta anharmoničnosti vibracije.

Odstupanja od harmonijskog oscilatora veća su pri višim vibracijskim kvantnim brojevima. Razlike energije između susjednih vibracijskih stanja nisu konstantne, već se smanjuju s porastom vibracijskog kvantnog broja (Harris i Bertolucci, 1989; Wilson i sur., 1980).
U slučaju harmonijskog oscilatora mogući su samo osnovni prijelazi na susjedne energetske nivoe (engl. *fundamental transition*), dok su kod anharmonijskog oscilatora mogući iako s malom vjerojatnosti i prijelazi na viša vibracijska stanja $\Delta v = \pm 2, \pm 3$, koji odgovaraju višim ili gornjim tonovima i kombinacijama. Prijelazi na viša vibracijska stanja su manje vjerojatni od osnovnih prijelaza pa su shodno tome i slabijeg intenziteta. Apsorpcijski koeficijenti u NIR spektralnom području su 10 do 1000 puta manji od apsorpcijskih koeficijenata u MIR spektralnom području, gdje bivaju pobuđeni osnovni prijelazi (Burns i Ciurczak, 2008; Blanco i Villarroya, 2002). U slučaju anharmonijskog modela vibracije nisu više nezavisne jedna o drugoj te mogu stupiti u interakciju. To je naročito važno za višeatomske molekule za koje je karakteristična anharmoničnost. U skladu s tim ukupna vibracijska energija molekule sadrži i *cross-terms* više od jedne vibracije u molekuli (Pasquini, 2003).

U slučaju infracrvenog zračenja da bi molekula apsorbirala energiju fotona, mora postojati i interakcija električnog oscilirajućeg polja elektromagnetskog vala i električnog polja molekule (Larkin, 2018). Da bi molekula apsorbirala zračenje i bila prevedena u stanje više vibracijske energije, uz povećanje vibracijske amplitude, mora postojati permanentni oscilirajući dipol, pri čemu periodičko pomicanje vezanih atoma prati promjena dipolnog momenta. Naime, NIR aktivno vibracijsko stanje podrazumijeva da pomak atoma u vibracijskim stanjima mora pratiti promjena dipolnog momenta molekule ili lokalnih grupa unutar molekule. U slučaju kombinacija dostatno je da je jedna vibracija NIR aktivna, odnosno izaziva promjenu dipola (Pasquini, 2003).

Oscilirajuće električno polje fotona stvara oscilirajuće suprotno usmjerene sile na pozitivne i negativne naboje molekularnog dipola (Slika 8.). Frekvencija oscilacije dipola istovjetna je frekvenciji fotona upadnog zračenja (engl *incident photon*).



Slika 8. Oscilirajuće električno polje molekularnog dipola (prilagođeno iz Larkin, 2018).

Intenzitet apsorpcije NIR zračenja ovisi o stupnju električne i mehaničke anharmoničnosti vibracijskog moda i promjeni dipolnog momenta kojeg izazivaju vibracije (Pasquini, 2018). Naime, anharmoničnost se očituje i kao elekrično svojstvo molekule jer u anharmoničnom modelu promjena dipolnog momenta nije linearno proporcionalna promjeni položaja atoma. Polarne kemijske veze dovode do izrazito anharmoničnih vibracijskih stanja. Jaka apsorpcija NIR zračenja molekule vode upravo je posljedica asimetričnog istezanja kisikovih i vodikovih veza u molekuli vode. NIR aktivna stanja uglavnom su povezana s izraženim anharmonijskim vibracijama funkcionalnih grupa molekula koje sadrže relativno teške atome ugljika, dušika, kisika ili sumpora, koji su vezani na atom vodika (Williams i Norris, 2001; Pasquini, 2003). Vibracija jakih kemijskih veza između težih atoma poput C=O, također se mogu detektirati NIR spektroskopijom (Pasquini, 2018).

Na kemijske veze unutar molekule, koje su aktivne u NIR spektralnom području, djeluje mikrookolina mijenjanjući energiju veza i anharmoničnost (Pasquini, 2018). Ove promjene utječu na valnu duljinu i intenzitet apsorpcijske vrpce u NIR spektru (Bokobza, 1998). Primjer ovih mikroskopskih utjecaja su vodikove veze. Vodikove veze smanjuju anharmoničnost

vibracija između atom donora i vodikova atoma, uz istovremeno smanjenje intenziteta apsorpcije i pomak maksimuma prema višim valnim duljinama zbog slabljenja primarne veze. Nadalje, na molekulskoj razini zamjena laganog atoma, poput atoma vodika, teškim atomom bit će primjetna u NIR spektru zbog utjecaja na jakost veza i kombinacije vibracija ostalih veza (Pasquini, 2018). Zbog promjene anharmoničnosti moguće je pratiti i disocijaciju polimera u monomerne jedinice praćenjem promjene intenziteta viših tonova koje nastaju uslijed istezanja OH i NH grupa (Ozaki, 2012).

Molekula vode pokazuje jake apsorpcijske vrpce, prije svega prvi viši ton O-H istezanja pri približno 7100-6800 cm^{-1} i kombinacijsku vrpcu O-H istezanja i H-O-H savijanja pri 5300-5100 cm^{-1} (Slika 6.) (Burns i Ciurczak, 2008; Grohganz i sur., 2009; Clavaud i sur., 2017; Jerome i Workman, 1996; Last i Prebble, 1993; Luck, 1974). Točan položaj ovih vrpca ovisi o fizikalnoj i kemijskoj okolini molekule vode (Brülls i sur., 2007; Osborne i sur., 1993; Büning-Pfaue, 2003; Luck, 1974).

2.2.3. Interpretacija NIR spektara i kemometrijsko modeliranje

U NIR spektroskopiji, kao uostalom i u svim drugim analitičkim tehnikama, teorijska interpretacija i razumijevanje skupa prikupljenih informacija preduvjet je za formiranje kvalitetnog NIR multivarijatnog modela. Sastavni dio NIR spektroskopije je kako interpretacija tako i predikcija interakcija elektromagnetskog zračenja i tvari koja se analizira.

NIR spektri predstavljaju složen zbir informacija o uzorku iz kojeg je moguće primjenom kemometrije ekstrahirati relevantne, vrlo često u NIR spektru razasute spektralne informacije za ciljne parametre, kvalitativne ili kvantitativne, fizikalne ili kemijske. Kemometrija je disciplina koja koristi multivarijatne tehnike analize za ekstrakciju relevantnih informacija iz NIR spektralnih podataka. Naime, NIR spektri sadrže kompleksne analitičke informacije, pohranjene u tisućama spektralnih varijabli, ne samo o ciljnom analitu, već i o drugim sastojcima matriksa. Odgovori analitičkih instrumenata općenito se prikupljaju i pohranjuju u formi digitalnih signala (spektri, kromatogrami, voltamogrami) sačinjenih od numeričkih vektora, koji opisuju intenzitet mjerene eksperimentalne varijable. Iako se neželjene varijacije u NIR spektru, bilo da su slučajne ili sustavne, mogu svesti na manju mjeru podešavanjem instrumentalnih parametara i eksperimentalnih uvjeta, instrumentalni signali moraju se prije multivarijatne analize preliminarno matematički obraditi (Oliveri i sur., 2019). Time matematička transformacija postaje sastavni dio kemometrijskog modeliranja. Svrha

preliminarne matematičke obrade je poboljšati selektivnost te ukloniti ili smanjiti utjecaj izvora spektralne varijabilnosti koji su prisutni u snimljenim spektrima, a nisu povezani s predmetom kvalitativnog ili kvantitativnog modela, kako bi se pristupilo kemometrijskom procesiranju analitičkih signala s ciljem uspostavljanja kvantitativnih (regresija) ili kvalitativnih (klasifikacija, identifikacija) analitičkih modela. Upravo je razvoj i validacija klasifikacijskog ili regresijskog modela temeljenog na multivarijatnoj analizi ključan korak u uspostavi kvalitativnih i kvantitativnih analitičkih metoda temeljenih na NIR spektroskopiji.

Složenost NIR spektra, prisutnost širokih i preklopljenih vrpca vidljivo onemogućuju direktnu interpretaciju signala u usporedbi s MIR spektralnim područjem, gdje su apsorpcijske vrpce jasno izdvojene što omogućuje preciznu asignaciju funkcionalnih grupa. Iako NIR spektroskopija nije prikladna za strukturnu karakterizaciju, interpretativna NIR spektroskopija okosnica je razumijevanja NIR spektra, te ima vrlo važnu ulogu u odabiru kemometrijskih metoda i interpretaciji rezultata. Interpretativna NIR spektroskopija analizira intenzitet i položaj vrpca, pri čemu koristi korelacijske karte (engl. *correlation charts*) koji prikazuju lokacije apsorpcijskih vrpca O-H, C-H, N-H i S-H veza u različitim kemijskim spojevima. U skladu s tim, razvoju NIR metoda prethodi analiza elemenata kemijske strukture koje se mogu dovesti u korelaciju s NIR spektroskopskim informacijama (Pasquini, 2003). Na taj način postaje moguće predvidjeti spektralne pojavnosti, intenzitete, utjecaj temperature na NIR spektar, optimalan raspon valnih duljina u NIR spektralnom području za pronalaženje relevantnih kvalitativnih ili kvantitativnih informacija.

Kvalitativne i kvantitativne spektralne informacije pohranjene u NIR spektrima funkcije su valnih duljina i intenziteta apsorpcije (Pasquini, 2003). Valna duljina apsorpcijske vrpce u NIR spektru raste kao funkcija mase vezanih atoma koji se u molekuli nalaze u anharmonijskim vibracijskim stanjima te pada s porastom jakosti kemijskih veza (Pasquini, 2018). Pomak valne duljine karakteristične apsorpcijske vrpce ukazuje na promjene u ovim svojstvima, masi atoma i energiji kemijske veze. Shodno tome NIR spektri predstavljaju izvor kvalitativnih analitičkih informacija, o molekularnoj strukturi, dinamici i okolini (Larkin, 2018).

Intenzitet apsorpcijske vrpce, uz pretpostavku da su drugi faktori konstantni, primarno je funkcija koncentracije apsorbirajućeg konstituenta u uzorku odnosno kvantitativna analitička informacija.

Kemometrija i NIR spektroskopija razvijale su se paralelno od svojih početaka i sinergija njihova razvoja razvidna je i u današnje vrijeme (Pasquini, 2003). Naime, nekoliko kemometrijskih algoritama je razvijeno kao odgovor izazovima NIR spektroskopije, kao što je npr. slaba selektivnost u kvantitativnim analizama. Obzirom na slabu selektivnost i osjetljivost

NIR spektroskopije, ključna je kritička interpretacija u slučaju kad je analit prisutan u niskoj koncentraciji ili je ispitivano svojstvo analita funkcija niske koncentracije, odnosno vrlo finih promjena u interakciji između konstituenata uzorka. Slaba selektivnost izraženija je što su uzorci kompleksniji. Naime što je složeniji kemijski sastav uzorka, veća je i složenost NIR spektra kao funkcija interakcija koje se odvijaju na mikroskopskoj i makroskopskoj razini između spojeva prisutnih u uzorku. U tu svrhu primjenjuju se multivarijatne tehnike analize odnosno regresije. Kemometrija omogućuje preciznu i točnu kvantifikaciju na temelju visoko neselektivnih NIR spektara.

2.2.4. NIR spektroskopija u novim konceptima za dizajn, analizu i kontrolu farmaceutskih proizvodnih procesa

Farmaceutska industrija podliježe strogim regulatornim zahtjevima, čime se osigurava kvaliteta proizvoda na tržištu. U tu svrhu određuju se parametri kvalitete *off-line* testiranjima gotovih proizvoda. Međutim, složenost analitičkih metoda i vrijeme testiranja proizvoda značajno odlažu puštanje serije proizvoda na tržište i time uzrokuju negativne ekonomske posljedice.
Kao odgovor na opisani problem, Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) predlaže novi koncept procesne analitičke tehnologije (engl. *Process Analytical Technology*, PAT), koja potiče razvoj novih tehnologija, koje prate i osiguravaju kvalitetu proizvoda od samog početka, kontrolirajući kritične faze procesa proizvodnje u stvarnom vremenu (engl. *real time*), s utjecajem na kritična svojstva kvalitete (FDA, 2004). Cilj je osigurati kvalitetu gotovog proizvoda kroz bolje razumijevanje i kontinuirano unapređenje cjelokupnog procesa. Sustavna primjena PAT koncepta omogućuje povećanje vrijednost krajnjeg proizvoda kroz smanjenje učestalosti rezultata izvan trenda (engl. *Out of Trend*, OOT), rezultata izvan očekivanja (engl. *Out of Expectation*, OOE) te posljedično rezultata izvan specifikacije (engl. *Out of Specification*, OOS).
Suvremeni zahtjevi u industriji, posebno farmaceutskoj i biotehnološkoj, temeljeni su na konceptu ugradnje kvalitete u metodu tijekom njena razvoja (engl. *Quality by Design*, QbD). Time se već u fazi razvoja metode definira cilj metode, temeljem prikupljenih podataka vrši se procjena rizika, te validacijom utvrđuje pouzdanost metode (Woodcock, 2004).
Koncept zelene kemije (engl. *Green chemistry*) potiče primjenu novih principa kojima će se reducirati ili eliminirati korištenje ili stvaranje supstancija opasnih po ljudsko zdravlje i okoliš, u dizajnu, proizvodnji i primjeni kemijskih produkata (Anastas i Warner, 1998).

Ispunjenje tih ciljeva uvjetovano je razvojem novih alternativnih, brzih analitičkih metoda za kontrolu kvalitete, koje će zamijeniti konvencionalne analitičke metode, čime će se omogućiti bolje praćenje cjelokupnog procesa, uz redukciju vremena analize i povećanje ukupne produktivnosti. Svojstva NIR spektroskopije kao što su brzina analize, nedestruktivnost za uzorak, neinvazivnost, gotovo univerzalna primjena na bilo koju molekulu koja sadrži C-H, N-H, S-H ili O-H veze, te minimalni zahtjevi za pripravu uzorka, potpuno su kompatabilni s novim konceptima za dizajn, analizu i kontrolu farmaceutskih proizvodnih procesa: procesnom analitičkom tehnologijom (PAT), projektiranjem procesa (QbD9, te konceptom zelene kemije (De Bleye i sur., 2012; Lopes i sur., 2004; Moes i sur., 2008; Bodson i sur., 2006; Bodson i sur., 2007; Mantanus i sur., 2009).

2.2.5. Primjena NIR analitičkih metoda

NIR spektri predstavljaju gotovo neograničen izvor analitičkih informacija o analiziranom uzorku, primjenjivo na velik broj različitih uzoraka za različite analitičke svrhe - klasifikaciju, identifikaciju i kvantifikaciju. Primjenom kemometrijskih algoritama iz NIR snimljenih spektara moguće je kvantitativno ili kvalitativno analizirati kemijske i fizikalne kritične parametre kvalitete (Pasquini, 2003). NIR spektri kao složeni zapisi o različitim kemijskim i fizikalnim svojstvima uzorka imaju neprocjenjivu vrijednost u istragama rezultata izvan specifikacije (OOS) omogućavajući retrospektivnu analizu kritičnih parametara kvalitete uz nove razvijene kemometrijske modele. Time NIR spektroskopija u kombinaciji s kemometrijom postaje moćan alat u upravljanju rizicima u kvaliteti (engl. *Quality risk management*).

NIR spektroskopijskim tehnikama mogu se analizirati *bulk* uzorci ili uzorci u mikroskopskim količinama, unutar širokog temperaturnog raspona i različitih agregatnih stanja.

Zbog svojih prednosti, NIR spektroskopija se uspješno primjenjuje u različitim industrijskim granama poput poljoprivrede, šumarstva, tekstilne, prehrambene, kemijske, farmaceutske i petrokemijske industrije, zatim u industriji polimera, u medicinskoj dijagnostici i dr. (Faber i Rajkó, 2007; Bokobza, 1998). U farmaceutskoj industriji povećava se zastupljenost biotehnoloških proizvoda, a time i zahtjevi za intenzivnim razvojem pratećih analitičkih metoda. NIR Spektroskopija kao jedna od najfleksibilnijih tehnologija predstavlja veliki izazov u analizi bioprocesa i njihove produktivnosti (Roggo i sur., 2007).

Spektroskopijske NIR analitičke metode sastavni su dio procesa istraživanja i razvoja, praćenja procesa proizvodnje i kontrole kvalitete.(Roggo i sur., 2007). Analize temeljene na NIR spektroskopiji mogu se provesti u analitičkom laboratoriju izvan *off-line* i unutar proizvodnog pogona *at-line*, uz preusmjeravanje toka uzorka koji se vraća u proces *on-line*, u stvarnome vremenu integrirano u proces bez uzorkovanja, obično uz ometanja procesnog toka *in-line*, te u stvarnom vremenu, pri čemu senzor nije u kontaktu s tvari koja se mjeri, a procesni tok se ne ometa *non-invasive* (Dorić i Bolf, 2018).

Primjenom NIR spektroskopije u farmaceutskoj industriji mogu se kvantitativno odrediti različiti fizikalni parametri poput tvrdoće (engl. *hardness*), veličine čestica (engl. *particle size*), brzine otapanja (engl. *dissolution rate*) i dr. (Freitas i i sur., 2005). Ipak, među kvantitativnim NIR metodama u farmaceutskoj industriji najzastupljenije su analitičke metode za određivanje kemijskog sastava, određivanja vode, sadržaja aktivne tvari, ekscipijenata i dr. (Roggo i sur., 2007). Pri tome uzorci mogu biti tablete, praškasti materijali, granulati, tekućine, gelovi, filmovi, liofilizati i dr.

Kvantitativno određivanje vode u farmaceutskim formulacijama čini jednu od prvih primjena NIR spektroskopije u farmaceutskoj industriji, čemu su pridonijeli izraženi signali vode u NIR spektralnom području s dvije različite apsorpcijske vrpce centrirane približno pri 1450 nm i oko 1940 nm (Burns i Ciurczak, 2008; Roggo i sur., 2007; Jerome i Workman, 1996). NIR spektroskopija se koristi za određivanje vode u praškastim materijalima, granulatima, tabletama, kapsulama, liofiliziratima te otopinama (Roggo i sur., 2007). Na temelju toga intenzivno se razvijaju NIR spektroskopijske metode za određivanje vode u ekscipijentima (Beyer i Steffens, 2003), djelatnim tvarima (Plugge i Van Der Vlies, 1993; Blanco i sur., 1997; Zhou i sur., 1998; Dunko i Dovletoglou, 2002) te gotovim proizvodima (Clavaud i sur., 2016; Lin i Hsu, 2002; Zheng i sur., 2008).

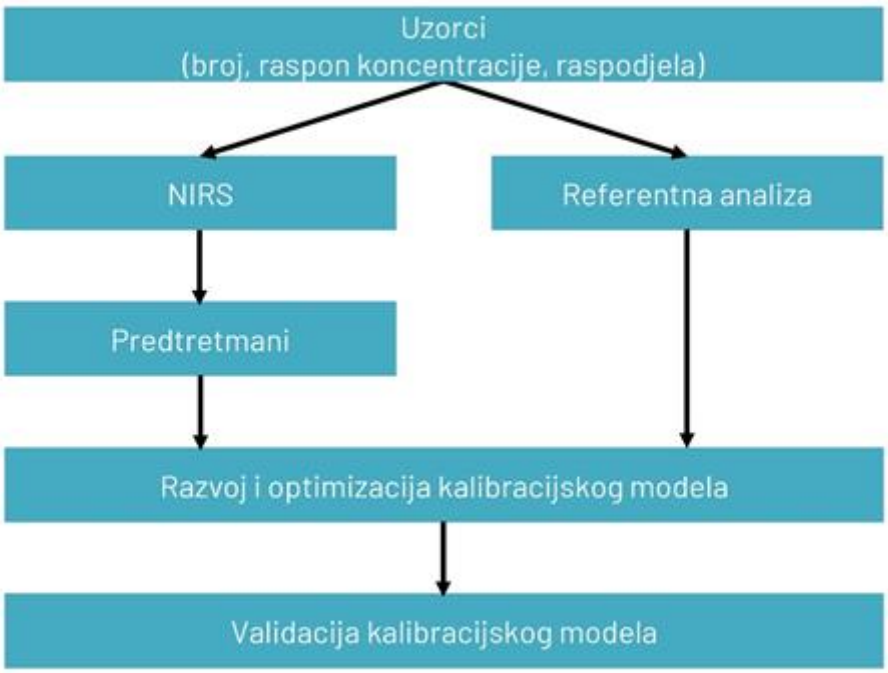
NIR spektroskopija sve se više primjenjuje za kvantifikaciju vode u liofiliziranim proizvodima, kao alternativa konvencionalnim analitičkim tehnikama (Zheng i sur., 2008). Nastojanja su prvotno bila usmjerena na razvoj NIR spektroskopijskih metoda, koje će omogućiti određivanje vode u liofiliziranim produktima kroz netaknute (engl *intact*) staklene bočice (Kamat i sur., 1989; Last i Prebble, 1993; Jones i sur., 1993; Savage i sur., 1998), čime se dodatno smanjuje rizik od mikrobiološke kontaminacije te utjecaja atmosferske vlage na sustavnu pogrešku metode za određivanje vode. Analiza vode kao kritičnog atributa kroz netaknute staklene bočice pridonosi boljem razumijevanju i kontroli procesa liofilizacije u skladu s konceptom procesne analitičke tehnologije (PAT).

Sukladno tome, razvijaju se nove NIR analitičke metode koje uz određivanje ukupnog udjela vode u liofilizatima, omogućavaju i diferencijaciju i kvantifikaciju vode u različitim energetskim stanjima (Cao i sur., 2006). Odnos hidratne i površinske vode u liofilizatu ima značajan utjecaj na stabilnost formulacije (Roggo i sur. 2007).

Svojstva NIR spektroskopije poput neinvazivnosti i nedestruktivnosti potakla su razvoj novih stabilitetno indikativnih NIR spektroskopijskih metoda za određivanje vode. Dodatno, predmet istraživanja NIR spektroskopije u stabilitetnim studijama je korelacija između relativne vlažnosti zraka, temperature skladištenja i vremena čuvanja proizvoda (Stokvold i sur., 2002), te predikcija brzine kemijske degradacije sastojaka proizvoda pri nižim temperaturama prema Arrhenius jednadžbi (Derksen i sur., 1998), tijekom ubrzanih ili stresnih stabilitetnih studija.

2.2.6. Razvoj i validacija NIR kvantitativnih analitičkih metoda

NIRS kvantitativna analiza zahtijeva primjenu multivarijatnih kalibracijskih tehnika i pažljiv odabir reprezentativnih uzoraka, kako bi se konstituirao točan kalibracijski model. Shematski prikaz procesa izgradnje NIR kalibracijskog modela prikazan je na slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz uspostavljanja NIR kalibracijskog modela.

2.2.6.1. Formiranje uzorka

Formiranje uzorka je složen proces, jer će kvaliteta NIR modela, a shodno tome i kvaliteta predikcija u budućnosti, ovisiti o odabiru uzorka. Pri odabiru uzorka značajno je sljedeće (Pasquini, 2018):

1. očuvati reprezentativnost uzorka obzirom na populaciju (N),
2. definirati veličinu uzorka (n);
3. podijeliti uzorak na podgrupe (kalibracijski set, optimizacijski test set, validacijski test set) uz uniformnu raspodjelu u prostoru dizajna;
4. detektirati uzorke koji su značajno različitih vrijednosti od ostatka populacije (engl. *outlier*).

Uzorak mora biti reprezentativan obzirom na varijabilnost kemijskih i fizikalnih svojstava ne samo populacije iz koje je izvučen nego i budućih uzoraka za koje će vršiti predikcija ciljnog analitičkog parametra bez referentne analize, kako bi model bio robustan. Reprezentativan uzorak mora obuhvatiti širi raspon koncentracija ciljnog parametra kako bi se omogućila i predikcija uzoraka s abnormalnim koncentracijama analita. Daljnji zahtjev pri formiranju uzorka je jednolika raspodjela uzoraka između ekstremnih vrijednosti, ali i u multidimenzionalnom prostoru. Uzorci proizvodnih serija najčešće ne ispunjavaju te uvjete jer su proizvodni procesi optimizirani odnosno statistički dobro kontrolirani kako bi se dobio proizvod koji udovoljava specifikaciji. U skladu s tim, očekivano je raspršivanje tj. varijabilnost koncentracija relativno mala.

Veličina uzorka ovisi o kompleksnosti i varijabilnosti matriksa. Nadalje, veličina uzorka ovisi i o tome da li su interferirajuće varijacije nepoznate te obuhvaćene slučajnim odabirom, ili je na temelju poznavanja većine interferirajućih varijacija moguće postaviti statistički eksperimentalan dizajn za redukciju veličine uzorka.

Raspodjela uzoraka na podgrupe je kritičan faktor i ovisi o kompleksnosti i varijabilnosti matriksa uzoraka. Podjela uzoraka na kalibracijski set, optimizacijski test set i validacijski test set temelji se na različitim matematičkim algoritmima, kojima je zajedničko nastojanje da se podgrupama obuhvati spektralni multidimenzionalan prostor uzoraka što uniformnije, tj. da svi očekivani izvori varijacija budu zastupljeni u svim podgrupama.

Prethodna inspekcija raspodjele uzoraka u spektralnom multivarijatnom prostoru analizom glavnih komponenata (PCA) nakon matematičke transformacije spektra omogućava odabir jednoliko raspodijeljenih podgrupa uzoraka (Bro i Smilde, 2014).

PCA je metoda projekcije, redukcija dimenzije multivarijatnog seta podataka i detekcija utjecaja varijabli na varijaciju unutar seta podataka (Pearson, 1901; Hoteling, 1933; Wold, 1987). PCA predstavlja temelj multivarijatne analize. Spektralni podaci projiciraju se iz višedimenzionalnog prostora originalnih varijabli u niže dimenzionalne prostore glavnih komponenata. Glavne komponente ili latentne varijable su linearne kombinacije originalnih varijabli. Latentne varijable međusobno su okomite ili ortogonalne, čime se eliminira kolinearnost uz očuvanje spektralnih informacija. U metodi projekcije odabire se pravac u prostoru (engl. *direction*), koji obuhvaća najveću varijaciju spektralnih podataka te se definira kao prva glavna komponenta. Ako prva glavna komponenta ne objašnjava ciljane varijacije, definira se druga glavna komponenta koja je okomita na prvu. Vrijednost svakog opažanja (engl. *observation*) u novom koordinatnom sustavu odgovara vrijednosti faktorskog boda (engl. *score*), dok opterećenja (engl. *loadings*) opisuju vezu latentnih i originalnih varijabli te su važni u interpretaciji pojedinih klasteriranja (engl. *clustering*). Dodavanjem novih glavnih komponenata (PC) poboljšava se fino ugođavanje (engl. *goodness of the fit*) modela. Daljnjim dodavanjem PC postepeno se modeliraju i šumovi, a ne ciljane informacije o kemijskim svojstvima, što dovodi do pretjeranog ugođavanja modela spektralnim podacima (engl. *over-fitting*). Povezivanjem opterećenja s releventnim spektralnim podacima dokazuje se opravdanost PC komponente u modelu.

Kennard-Stone je prvi algoritam za odabir reprezentativnog seta uzorka, koji uniformno obuhvaća prostor dizajna (engl. *design space*) (Kennard i Stone, 1969). Kennard-Stone algoritam se temelji na vrijednosti faktorskih bodova (engl. *score values*) relevantnih PC, pri čemu se uspoređuju udaljenosti između svih parova uzoraka i odabire par s najvećom udaljenosti u kalibracijski set. U sljedećem koraku određuju se minimalne udaljenosti do odabranih uzoraka, te izdvajaju uzorci s najvećim minimalnim udaljenostima. Postupak se ponavlja dok se ne formira kalibracijski test. Nedostatak Kennard-Stone algoritma je što je različitost koncentrirana u kalibracijskom setu te može dovesti do preoptimističnih rezultata (Westad i Marini, 2015).

Prema modificiranom Kennard-Stone algoritmu, Duplex algoritmu, izračunavaju se udaljenosti između uzoraka, te se istovjetno Kennard-Stone algoritmu odabire najudaljeniji par za kalibracijski set. Međutim, sljedeći par najudaljenijih uzoraka pridružuje se test setu. Naizmjeničnim pridruživanjem uzoraka kalibracijskom i test setu prema definiranom omjeru

raspodjele (engl. *splitting ratio*) i ukupnom broju uzoraka postiže se usporediva različitost u oba seta (Snee, 1977).

Kriterij D-optimalnosti (engl. *D-optimality criterion*) koristi princip maksimiziranja determinante matriksa informacija (X`X) za uniformnu raspodjelu uzoraka u prostoru dizajna (Wu i sur., 1996). Nadalje, klasteriranja k-sredinama (engl. *k-means*) ili Kohonen mapiranjima (*engl. Kohonen mapping*) u nekoliko slučajeva pokazali su se vrlo učinkovitima za reprezentativnu podjelu uzoraka (Rajer-Kanduč i sur., 2003; Marini i sur., 2007).

Detekcija uzoraka značajno različitih vrijednosti od ostatka populacije (engl *outlier*) je iznimno važna pri konstrukciji modela i validaciji jer regresijski model ne može doseći optimalne izvedbene karakteristike bez eliminacije ovih uzoraka iz seta podataka. U tu svrhu provodi se analiza spektralnih reziduala i Mahalonobis udaljenosti (engl. *Mahalonobis distance leverage*) sirovih spektralnih podataka koji se koriste u regresiji i validaciji (ANSI, 2012). Kriterij za detekciju ovih uzoraka je i Hotteling statistika (engl. *Hotteling statistics*) ili t^2 statistika, koja definira statističke granice uz pretpostavku normalne distribucije faktorskih bodova (Bro i Smilde, 2014). Viša osjetljivost detekcije ovih uzorka po značajnoj različitosti svojstvena t^2 statistici rezultat je sažimanja informacija nekoliko glavnih komponenata u svrhu modeliranja setova spektra uzoraka (Pasquini, 2018). Tipično, uzorci izvan granice pouzdanosti, najčešće postavljene uz 95% pouzdanost, identificiraju se kao potencijalni uzorci sa značajno različitim vrijednostima (engl. o*utlier*). Ovaj kriterij je visokoučinkovit za velike setove uzoraka, gdje je vjerojatna normalna razdioba vrijednosti faktorskih bodova (engl. *scores values*). Navedeni kriteriji mogu se kombinirati i simultano analizirati pomoću grafa utjecajnosti (engl. *influence plots*).

Uzorci mogu odstupati značajno različitim vrijednostima od ostatka populacije (engl *outlier*) zbog pogrešne referentne analitičke koncentracije ili svojstva praćeno neočekivanim spektralnim signalima, pogrešne referentne analitičke koncentracije ili svojstva uz očekivane spektre, te ispravne referentne analitičke koncentracije ili svojstva koji su praćeni neočekivanim spektralnim signalima. Na detekciju ovih uzoraka klasičnim metodama može utjecati istovremena prisutnost više uzoraka koji odstupaju značajno različitim vrijednostima od ostatka populacije (engl. *outlier*) odnosno tzv. efekt maskiranja (engl. *masking*) (Pasquini 2018).

Nakon detekcije uzoraka značajno različitih vrijednosti od ostatka populacije slijedi verifikacija. U procesu verifikacije uzorka značajno različitih vrijednosti od ostatka populacije (engl. *outlier*) mora se dokazati da novi izvor varijabilnosti koji je detektiran kroz značajno različite vrijednosti, nije relevantan za populaciju, te ne predstavlja novi značajan izvor informacija. Verifikacija uzorka značajno različitih vrijednosti od ostatka populacije

omogućava njegovo izuzimanje iz seta podataka. Naime, vrlo često se uzorci s ekstremnim vrijednostima detektiraju kao uzorci značajno različitih vrijednosti zbog podzastupljenosti u setu podataka.

2.2.6.2. Matematička transformacija spektralnih podataka

U preliminarnoj fazi multivarijatne analize podataka provode se matematičke transformacije originalnih spektralnih podataka. Velik broj različitih matematičkih algoritama razvijen je u sinergiji s razvojem NIR spektroskopije, prateći kako različite prirode analitičkih signala tako i različite neželjene varijabilnosti koje su predmet korekcije. Cilj matematičke obrade spektralnih podataka je ukloniti ili reducirati izvore spektralne varijabilnosti, uključujući šumove koji su prisutni u spektru, a nisu povezani s ciljnim parametrom te poboljšati selektivnost prije multivarijatne regresije, izrade klasifikacijskog modela ili eksplaratorne analize (Rinnan i sur., 2009). U slučaju bioloških uzoraka zbog usporedivosti veličine čestica uzoraka i valnih duljina NIR elektromagnetskog zračenja utjecaj raspršenja na spektar je vrlo složen i *model-free*, te se prepoznavanjem neželjenih varijacija u spektrima, koje potječu od raspršenja, te odabirom prikladnih matematičkih algoritama dobivaju matematički transformirani spektri koji se moraju što je moguće više približiti idealnim spektrima tj. čistim apsorpcijskim spektrima (Rinnan i sur., 2009). Matematičkim transformacijama originalnih spektralnih podataka ne mogu se dodati nove informacije, ali nasumična primjena matematičkih algoritama, koja ne proizlazi iz osnova NIR instrumenta te teorije vibracijske spektroskopije može uzrokovati gubitak ciljnih informacija. Stoga se odabir metoda matematičke transformacije mora temeljiti na poznavanju karakteristika uzorka, interakcije uzorka i NIR elektromagnetskog zračenja, te zahtjeva kojima analitička metoda mora udovoljiti. Odabir metode matematičke transformacije mora se razmotriti i u kontekstu sukcesivne faze izrade multivarijatnog kalibracijskog modela (Rinnan i sur., 2009). Optimalnim odabirom algoritma u fazi matematičke obrade očuvat će spektralne informacije koje opisuju ciljni parametar i ukloniti neželjeni izvori varijabilnosti prisutni u spektralnim podacima, koji bi negativno utjecali na otkrivanje uzročne kvantitativne ili kvalitativne korelacije. Optimalan odabir matematičkog algoritma prije validacije NIR modela nije moguće potvrditi, ali vrijedi opće pravilo da matematička obrada ne smije povećati efektivnu složenost modela. Metode matematičke transformacije imaju važnu ulogu u refleksnoj i transmisijskoj NIR spektroskopiji. Varijacije spektra koje nastaju kao posljedica nespecifičnog raspršenja elektromagnetskog

zračenja te razlike u efektivnim duljinama puta svijetlosti (engl. *path length differences*) vrlo često sačinjavaju veći dio ukupne varijance u NIR spektru dobivenom difuznom refleksijom (Barnes i sur., 1989). Naime, u log 1/R spektru postoji visok stupanj kolinearnosti između spektralnih podataka, koji je u određenoj mjeri funkcija raspršenja i varijabilne duljine puta elektromagnetskog zračenja. Takvi neželjeni spektralni artefakti i interferencije posljedica su nekontroliranih fizikalnih varijacija u uzorku, poput veličine i oblika čestica, gustoće pakiranja (engl. *packing density*), površine uzorka i dr. (Martens i sur., 2003). Cilj matematičke transformacije je korigirati kombinaciju aditivnih i multiplikativnih artefakata u snimljenom spektru (Pedersen i sur., 2002).

Metode matematičke obrade spektara mogu se podijeliti u dvije kategorije - metode za korekciju raspršenja (engl. *scatter correction methods*) i spektralne derivacije (engl. *spectral derivatives*) (Rinnan i sur., 2009). Prvu grupu čine metode za korekciju raspršenja povezanog s promjenama u raspodjeli veličine čestica, što dovodi do aditivnih ili multiplikativnih efekata, te shodno tome promjene spektralnog profila. Prva kategorija matematičkih transformacija uključuje multiplikativnu korekciju raspršenja (engl. *Multiplicative Scatter Correction*, MSC), proširenu multiplikativnu korekciju raspršenja (engl. *Extended Multiplicative Scatter Correction*, EMSC), inverznu multiplikativnu korekciju raspršenja (engl. *Inverse Multiplicative Scatter Correction*, ISC), proširenu inverznu multiplikativnu korekciju raspršenja (engl. *Extended Inverse Multiplicative Scatter Correction*, EISC), uklanjanje trenda (engl. *de-trending*), standardnu normalnu variatu (engl. *Standard Normal Variate*, SNV) i normalizaciju (engl. *normalization*) (Rinnan i sur., 2009).

Metoda MSC matematičke transformacije korigira svaki pojedinačan snimljeni spektar prema referentnom spektru (Martens i sur., 1983; Geladi i sur., 1985). Referentni spektar, koji se koristi za transformaciju čitavog seta spektralnih podataka aproksimacija je idealnog, tj. apsorpcijskog spektra. Sukladno tome, iz referentnog spektra se izdvajaju fizikalni efekti raspršenja od spektralnih efekata nastalih kemijskom ili vibracijskom apsorpcijom elektromagnetskog zračenja (Martens i sur., 2003). Kao referentni spektar uzima se najčešće aritmetička sredina spektara kalibracijskog seta, jer veličina čestica i duljina puta slučajno variraju od uzorka do uzorka, pa bi aritmetička sredina trebala značajno reducirati ove efekte pod uvjetom da su slučajni.

MSC koristi linearni regresijski model za procjenu dvaju skalarnih koeficijenata – koeficijenta za korekciju aditivnih efekata, koji se očituju u pomaku bazne linije, te koeficijenta za korekciju multiplikativnih efekata koji mijenjaju zakrivljenost spektralne krivulje (jednadžba 2.11.).

$$x_{org} = b_0 + b_{ref,1} \times x_{ref} + e \quad (2.11.)$$

Skalarni aditivni i multiplikativni koeficijenti ($b_0, b_{ref,1)}$ određuju se metodom najmanjih kvadrata (engl. *partial least square*) za svaki pojedini uzorak. Slijedi korekcija snimljenih spektara prema referentnom spektru (jednadžba 2.12.).

$$x_{corr} = \frac{x_{org} - b_0}{b_{ref,1}} = x_{ref} + \frac{e}{b_{ref,1}} \quad (2.12.)$$

gdje je

x_{ref} referentni spektar;

x_{corr} korigirani spektar uzorka;

x_{org} originalni spektar uzorka;

e nemodelirani (engl. *un-modeled*) dio originalnog spektra uzorka (reziduali);

$b_0,\ b_{ref,1}$ skalarni aditivni i multiplikativni koeficijenti.

EMSC predstavlja proširenje koncepta MSC (Martens i Stark, 1991) vrlo često na polinomnu funkciju koja opisuje referentni spektar, *fitting* bazne linije na os valne duljine, te primjenu apriori stečenih znanja o spektralnim svojstvima kemijskih konstituenata odnosno interferencija. Shodno tome sve alternative MSC mogu se obuhvatiti sljedećom jednadžbom (Rinnan i sur., 2009):

$$x_{org} = \left[1\ x_{ref}\ x_{ref}^2\ \lambda\ \lambda^2\ x_{known,1}\ \ x_{known,2\ldots\ldots}\right] x\ b + e \quad (2.13.)$$

$$b = \left[b_0\ b_{ref}\ b_{ref,1}\ b_{ref,2}\ b_{\lambda,1}\ b_{\lambda,2} b_{known,1}\ b_{known,2\ldots}\right] \quad (2.14.)$$

gdje je

λ korekcijski vektor obzirom na os valnih duljina,

$x_{known,1}$ apriori znanje o spektralnim informacijama;

b skup skalara (korekcijskih koeficijenata).

Selektivnost EMSC obzirom na fizikalne efekte temelji se na točnosti procjena statističkih parametara modela, koji ne uključuje nepoznate varijacije koncentracija kemijskih konstituenata (Martens i sur., 2003).
Inverzne multiplikativne korekcije (ISC) signala predstavljaju modifikaciju MSC, obzirom na reverznu korekciju (Pedersen i sur., 2002) prema sljedećim jednadžbama:

$$x_{ref} = b_0 + b_{ref,1} \times x_{org} + e \quad (2.15.)$$

$$x_{corr} = x_{ref} - e = b_0 + b_{ref,1} \times x_{org} \quad (2.16.)$$

Osnovna statistička razlika između MSC i ISC je što se minimalna vrijednost reziduala (e) u MSC izvodi iz modela šuma prema pojedinačnom spektru, a u ISC iz modela šuma na referentnom spektru (Helland i sur., 1995). Slično kao i MSC, tako se i ISC koncept može proširiti primjenom kemijskih i fizikalnih znanja, polinomnih funkcija i dr.
Matematička obrade SNV jedna je od najčešće korištenih algoritama za korekciju NIR spektralnih podataka koja nastaju uslijed raspršenja elektromagnetskog zračenja (Barnes i sur., 1989). Osnovni princip SNV korekcije (jednadžba 2.17.) isti je kao za MSC korekciju.

$$x_{kor} = \frac{x_{org} - a_0}{a_1} \quad (2.17.)$$

gdje je

a_0 vrijednost aritmetičke sredine spektra koji se korigira;

a_1 standardna devijacija spektra koji se korigira.

Prednost SNV je što ne koristi referentni spektar, već procesira svaki snimljeni spektar pojedinačno, izolirano od ostalih spektara iz seta. Budući da SNV ni normalizacija ne uključuju metodu najmanjih kvadrata u procijeni parametara, osjetljive su na šumove u spektru.

Drugu kategoriju matematičkih transformacija spektara predstavljaju spektralne derivacije kojima se reduciraju umnoženi multiplikativni i aditivni efekti, npr. Norris-Williams (NW) derivacija i Savitzky-Golay (SG) polinomna derivacija (Rinnan i sur., 2009). Vertikalne pomake bazne linije (engl. *offsets*) i varijacije nagiba (engl. *drift*, *slope variation*) efikasno korigiraju numeričke derivacije. Prva derivacija uklanja trend bazne linije, a druga derivacija

uklanja trend bazne linije i linearan trend. Derivacije poboljšavaju rezoluciju preklapajućih spektralnih signala, naglašavajući male strukturne razlike između signala vrlo sličnih profila. U oba slučaja sastavni dio algoritma je glačanje spektra (engl. *smoothing*), koje se primjenjuje prije izračuna derivacije kako se derivacijom ne bi znatno smanjili omjer signala i šuma (engl. *signal to noise ratio*) u derivacijom korigiranom spektru. Norris-Williams derivacija u fazi glačanja spektra (engl. *smoothing*) pridružuje centralnoj točci *i* aritmetičku sredinu izračunatu iz zadanog broja točaka u simetričnom prozoru (engl. *smoothing window*), a prva derivacija odgovara razlici dviju izračunatih vrijednosti na udaljenosti koja odgovara zadanom broju točaka (engl. *gap*) (Norris i Williams, 1984). Prema Savitzky-Golay derivaciji oko centralne točke *i* izdvaja se podskup susjednih točaka u simetričnom prozoru te se metodom najmanjeg kvadrata izradi krivulja polinoma koja najbolje opisuje podskup spektralnih podataka (Savitzky i Golay, 1964). Iz parametara jednadžbe polinoma računaju se derivacije bilo kojeg reda. Postupak se ponavlja sekvencijalnim pomicanjem simetričnog prozora preko cijelog spektralnog raspona.

Matematičke transformacije mogu promijeniti signifikantnost varijabli u matrici podataka, npr. derivacije ili SNV transformacije, pri čemu promjena signifikantnosti varijabli može biti vidljiva i u modifikaciji signala. Artefakti nastali matematičkom transformacijom spektara u preliminarnom koraku kemometrijskog procesiranja analitičkog signala mogu utjecati i na završnu interpretaciju kemijskih informacija pohranjenih u spektru. Artefakti mogu nastati uslijed primjene pogrešne matematičke transformacije ili nesuvisle primjene niza matematičkih transformacija. Upravo interpretacija značajnosti originalnih spektralnih varijabli stvara poveznicu s kemijskim informacija te sprječava njihov gubitak ili krivu interpretaciju. Interpretacija značajnosti originalnih varijabli sastavni je dio PCA eksploracijske analize i PLS regresije za kvantitativne modele.

Odabir spektralnih varijabli prije faze uspostave kalibracijskog modela, sastavnica je matematičke obrade spektra s ciljem eliminacije varijabli koje ne pridonose poboljšanju izvedbenih karakteristika modela.

2.2.6.3. Regresija

Multivarijatna kalibracija se koristi za uspostavu kvantitativne veze tj. modela između dviju matrica - matrice spektralnih podataka X i matrice referentnih vrijednosti koncentracija pohranjenih u matrici Y (Martens i Naes, 1989). Različite metode se koriste za konstrukciju multivarijatnog kalibracijskog modela: metoda višestruke linearne regresije (engl. *Multiple Linear Regression*, MLR), metoda regresije glavnih komponenata (engl. *Principal Component Regression*, PCR) i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, PLS) (Faber i Rajkó, 2007). MLR algoritam koristi originalne varijable npr. valne duljine, a PCR i PLS koriste glavne komponente tj. latentne varijable (Pasquini, 2003). Za PCR i PLS regresijske metode ključan je odabir broja varijabli za model (Pasquini, 2003). Algoritmi PCR i PLS mogu se primijeniti na specifično spektralno područje ili čitav spektar.
MLR je klasična multivarijatna regresijska metoda koja uspostavlja poveznicu između reduciranog broja valnih duljina (ili valnih brojeva) i kvantitativnog svojstva uzorka (Roggo i sur., 2007). Predikcija ciljnog parametra može se opisati sljedećom jednadžbom:

$$y_i = b_0 + \sum_{i=1}^{k} b_i x_i + e_{i,j} \qquad (2.18.)$$

gdje je

b_i, b_0 izračunati koeficijent;

x_i apsorbancija pri određenoj valnoj duljini;

$e_{i,j}$ pogreška.

Jedna za drugom analizira se svaka valna duljina i dovodi u korelaciju s ciljnim svojstvom. Odabir valnih duljina temelji se na moći predikcije. Kad korelacija dosegne vrijednost koja je jednaka ili veća od zadane vrijednosti, valna duljina odabire se za kalibracijski model. Kalibracijski model se izvodi iz seta odabranih valnih duljina i referentnih vrijednosti ciljnog parametra. MLR zahtijeva više uzoraka (N) od spektralnih kanala (K) dok se PCR i PLS multivarijatne regresije mogu primijeniti i kad je K > N (Faber i Rajkó, 2007).
PCR predstavlja nadogradnju PCA za primjenu u kvantitativnim analizama. U prvom koraku provodi se PCA spektralnih podataka. Time je omogućen unos podataka iz velikog broj spektralnih kanala zbog kompresije spektralnih podataka X matrice u relativno malen broj (A) tzv. *t-scores*, uobičajeno manje od deset (Faber i Rajkó, 2007). Kompresijom spektralnih podataka u mali broj *t-scores* djelomice se ostvaruje i filtriranje šuma (engl. *noise*). U drugom

koraku provodi se MLR na *t-scores* kao prediktivnim varijablama (Naes i sur., 2002). Prednosti su što PCA potiskuje spektralnu kolinearnost (Roggo i sur., 2007).

U PLS multivarijatnoj regresiji podaci pohranjeni u matrici Y pridonose konstrukciji *t-scores*, zbog čega se PLS smatra kao daljnji stupanj razvoja PCR (Wold i sur., 1982). Cilj PLS je uspostaviti kvantitativnu vezu tj. model između dviju matrica - matrice spektralnih podataka X i matrice referentnih vrijednosti koncentracija pohranjenih u matrici Y. Modeliranjem obiju matrica pronalaze se varijable u X matrici koje najbolje opisuju Y matricu (Roggo i sur., 2007). Kritičan faktor u PLS algoritmu za multivarijatnu analizu je odabir dimenzionalnosti modela (engl. *model dimensionality)* kojeg određuje broj faktora tj. latentnih varijabli (Faber i Rajkó, 2007). Dodatni faktori ili glavne komponente u PLS regresiji mogu kompenzirati odstupanja od Lambert-Beer zakona, korigirajući neidealno ponašanje spektralnog prediktora. Nedostatak uvođenja dodatnih faktora je povećanje složenosti modela i vjerojatno smanjenje robusnosti za buduće predikcije. Prednost PLS u odnosu na PCR slijedi iz odabira latentnih varijabli iz matriksa kovarijanci između podataka i ispitivanog parametra. Naime slično kao i PCA, PLS algoritam izračunava set latentnih varijabli kako bi se reducirao broj varijabli, ali umjesto najveće varijacije u spektru prva latentna varijabla predstavlja najvažniju varijaciju, pokazujući najbolju korelaciju s traženim svojstvom uzorka, kao što je npr. koncentracija analita. Nadalje, kompresija u manji broj *t-scores* djeluje kao efikasan filter šuma (engl. *noise filter*).

O odabiru optimalnog broja latentnih varijabli ovisi i robusnost razvijenog modela. Prevelik broj latentnih varijabli može dovesti do pretjerano finog ugođavanja ili konfiguracije modela (engl. *overfitting*) s negativnim utjecajem na robusnost modela. Posljedica su umanjene izvedbene karakteristike modela u fazi predikcije uzoraka nepoznatih svojstava (Faber i Rajkó, 2007).

2.2.6.4. Validacija

U slučaju multivarijatne kalibracije cilj validacije je procjena sposobnosti modela da predvidi ciljni parametar u budućim uzorcima istog tipa. U prvom stupnju uspostave multivarijatnih kalibracijskih modela provodi se kalibracija pomoću kalibracijskog seta uzoraka te optimizacija modela evaluacijom temeljenom na konvencionalnim kemometrijskim parametrima. Model mora biti robustan obzirom na očekivane izvore varijacije poput promjena u matriksu, sirovim materijalima, kemijskim reagensima i dr. (Westad i Marini, 2015). Ovi budući izvori varijacije iako nepoznati, mogu u određenoj mjeri biti kvantificirani kroz različite pristupe - eksternom

ili internom validacijom. Eksterna validacija podrazumijeva nezavisnu test set validaciju (engl. *independent test set validation*). Dakle uzorci iz validacijskog test set ne sudjeluju niti u formiranju niti u optimizaciji modela. Interna validacija razlikuje se od eksterne jer se uzorci za validaciju odabiru iz kalibracijskog seta. U slučaju interne validacije validacijski uzorci nisu nezavisni, već se izuzimaju iz kalibracijskog seta.

Relevantni kemometrijski parametri za odabir optimalnog modela su korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije (engl. *Root Mean Square Error of Calibration*, RMSEC) ili korijen srednje kvadratne pogreške unakrsne validacije (engl. *Root Mean Square Error of Cross validation*, RMSECV) te korijen srednje kvadratne pogreške predikcije (engl. *Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP). Svi RMSE kriteriji temelje se na izračunu korijena srednje kvadratne pogreške prema jednadžbi (Burns i Ciurczak, 2008):

$$\text{RMSE} = \left(\sum_{i=1}^{I} \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{I}\right)^{1/2} \qquad (2.19.)$$

gdje je

I broj uzoraka;

y_i referentna vrijednost analitičkog parametra za uzorak *i*;

$\hat{y}_i$ NIR predikcija vrijednosti analitičkog parametra za uzorak *i*.

Unakrsna validacija se primjenjuje u iznimnim slučajevima (Westad i Marini, 2015):

- za male do srednje setove uzoraka, kad je broj uzoraka ograničen, čime se postiže bolja stabilnost modela;
- kad cilj nije predikcija ili klasifikacija budućih uzoraka već razumijevanje inherentne strukture u promatranom sistemu. U kemometriji to odgovara latentnim varijablama koje su projekcija kemijskih ili fizikalnih svojstava. Interpretacija modela ovisi o broju latentnih varijabli zbog čega je pravilan pristup dimenzionalnosti modela ključan.
- kad su spektri stratificirani u grupe prema poznatim razlikama (ponovljivost, reproducibilnost, mjesto i vrijeme uzorkovanja, tretman ili podrijetlo). Unakrsna validacija će u tom slučaju dati značajne informacije o stabilnosti modela te značajnosti pojedinih izvora varijacije.

Interna unakrsna validacija je ekonomski prihvatljivija od eksterne validacije, ali interna unakrsna validacije se ne može koristiti za dizajn eksperimenata te ima tendenciju pretjeranog

ugođavanja modela kalibracijskim spektralnim podacima (engl. *overfitting*) (Faber i Rajkó, 2007).

Eksterna validacija omogućava bolju procjenu RMSEP, ali zahtijeva veći broj uzoraka jer se uzorci za validaciju ne mogu koristiti za kalibraciju.

Optimalan broj uzoraka koji omogućava dovoljno preciznu procjenu RMSEP definiran je jednadžbom (Martens i Dardenne, 1998; Faber, 1999):

$$\frac{\sigma\,(RMSEP)}{RMSEP} = \frac{1}{\sqrt{2N_{val}}} \qquad (2.20.)$$

gdje je

$\sigma\,(RMSEP)$ standardna greška RMSEP;

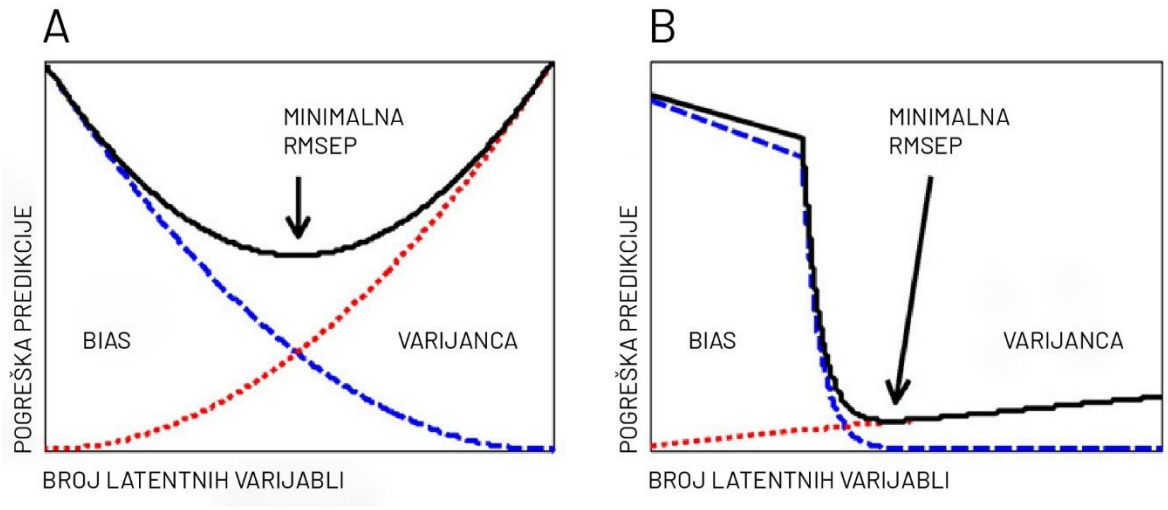
N_{val} broj validacijskih uzoraka.

Optimizacija modela odabirom optimalne dimenzionalnosti modela (engl. *model dimensionality, model rank*) provodi se analizom zavisnosti RMSEC vrijednosti o broju faktora (PLS komponenata ili latentnih varijabli). RMSEC vrijednosti kontinuirano opadaju s porastom broja faktora i predstavljaju optimalnu projekciju izvedbenih karakteristika modela izražavajući sposobnost multivarijatnog kalibracijskog modela da modelira dobivene vrijednosti za kalibracijski set (Burns i Ciurczak, 2008). Međutim, odabirom prevelikog broja latentnih varijabli slabe izvedbene karakteristike modela, jer se u model ugrađuju i varijable koje ne pridonose kvaliteti predikcije ciljnog parametra, već predstavljaju šumove (engl. *over-fitting).* Takav model daje odlične rezultate za korištene kalibracijske uzorke i znatno slabiju predikciju za eksterni test set uzoraka. Naime, kad su u kalibracijski model uključene i latentne varijable koje opisuju slučajne pogreške (engl. *random error*), ovi faktori neće dobro opisivati slučajne pogreške u budućim uzorcima, te je moguć porast RMSECV i RMSEP vrijednosti.

U drugom stupnju validacije test set uzoraka, koji nisu korišteni u kalibraciji, koristi se za procjenu točnosti predikcije ciljnog parametra u nepoznatim nezavisnim uzorcima pomoću optimiziranog NIR modela.

Nadalje, optimalan odabir dimenzionalnosti modela odnosno broja latentnih varijabli izvodi se iz procjene značajnosti poboljšanja tj. smanjenja RMSEP vrijednosti koja nastaje uvođenjem dodatne latentne varijable. Na tu procjenu utječu veličina i kvaliteta seta podataka koji se analiziraju kao i primijenjena metodologija validacije. Slika 10A. prikazuje optimalan model zavisnosti RMSEP o broju latentnih varijabli, uz značajan utjecaj sustavne pogreške (engl *bias*)

i varijance (engl. *variance*) te jasno izražen minimum RMSEP funkcije. Slika 10B. predstavlja znatno realniji model uz manji porast varijance te relativno malu sustavnu pogrešku. Minimalna vrijednost RMSEP nije više eksplicitna, već postaje predmet suvisle prosudbe. U tom asimetričnom prikazu, koji bolje opisuje dimenzionalnost stvarnih NIR modela, vidljivo je zašto odabir slabije ugođene konfiguracije modela u odnosu na optimalno ugođen model kalibracijskim spektralnim varijablama (engl. *underfitting)* ne predstavlja značajan problem (Faber i Rajkó, 2007).



Slika 10. Shematski prikaz utjecaja *bias* (▬ ▬ ▬) i varijance (• • •) na RMSEP kao funkciju dimenzionalnosti modela, odnosno broja latentnih varijabli. A) optimalan model B) realan model (prilagođeno iz Faber i Rajkó, 2007).

Iako je pretpostavka da poredak latentnih varijabli, koje su uključene u NIR model, odgovora mjeri u kojoj opisuju Y-varijablu tj. ciljni parametar, moguće je da u nizu latentnih varijabli prethode latentne varijable koje su manje značajne za Y- varijablu, a slijede one koje sadrže informacije o ciljnom parametru. Taj fenomen naziva se *sandwiching* (Gómez-Carracedo i sur., 2007; Wiklund i sur., 2007).

U završnoj fazi razvoja kvantitativnog NIR modela, eksternoj validaciji, koristi se nezavisan eksterni validacijski test set, koji nije korišten pri formiranju i optimizaciji modela. Time je omogućeno da se kroz model manifestiraju i izvori varijabilnosti koji nisu bili prisutni u kalibracijskom setu.

Izvedbene karakteristike odabranog NIR modela koji se koristi u rutinskim analizama moraju se periodički provjeravati. U ovoj fazi mora se provesti i detekcija uzorka koji odstupaju

značajno različitim vrijednostima od ostatka populacije (engl. *outlier*) radi provjere robusnosti modela. Ukoliko se utvrdi ekstrapolacija modela, pristupa se ponovnom formiranju i optimizaciji modela uz uvođenje novih referentnih uzoraka.

2.2.7. Utjecaj referentne metode na pouzdanost predikcije NIR multivarijatnog modela

Novija istraživanja su pokazala da su metodologije koje se koriste u validacijama NIR spektroskopijskih metoda u farmaceutskoj i biotehnološkoj proizvodnji, bilo da se temelje na tradicionalnim kemometrijskim parametrima i/ili ICH Q2 regulativi (ICH, 2005), nedostatne obzirom na kontekst prikladnosti za svrhu (engl. *fittness for purpose*) i evaluaciju pouzdanosti rezultata testiranja (De Bleye i sur., 2012).

Izvedbene karakteristike kvantitativne NIR spektroskopijske metode određene su izvedbenim karakteristikama referentne metode (EMA, 2009). Naime, ekstrakcija relevantnih podataka o ciljnom parametru iz kompleksnog NIR spektra kemometrijskim alatima temelji se na korelaciji s referentnim vrijednostima. Uspješnost identifikacije spektralnih karakteristika ili kombinacija spektralnih karakteristika, koje su u korelaciji s ciljnim analitičkim parametrom uvelike ovisi o kvaliteti referentnih vrijednosti. Kvaliteta i pouzdanost predikcije dobivenog NIR multivarijatnog kalibracijskog modela ovise o točnosti referentne vrijednosti dobivene referentnom metodom (Blanco i Pequero, 2010). U skladu s tim, jednadžba 2.19. je točna procjena vrijednosti kemometrijskog parametra RMSEP, samo uz uvjet da referentne vrijednosti predstavljaju dovoljno dobru procjenu nepoznate prave vrijednosti.(Faber i Rajkó, 2007). Utjecaj pogreške referentne metode na vrijednost RMSEP ne ovisi o dimenzionalnosti modela, ali otežava procjenu optimalne dimenzionalnosti modela. (Faber i Rajkó, 2007).

Znanstvena istraživanja kritički preispituju utjecaje pogreške referentne metode na NIR model. U cilju rješavanja ovog problema, koji je vidno prisutan, ali vrlo često neprepoznat u rutinskoj primjeni, potaknut je razvoj novih eksperimentalnih dizajna.

Predloženi pristupi uključuju razvoj NIR modela koji ne koriste referentne vrijednosti dobivene analitičkim metodama. U nastojanjima da se smanji utjecaj pogreške referentne metode na točnost NIR modela, uspostavlja se NIR spektroskopijska metoda kao apsolutna metoda za određivanje aktivnih farmaceutskih sastojaka u tabletama, pri čemu su referentne vrijednosti dobivene gravimetrijskim određivanjem komponenata formulacije (Blanco i sur., 2006).

Daljnji znanstveni napredak ostvaren je razvojem NIR spektroskopije bez referentne metode pomoću matrice varijabilnosti procesa (engl. *process variability matrix*) koja obuhvaća utjecaj

različitih proizvodnih faza na NIR spektre (Blanco i Pequero, 2010; Blanco i sur., 2011). Novim eksperimentalnim dizajnom predviđeno je snimanje NIR spektara laboratorijskog seta uzoraka i NIR spektara seta proizvodnih uzoraka tijekom različitih faza proizvodnje. Procesni spektri izračunati su kao razlika između NIR spektara proizvodnih serija i laboratorijskih seta uzoraka ciljnog raspona nominalnih koncentracija aktivne djelatne tvari i ekscipijenta. Matrica varijabilnosti procesa dobivena ekstrakcijom spektralnih informacija o procesu multiplicirana je empirijskim koeficijentom. Takva matrica proširene varijabilnosti procesa (engl. *extended process variability matrix*), koja sadrži fizikalnu varijabilnost uvedenu kroz različite faze proizvodnog procesa, dodana je matrici dobivenoj iz NIR spektara laboratorijskih uzoraka, koja predstavlja kemijsku varijabilnost. Kombinirana matrica procesnog spektra i spektra koji sadrži kemijske informacije o uzorku naziva se matrica ukupne proširene varijabilnosti (engl. *extended process variability matrix*) te obuhvaća eksperimentalnu domenu budućih proizvodnih serija tableta, tj. očekivanu varijabilnost s potencijalnim utjecajem na kvalitetu predikcije koju će model iskazati obzirom na buduće proizvodne serije. U pristupu NIR spektroskopije bez referentnih podataka ključna je optimizacija procjene varijabilnosti farmaceutskog procesa proizvodnje, koja se temelji na varijabilnosti ugrađenoj u proizvodnim uzorcima.

Međutim, vrlo rijetko je moguće pripraviti set referentnih kalibracijskih uzoraka u laboratoriju, osim za vrlo jednostavne uzorke, koji sadrže dvije ili tri komponente (Pasquini, 2003). Stoga se za izradu većine NIR kvantitativnih modela koriste proizvodni uzorci u kojima je koncentracija analita ili fizikalno svojstvo određeno standardnom analitičkom metodom. Sukladno, za većinu farmaceutskih primjena referentna metoda je sastavni dio NIR analitičkog sustava. Referentna vrijednost dobivena referentnom metodom je tek procjena prave vrijednosti analitičkog parametra uz određenu mjernu nesigurnost.

Za procjenu ukupne pogreške NIR analitičkog sustava za određivanje udjela vode koja uključuje i pogreške referentne Karl-Fischer metode, nužne su referentne vrijednosti za koje je mjerna nesigurnost za udjel vode zanemariva u odnosu na ukupnu mjernu nesigurnost. Teškoću u vezi liofiliziranih cjepiva predstavlja nedostupnost certificiranih referentnih materijala (engl. *Certified Reference Material*, CRM) koji bi bili izvor referentnih vrijednosti za udjel vode (González i sur., 2005). Nadalje, za liofilizirane proizvode nije moguće prirediti ni slijepu probu matriksa za procjenu točnosti analitičkog sustava zbog značajnih razlika u specijaciji matriksa bez analita i matriksa s analitom (González i sur., 1999). Dodatno, postupkom liofilizacije nije moguće prirediti liofilizirani pripravak cjepiva bez vode. Procjena točnosti nove kvantitativne NIR metode zasniva se na usporedbi s referentnim vrijednostima dobivenih referentnom Karl-

Fischer metodom (Grohganz i sur., 2009). Shodno tomu, ne može se tvrditi da su NIR metode prikladnije za određenu svrhu u odnosu na referentnu metodu, jer rezultati dobiveni NIR spektroskopijom u kombinaciji s kemometrijom nikad ne mogu biti točniji od rezultata dobivenih referentnom metodom (Blanco i Pequero, 2010). Usporedba izvedbenih karakteristika NIR analitičkog sustava i referentne metode moguća je tek uz uspostavu eksperimentalnog dizajna, koji omogućuje evaluaciju ukupne pogreške NIR analitičkog sustava, koja uključuje i pogrešku referentne metode.

Općenito su odstupanja između referentnih Karl-Fischer metoda i razvijenih NIR metoda za određivanje vode izraženija pri donjem dijelu raspona analitičke metode, tj. blizu donje granice kvantifikacije, gdje relativno veći značaj ima i mjerna nesigurnost referentnih vrijednosti dobivenih Karl-Fischer metodama. Niske koncentracije vode i higroskopnost uzorka, osobito liofilizata, značajan su izvor proporcionalnih i aditivnih ili konstantnih sustavnih pogrešaka referentne metode, koje utječu na kvalitetu NIR modela.

2.3. Novi koncepti i metodologije u validaciji analitičkih metoda

Validacija kao koncept postala je sastavni dio znanstvenog napretka. Nova nastojanja usmjerena su na razvoj novih koncepcija validacije, koje će biti smisleno izgrađene iz hipoteza izvedenih iz očekivanih izvedbenih karakteristika metode. Cilj je interpretacija validacije ne samo ne numeričkoj već i na konceptualnoj razini (Westad i Marini, 2015).

Validacijom se procjenjuje sposobnost analitičke metode da udovolji unaprijed zadanim kriterijima za točnost i pouzdanost rezultata u rutinskoj primjeni, (Rozet i sur., 2011b). Naime, vrednovanje pouzdanosti kritičnih odluka koje utječu na učinkovitost i sigurnost lijeka, sastavnica je upravljanja rizikom u kvaliteti (engl. *risk quality management*). Procjena rizika u značajnoj se mjeri temelji na pouzdanosti analitičkih rezultata. Rizik pogrešne interpretacije rezultata još je izraženiji kod bioanalitičkih metoda zbog složenosti, subjektivnih interpretacija validacijskih kriterija, te značajne mjerne nesigurnosti rezultata (Rozet i sur., 2011a). Naime, pouzdanost analitičkih rezultata više nije uvjetovana samo statusom validiranosti analitičke metode, već i zahtjevom da se provede analiza prikladnosti za svrhu te u rutinskoj primjeni metode uz analitički rezultat izrazi i njegova mjerna nesigurnost.

Nove koncepcije validacije procjenjuju izvedbene karakteristike analitičke metode na temelju verifikacije točnosti rezultata i procjene rizika kroz analizu prikladnosti za svrhu analitičkog sustava (engl. *fitness for purpose*) (Taverniers i sur., 2004b; González i Herrador, 2007; Rozet

i sur., 2011b; Rozet i sur., 2007a; Rozet i sur., 2011a). Točnost (*engl. accuracy*) obuhvaća preciznost (engl *precision*) i odstupanje od prave vrijednosti (engl. *trueness*).

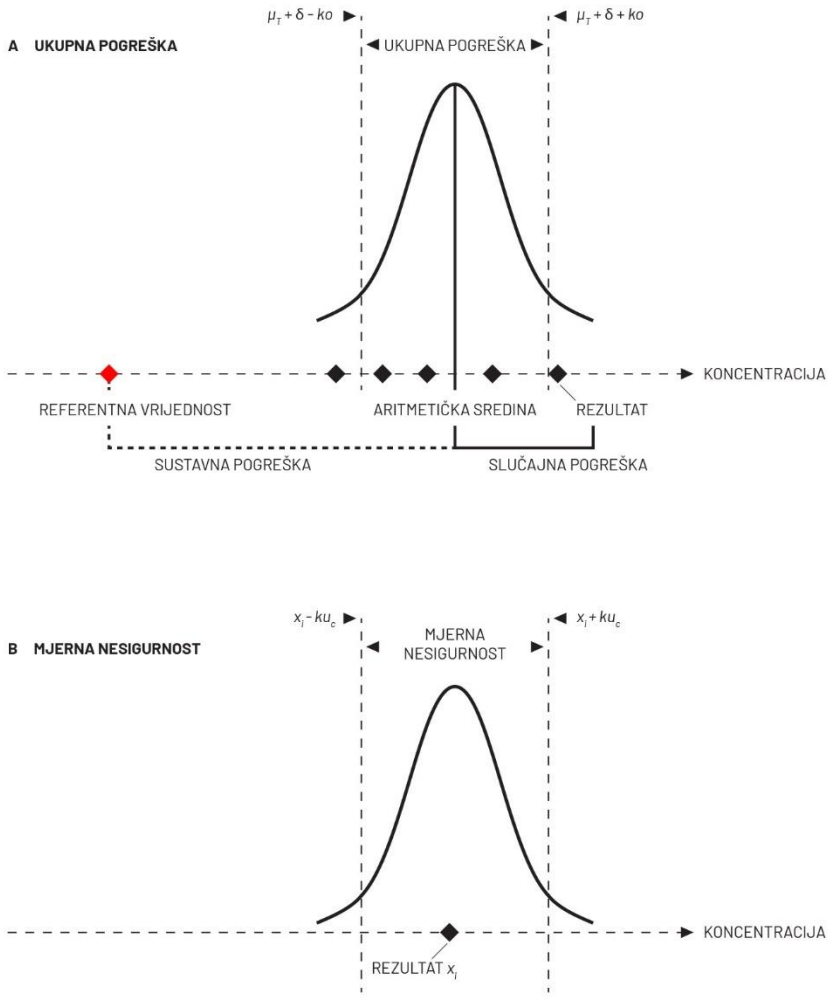
Eksperimentalni dizajn validacije mora omogućiti provjeru izvedbenih karakteristika nove analitičke metode u odnosu na definirane granice prihvatljivosti (engl. *acceptance limit*) koje proizlaze iz kriterija za prikladnost za svrhu analitičkog sustava (engl. *fitness for purpose*). Odabir statističkih alata koji će se koristiti za procjenu validnosti analitičke metode, mora biti u suglasju s validacijskim kriterijima i eksperimentalnim dizajnom (Rozet i sur., 2007b).

Analiza prikladnosti za svrhu (engl. *fitness for purpose*) koja se temelji na ukupnoj pogrešci (engl. *total error*) omogućuje da se već u fazi validacije analitičke metode sagleda pouzdanost analitičkih rezultata u budućim rutinskim primjenama analitičke metode. Time predikcija kvalitete rezultata tijekom rutinske primjene validirane analitičke metode u budućnosti postaje sastavni element koncepta validacije. Određuje se očekivani udio rezultata koji udovoljavaju unaprijed postavljenim granicama prihvatljivosti (Gonzales i Herrador, 2007). Nakon faze razvoja i optimizacije metode, utvrđuje se da li je ukupna pogreška metode prihvatljiva obzirom na postavljene kriterije prihvatljivosti pri svakoj zadanoj koncentraciji.

2.3.1. Totalna pogreška i mjerna nesigurnost

Ubrzan razvoj novih analitičkih metoda prate sve stroži regulatorni zahtjevi koji se odnose na kvalitetu rezultata analize. Kvalitetu rezultata određuju mjerna nesigurnost (engl *measurement uncertainity*) i sljedivost (*engl. traceability*) (Maroto i sur., 1999). Procjena rizika temeljena na mjernoj nesigurnosti i ukupnoj pogrešci (engl. *total error*) osigurava da svako rutinsko mjerenje u budućnosti bude dovoljno blizu nepoznatoj pravoj vrijednosti.

Općenito, dva su tipa pogrešaka u analitičkoj kemiji, sustavna pogreška (engl. *systematic error, method bias*) i slučajna pogreška (engl. *random error*) (Slika 11A.).



Slika 11. Ukupna pogreška (A) i mjerna nesigurnost (B) (prilagođeno iz Maroto i sur., 1999)

Za procjenu slučajne pogreške izračunava se varijanca, standardna devijacija ili relativna standardna devijacija iz dobivenih vrijednosti ponovljenih mjerenja istog uzorka, koje su proveli različiti analitičari kroz različite dane testiranja, kako bi se obuhvatili značajni izvori varijacije.

Za procjenu sustavne pogreške određuje se aritmetička sredina dobivenih vrijednosti ponovljenih mjerenja istog uzorka poznate koncentracije ciljnog analita. Izvor referentne ili konvencijom dogovorene vrijednosti je CRM, *spike* uzorka ili matriksa s CRM, analiza uzorka referentnom metodom, analiza referentnog laboratorija, kolaborativne studije i dr. (Gonzales i

sur., 1999). Razlika između aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti omogućuje procjenu sustavne pogreške (Rozet i sur., 2011b).

Nakon faze razvoja i optimizacije metode utvrđuje se da li je ukupna pogreška metode prihvatljiva obzirom na postavljene kriterije prihvatljivosti za analitičku metodu (Rozet i sur., 2011b). Ukupna pogreška je mjera udaljenosti pojedinačnog analitičkog mjerenja i referentne vrijednosti koncentracije analita, te predstavlja kombinaciju sustavne i slučajne pogreške (Slika 11A.) (Mandel, 1964). Nadalje, ukupna pogreška opisuje vjerojatnu raspodjelu budućih analitičkih rezultata dobivenih analitičkom metodom oko zadane referentne ili konvencionalne prave vrijednosti. To odgovara predikciji raspodjele bilo kojeg analitičkog rezultata za definiranu referentnu koncentraciju, prema jednadžbi:

$$x_i = \mu_T \pm f(\delta, \sigma) \qquad (2.21.)$$

gdje je

δ bias;

σ standardna devijacija;

μ_T referentna ili konvencionalna vrijednost;

x_i analitički rezultat.

Nasuprot tome u rutinskoj primjeni analitičke metode koncentracija analita u uzorku nije poznata, te nije moguća niti pouzdana procjena sustavne niti ukupne pogreške. U rutinskoj primjeni metode ključna postaje mjerna nesigurnost (Slika 11B.), koja je opisana donjom jednadžbom:

$$\mu_T = x_i \pm ku_c \qquad (2.22.)$$

gdje je

x_i procijenjena vrijednost ciljnog analitičkog parametra *i*;

ku_c interval mjerne nesigurnosti (engl. *uncertainity interval*).

Mjerna nesigurnost definira interval u kojem se sa zadanom pouzdanošću nalazi prava vrijednost ciljnog analitičkog parametra, odnosno opisuje raspodjelu prave vrijednosti za dobiven analitički rezultat (Fleming i sur., 1996). Sljedivost do referentne vrijednosti visoke kvalitete preduvjet je da procijenjen interval pouzdanosti obuhvaća pravu vrijednost ciljnog analitičkog parametra. Mjerna nesigurnost je kombinacija svih mjernih nesigurnosti, od mjerne nesigurnosti referentne vrijednosti do koje su rezultati sljedivi do svih dodatnih izvora nesigurnosti povezanih s metodom određivanja (Ellison i sur., 1995; Taverniers i sur., 2004a).

Iako su mjerna nesigurnost i ukupna pogreška povezani te se mogu matematički izvesti jedna iz druge (Feinberg i sur., 2004), svrha njihove primjene je potpuno različita zbog razlike u pripadajućim konceptima. Ukupna pogreška se koristi za procjenu prikladnosti za svrhu analitičke metode najčešće u fazi validacije, dok se mjerna nesigurnost koristi za procjenu da li analitički rezultat u rutinskim analizama udovoljava specifikaciji (Rozet i sur., 2011b). Nadalje, poznavanje mjerne nesigurnosti analitičkih rezultata uz sljedivost do zajedničkih primarnih referenci, preduvjet je i usporedbe analitičkih rezultata. Ukupna pogreška definira interval oko referentne ili konvencionalne vrijednosti u kojem će se analitički rezultat nalaziti s određenom vjerojatnosti, te time procjenjuje utjecaj koje će izvedbene karakteristike analitičkog sistema imati na buduća rutinska mjerenja. Nasuprot ukupnoj pogrešci, mjerna nesigurnost definira interval oko analitičkih mjerenja unutar kojeg se referentna vrijednost nalazi sa zadanom vjerojatnosti. Ukupna pogreška obuhvaća i sustavnu pogrešku, dok se pri procjeni mjerne nesigurnosti pretpostavlja da je sustavna pogreška korigirana. Uklanjanje svih izvora sustavnih pogrešaka analitičke metode rijetko je stvarno moguće i provesti, radi čega njihov utjecaj treba uzeti u obzir pri procjeni ukupne mjerne nesigurnosti (Hund i sur., 2001). Nadalje, u konceptu ukupne pogreške ne razmatraju se izvori mjerne nesigurnosti zasebno, već se procijenjuje njihov ukupan utjecaj. Nasuprot tome pristup odozdo prema gore (engl. *bottom-up approach*) mjerne nesigurnosti zahtijeva analizu svih izvora nesigurnosti, te propagaciju u adekvatan model. Pristup odozdo prema gore (engl. *bottom-up approach*) izvorno je predložen za kvantifikaciju fizikalnih mjerenja, te naknadno razrađen za određivanja kemijskih parametara (Ellison i sur., 1995), te se temelji na identifikaciji, kvantifikaciji i kombinaciji svih izvora mjerne nesigurnosti, što je u stvarnosti teško provedivo.

2.3.2. Profil točnosti

Profil točnosti (engl. *accuracy profile*) temeljen na ukupnoj pogrešci statistički je alat koji omogućava da se u procesu validacije analitičke metode analiziraju buduće izvedbene karakteristike analitičke metode u odnosu na zadanu granicu prihvatljivosti (Hubert i sur., 1999; Boulanger i sur., 2003). Iako se profil točnosti temelji na konceptu ukupne pogreške može se izvesti i iz mjerne nesigurnosti (Gonzales i Herrador, 2006).
Analitički rezultat može se razlikovati od nepoznate prave vrijednosti (T) unutar granice prihvatljivosti (λ) (Gonzales i Herrador, 2007):

$$|Z - T| < \lambda \qquad (2.23.)$$

gdje je

Z analitički rezultat.

Granica prihvatljivosti λ ovisi o svrsi analitičke metode (Feinberg, 2007).

$$P(|Z - \mu| < \lambda) \geq \beta \qquad (2.24.)$$

gdje je

β vjerovatnost da će analitički rezultati u budućnosti biti unutar zadanih granica prihvatljivosti

Profil točnosti koristi interval tolerancije (engl. *β-expectation Tolerance Interval, βETI*) za ispitivanje prikladnosti za svrhu analitičke metode. *βETI* interval se računa za svaku pojedinu koncentraciju, gornje i donje granice povezuju se ravnim linijama uz interpolaciju vrijednosti *βETI* između zadanih koncentracija (Gonzales i Herrador, 2006). U tu svrhu ispituje se zadani broj validacijskih standarda (VS) u cijelom specificiranom rasponu analitičke metode. Granice kvantifikacije su sjecišta između linija interpolacije i granica prihvatljivosti. Pristranost *(*engl. *bias*) može se izraziti pomoću jednadžbe:

$$\delta = Z - \hat{Z} \quad (2.25.)$$

gdje je

δ pristranost ili *bias;*

Z analitički rezultat;

$\hat{Z}$ procjena nepoznate prave vrijednosti analitičkog parametra.

Uz pretpostavku da je Z aritmetička sredina *n* replikata (engl. *replicates*) validacijskog standarda određene koncentracije određena pri različitim uvjetima *p* (dani, laboratoriji, itd) *βETI* interval se može opisati donjim intervalom:

$$\delta \pm Q_t k_s S_R \quad (2.26.)$$

gdje su

$Q_t\left(\nu_i; \frac{1+\beta}{2}\right)$ β kvantil Studentove *t*-raspodjele s ν stupnjeva slobode;

ν_i Satterthweite aproksimacija stupnjeva slobode;

S_R intermedijarna preciznost izražena kao standardna devijacija;

k_s faktor ekspanzije (engl. *expansion factor*).

$$k_s = \sqrt{1 + \frac{1}{pnB^2}} \quad (2.27.)$$

$$B = \sqrt{\frac{R+1}{nR+1}} \quad (2.28.)$$

$$R = \frac{S_B^2}{S_r^2} \quad (2.29.)$$

gdje su:

S_B^2 varijanca između grupa (engl. *between-series variance*)

S_W^2 varijanca unutar grupe (engl. *within-series variance*)

Za konstrukciju profila točnosti nužan je homogen uzorak s varirajućim udjelom vode (Grohganz i sur., 2010).

2.3.3. Rizik dobivanja rezultata izvan granica prihvatljivosti

Rizik dobivanja rezultata izvan granica prihvatljivosti direktno se izvodi iz intervala tolerancije izračunom vjerojatnosti da se dobije rezultat izvan gornje i donje granice prihvatljivosti. Vjerovatnost dobivanja rezultata izvan granica prihvatljivosti računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$P\left[\left|\frac{x_i-\mu_T}{\mu_T}\right| > \lambda\right] = P\left[\frac{x_i-\mu_T}{\mu_T} < (-\lambda)\right] + P\left[\frac{x_i-\mu_T}{\mu_T} < (+\lambda)\right] =$$

$$= P\left[t(\nu) < \frac{-\lambda(\%)-\delta(\%)}{S_R\sqrt{1+\frac{nS_B^2+S_W^2}{pn(\sigma S_B^2+S_W^2)}}}\right] + P\left[t(\nu) > \frac{-\lambda(\%)-\delta(\%)}{RSD_{IP}\sqrt{1+\frac{nS_B^2+S_W^2}{pn(S_B^2+S_W^2)}}}\right] \quad (2.30.)$$

2.3.4. Sustavna pogreška

Procjena sustavne pogreške (engl. *systematic error*) ili pristranosti (engl. *method bias*) sastavni je dio procjene validacijskog parametra odstupanja od prave vrijednosti (engl. *trueness*). Odstupanje od prave vrijednosti se procjenjuje pomoću certificiranih referentnih materijala CRM koji su sljedivi do internacionalnih standarda i poznate mjerne nesigurnosti, usporedbom s referentnom metodom poznate točnosti, te testovima iskorištenja u matriksu ili uzorku (Gonzales i sur., 1999). Nedostupnost CRM koji pokrivaju vrlo uzak raspon kombinacija matriksa i analita te alternativnih analitičkih metoda, čine test iskorištenja (engl. *recovery assay*) najviše korištenim alatom za procjenu odstupanja od prave vrijednosti (engl. *trueness*) u farmaceutskim analizama (Gonzales i sur.,1999).

Sustavnu pogrešku čine proporcionalna pogreška (engl. *proportional error*) i konstantna ili aditivna pogreška (engl. *constant error, additive error*) (Maroto i sur., 2001). Izračun proporcionalne i konstantne pogreške ovisi o tome da li su dostupni placebo uzorci, odnosno da li je moguće pripraviti matriks uzorka bez analita, koji je po svim drugim svojstvima

istovjetan uzorku. U slučaju da placebo uzorci nisu dostupni, proporcionalna pogreška može se odrediti dodavanjem definirane količina analita u uzorke (engl. *spiked samples*) u zadanom rasponu analitičke metode, tj metodom standardnog dodavanja (engl. *Standard Addition Method*, SAM). Proporcionalna pogreška procjenjuje se na temelju testa iskorištenja uz pretpostavku da matriks ne pridonosi signalu kao intereferirajuća komponenta i da nema interakcije između analita i matriksa. Konstantna pogreška procjenjuje se pomoću Youden metode (Maroto i sur., 2001). Youden metoda se provodi analizom različitih količina uzorka (Youden, 1947).

Metoda standardnog dodavanja se koristi za procjenu iskorištenja uzoraka u koji je dodan analit (Gonzales i sur., 1999; Maroto i sur., 2001) prema jednadžbi:

$$Y = a_{SAM} + b_{SAM} C_{spike} \tag{2.31.}$$

$$R = \frac{Y - a_{SAM}}{b_{SAM} C_{Spike}} \tag{2.32.}$$

gdje je

a_{SAM} odsječak SAM kalibracijskog pravca (engl. *intercept*);

b_{SAM} nagib SAM kalibracijskog pravca (engl. *slope*);

C_{Spike} koncentracija analita dodana u uzorak.

R iskorištenje

2.4. Statistička kontrola procesa (SPC)

Statistička kontrola procesa (engl. *Statistical Process Control,* SPC) je skup metoda i postupaka za prikupljanje, obradu, analizu, tumačenje i prikaz podataka s ciljem osiguravanja kvalitete proizvoda i procesa. Proces koji je pod statističkom kontrolom stabilan je u vremenu, predvidljiv kako sa stajališta kvantitete tako i kvalitete, te omogućava jasno razlučivanje efekata poboljšanja procesa koji bi inače bili prikriveni nepredviđenim varijacijama (Ermer i Miller, 2005).

2.4.1. Kontrolne karte

Kontrolne karte (engl. *control charts*) služe za praćenje procesa u zadanim vremenskim intervalima, pri čemu proces može biti testiranje, kalibracija itd. Cilj je neprekidnim praćenjem provjeravati da li je proces pod statističkom kontrolom, odnosno da li su sve vrijednosti promatranih parametara slučajno raspršene unutar kontrolnih granica; pravovremeno otkriti neočekivana odstupanja od postavljenih zahtjeva, kako bi se mogle pravovremeno poduzeti odgovarajuće korektivne akcije; te indirektno utvrditi uzroke neočekivanih odstupanja, ukoliko se prate parametri koji mogu utjecati na ta odstupanja. Interna kontrola kvalitete (engl. *Internal Quality Control,* IQC) temeljena na kontinuiranoj interpretaciji rezultata analize kontrolnih materijala analitičkih testova sastavni je dio rutinske analize. Interpretacija IQC rezultata omogućava da rezultati kontinuirano udovoljavaju kriterijima prikladnosti za svrhu analitičke metode te pravovremeno uočavanje odstupanja od trenda ili očekivanih vrijednosti.

Kontrolne karte razvijene su kao vrlo jednostavan i učinkovit alat za praćenje rutinskih analitičkih IQC operacija (Howarth, 2003). Kontrolne karte omogućavaju pravovremeno uočavanje promjena u procesu tj. razlikovanje prirodne varijabilnosti procesa od dodatnih varijacija, koje upućuju na promjene u procesu (Ermer i Miller, 2005). Uloga kontrolnih karata je profilaktična, tj. pridonose smanjenju rezultata izvan specifikacije OOS, kontinuiranim praćenjem rezultata izvan trenda OOT i rezultata izvan očekivanja OOE: Kontrolne karte mogu se koristiti i za praćenje odstupanja od prave vrijednosti (engl. *trueness*) uz uvjet da se koristi CRM sljediv do internacionalnih standarda (Taverniers i sur., 2004b).

Kontrolne karte dijele se na kontrolne karte za mjerne podatke (varijable) i kontrolne karte za opisne podatke (atribute). Kontrolne karte koriste apsolutne podatke, raspone podataka, standardne devijacije za ponovljena mjerenja i CuSum podatke. Razlikuju se X-bar karte, kojima se kontrolira srednje vrijednosti varijable, R-karte koje koriste raspone za kontrolu varijabilnosti varijable, S-karte te S^2-karte, koje koriste standardne devijacije odnosno standardne varijance za praćenje varijabilnosti varijable (Ermer i Miller, 2005).

Shewhart kontrolna karta prikazuje kontrolne granice koje se izvode iz ciljne vrijednosti karakteristike kvalitete (engl. *target value*) odnosno procjene aritmetičke sredine (μ) i standardne devijacije (σ). Uz kontrolne granice (engl. *action limit*) koje odgovaraju približno intervalu $\mu \pm 3\sigma$, definiraju se i granice upozorenja (engl. *warning limit*), koje odgovaraju intervalu $\mu \pm 2\sigma$. Shodno tome, kontrolne granice definiraju interval u kojem se nalazi 99,7 % svih rezultata, a granice upozorenja interval koji obuhvaća 95 % svih rezultata (Petz, 2007). Kontrolne granice temeljene su na stvarnim izvedbenim karakteristikama procesa te se razlikuju od granica specifikacije. Shodno tome, proces može biti stabilan, a da ne udovoljava postavljenim zahtjevima.

CuSum analiza prikazuje promjene između trenutnog i prethodnih mjerenja, u cilju boljeg prikaza malih trendova u procesu. CuSum prikazuje kumulativnu sumu sukcesivnih razlika analitičkih rezultata i pripadne aritmetičke sredine, čime se detektiraju i vrlo mali permanentni pomaci koji bi inače ostali nezamijećeni prilikom interpretacije X-karte (Woodward i Goldsmith, 1964). CuSum analiza omogućuje istragu povezanosti statistički značajnih promjena s promjenama u procesu.

Interpretacija CuSum kontrolne karte temelji se na promjeni nagiba koji potencijalno ukazuje na trend porasta ili pada parametra. Test signifikantnosti svake promjene temelji se na usporedbi omjera maksimalne vrijednosti CuSum i standardne devijacije (s_L) s kritičnim vrijednostima za zadani raspon uz zadanu pouzdanost, 95% ili 99%.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A i C i liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C

U ovom istraživanju korištene su djelatne tvari tj. pročišćeni meningokokni polisaharidi serogrupe A i C i gotovi proizvod – liofilizirano cjepivo protiv meningokoka serogrupa A i C:

- 72 serije (*n*) pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A dobivenih iz soja *Neisseria meningitidis* grupa A – M 1027 (ATCC 13077);
- 68 serija (*n*) pročišćenih meningokoknih polisaharida grupe C su dobivenih iz soja *Neisseria meningitidis* grupa C – C 11 (ustupljeno iz The Rockefeller University, NY, SAD).
- 73 serije (*n*) liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, polisaharidno označene (Imunološki zavod, Zagreb).

3.1.2. Standardi i kemikalije za Karl-Fischer volumetrijske titracije

Standard dinatrijevog tartarata dihidrata, $C_4H_4Na_2O_6$, $2H_2O$ (Apura® kat. br. 1.06664, Merck, Darmstadt, Njemačka), s udjelom vode 15,66 % ± 0,05 %, je referentni materijal za volumetrijsko određivanje vode Karl-Fischer metodom, sljediv do standardnog referentnog materijala (SRM) 2890 NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD).

Standard s 1% vode; 1g standarda sadrži približno 10 mg vode (Apura®, kat. br. 1.88052, Merck, Darmstadt, Njemačka) s udjelom vode od 0,997 % ± 0,010 %. Ovaj standard je referentni materijal za volumetrijsko određivanje vode Karl-Fischer metodom, sljediv do SRM 2890 NIST (Gaithersburg, SAD).

Titrant 2 – Karl-Fischer reagens za volumetrijsku titraciju s dvokomponentnim reagensima (Apura®, kat. br. 1.88011, Merck, Darmstadt, Njemačka); 1 ml titranta 2 ekvivalentan je približno 2 mg vode.

Titrant 5 – Karl-Fischer reagens za volumetrijsku titraciju s dvokomponentnim reagensima (Apura®, kat. br. 1.88010, Merck, Darmstadt, Njemačka); 1 ml titranta 5 ekvivalentan je približno 5 mg vode.

Karl-Fischer otapalo za volumetrijsku titraciju s dvokomponentnim reagensima (Apura® Solvent, kat. br. 1.88015, Merck, Darmstadt, Njemačka).

Etanol (Emsura® Solvent, kat. br. 1.00983, Merck, Darmstadt, Njemačka).

Voda za injekcije *in bulk* (Imunološki zavod, Zagreb).

3.1.3. Mjerni uređaji, instrumenti i programski paketi

U pripravi uzoraka za Karl-Fischer volumetrijsku titraciju korištena je semi-mikro analitička vaga AT261 Delta Range (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska).
Mjerenje relativne vlažnosti zraka (%) tijekom Karl-Fischer volumetrijske titracije je provedeno higrometrom OPUS 10 (Lufft, Fellbach, Njemačka).
Sušenje praznih bočica nakon Karl-Fischer volumetrijske titracije provedeno je u sušioniku UF450 (Memmert, Buechenbach, Njemačka).
Karl-Fischer volumetrijska titracija provedena je pomoću DL38 titratora (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska).

Za snimanje NIR spektara korišten je FT-NIR spektrometar Multi Purpose Analyzer (MPA) (Bruker Optik, Ettlingen, Njemačka) opremljen integrirajućom sferom, izvorom NIR zračenja, *corner cube* interferometrom, te NIR detektorom fotona od olovnog sulfida (PbS).

Za snimanje NIR spektara korišten je program OPUS 4.2 (Bruker Optik, Ettlingen, Njemačka). Obrada snimljenih spektara i multivarijatna analiza podataka provedeni su programom Unscrambler 10.4 (Camo Software AS, Oslo, Norveška).

Validacijski podaci dobiveni za udjel ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C statistički su obrađeni pomoću programa Enoval V4.0 (Arlenda, Liège, Belgija).

3.1.4. Pribor

- Lađice i posudice za vaganje (SigmaAldrich, Švicarska)
- Šprice (Becton Dickinson, Eysins, Švicarska)
- Injekcijske igle (Becton Dickinson, Eysins, Švicarska)
- Hamilton šprica (Hamilton, Bonaduz, Švicarska)
- Laboratorijska čaša (Schott AG, Mainz, Njemačka).

3.2. Metode

3.2.1. Karl-Fischer volumetrijske metode

Kroz sustavni pristup razrade svih faza izvedbe Karl-Fisher titracija liofiliziranoga cjepiva i pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupa A i C istraženi su svi ključni parametri Karl-Fisher volumetrijske titracije (podaci nisu opisani u ovome radu). Optimalni parametri dobiveni na temelju sustavnog pristupa su opisani u poglavljima koja slijede.

3.2.1.1. Standardna Karl Fischer volumetrijska metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C

Definirani su optimalni uvjeti za izvođenje Karl-Fisher volumetrijske titracije: jakost struje polarizacije I_{pol}= 20 µA, maksimalna i minimalna brzina titracije izražena na 0,1 s: Δv_{min}= 0,5 µl, Δv_{max}= 6 µl, Δv_{max} faktor 100 %; te relativna vrijednost *drift* za završnu točku titracije od 15 µg/min. Prije određivanja udjela vode u cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C određena je točna koncentracija Karl-Fischer titranta 5 kojom se definira masa vode koja je ekvivalentna 1 ml utrošenog titranta 5. Za određivanje ove koncentracije je korišten standard dinatrijevog tartarata dihidrata. Nakon toga, u posudu za titraciju dodano je približno 40 ml Karl-Fischer otapala za volumetrijsku titraciju s dvokomponentnim reagensima. Pokrenuta je predtitracija sustava za Karl-Fischer titraciju do uspostave stabilne *drift* vrijednosti (5 µg vode/min). Paralelno s predtitracijom izmjerena je relativna vlažnost zraka (%) u laboratoriju

pomoću higrometra. Po završetku predtitracije pripravljen je zbirni uzorak (engl. *pool*) liofilizata cjepiva načinjen od liofilizata iz sedam bočica gotovog proizvoda u kratkom vremenu (< 5 min) kako bi se smanjila izloženost liofiliziranog cjepiva atmosferskim utjecajima. Posudica za vaganje sa zbirnim uzorkom liofilizata cjepiva postavljena je na semi-mikro analitičku vagu i vaga je tarirana. Zbirni uzorak je prenesen u posudu za titraciju Karl-Fischer titratora te je pokrenuta titracija. Posudica za vaganje ponovno je položena na vagu i povratnim vaganjem određena masa titriranog zbirnog uzorka. Cjelokupni postupak predtitracije, priprave zbirnog uzorka te titracije je ponovljen ukupno tri puta te je izračunata aritmetička sredine udjela vode (%) za tri titracije. Rezultat je izražen kao omjer aritmetičke sredine udjela vode (%) i broja bočica iz kojih je pripravljen zbirni uzorak (engl. *pool*) liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (n = 7).

Određivanje udjela ostatne vode (%) provedeno je na ovdje opisan način u 61 (n) proizvodnoj seriji liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C kroz vremensko razdoblju od približno 18 mjeseci.

Deskriptivna statistika ovako dobivenih rezultata za udjel vode primijenjena je za provjeru normalne razdiobe (engl. *normal distribution*) podataka (poglavlje 3.2.3.1.).

Trend analiza rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u 61 seriji (n) liofiliziranih cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C kroz vremenski period od 18 mjeseci je provedena pomoću Shewhart kontrolne karte. Uz CuSum analizu rezultata udjela ostatne vode (%) za 61 seriju (n) liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C provedena je i CuSum analiza rezultata određivanja relativne vlažnosti zraka (%) (poglavlje 3.2.3.2.).

3.2.1.2. Referentna Karl-Fischer volumetrijska metoda za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C

Definirani su optimalni uvjeti za izvođenje Karl-Fisher volumetrijske titracije: jakost struje polarizacije I_{pol}= 20 µA, maksimalna i minimalna brzina titracije izražena na 0,1 s: Δv_{min}= 0,5 µl, Δv_{max}= 4 µl, Δv_{max} faktor 100 % te relativna vrijednost *drift* za završnu točku titracije 15 µg/min. Za određivanje koncentracija Karl-Fischer titranta 2 je korišten standard dinatrijevog tartarata dihidrata. U posudu za titraciju dodano je približno 40 ml Karl-Fischer otapala i pokrenuta je predtitracija. Tijekom trajanja predtitracije pripravljen je uzorak za titraciju. Najprije je uklonjen plastični dio aluminijsko-plastične kapice s bočice liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C bez otvaranja bočice. Označene bočice s gumenim čepom i aluminijskim prstenom bez plastične kapice postavljene su na semi-mikro analitičku vagu i zabilježena je njihova masa. Pri kraju predtitracije dugom injekcijskom iglom (punkcijska igla) kroz otvor za injekcije iz posude za titraciju uvučeno je približno 5 ml Karl-Fischer predtitriranog otapala u injekcijsku špricu i ponovno vraćeno u posudu za titraciju. Ispiranje šprice i injekcijske igle ponavljano je sve dok povrat otapala iz šprice u posudu za titraciju više nije uzrokovao znatan porast *drift* vrijednost (µg vode/min) (Slika 12a.). Predtitrirano otapalo uvučeno je špricu (Slika 12b.), šprica s otapalom položena je u plastičnu čašu tako da je injekcijska igla okrenuta prema gore i položena na semi-mikro analitičku vagu (Slika 12c.). Vaga je tarirana i Karl-Fischer predtitrirano otapalo je injektirano kroz gumeni čep bočice liofiliziranog cjepiva (Slika 12d.). Masa injektiranog otapala (f_3) određena je povratnim vaganjem. Ostatak otapala istisnut je iz šprice u posudu za Karl-Fischer organski otpad. Bočica s cjepivom u koju je dodano Karl-Fischer predtitrirano otapalo lagano je promućkana kako bi se pospješilo otapanje liofilizata u otapalu. U istu je špricu iz bočice uvučen alikvot otopine liofiliziranog cjepiva u predtitriranom Karl-Fischer otapalu (Slika 12e.). Šprica s alikvotom otopine uzorka položena je u plastičnu čašu tako da je injekcijska igla okrenuta prema gore i položena na semi-mikro analitičku vagu (Slika 12f.). Vaga je tarirana. Nakon injektiranja alikvota otopine liofilizata cjepiva u posudu za titraciju (Slika 12g.) šprica s injekcijom položena je ponovno na vagu i povratnim vaganjem određena je masa titriranog alikvota otopine (Slika 12h.). Rezultat Karl-Fischer titracije je izražen je kao masa vode (mg) i udjel vode (%) u titriranom alikvotu otopine uzorka. Nakon završene titracije uklonjen je gumeni čep i aluminijski dio aluminijsko-plastične kapice s bočice cjepiva, označeni su gumeni čep i aluminijski prsten, bočice su isprane vodom i završno etanolom, te sušene u sušioniku pri 110 °C/ 2 h. Nakon kondicioniranja na sobnu temperaturu (engl. *Controlled Room*

Temperature, CRT) izvagane su isprane i osušene bočice s pripadajućim čepom i aluminijskim dijelom kapice. Razlika odvage bočice s uzorkom prije titracije i odvage tare nakon titracije odgovara masi uzorka (f_2). Udjel ostatne vode (%) u uzorku izračunat je prema jednadžbama:

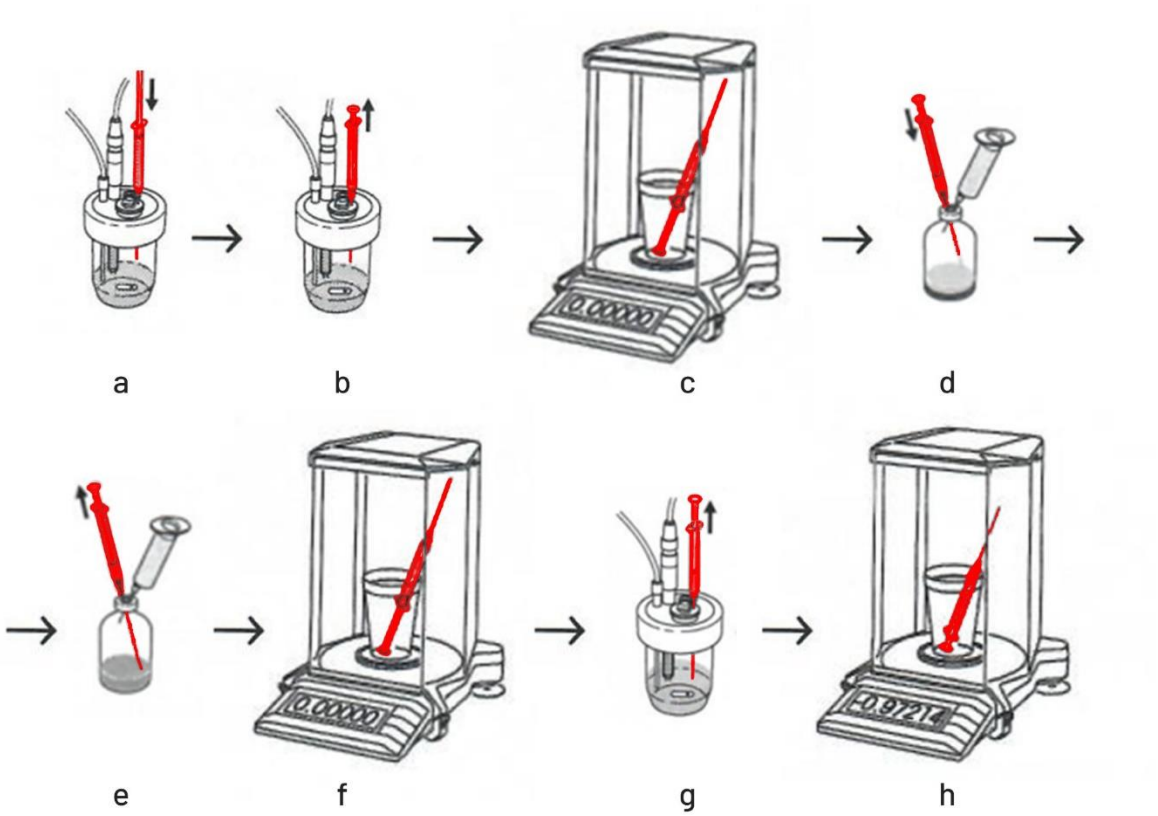
$$H_2O_{uz}\ (\%) = H_2O_{alikv} \times \frac{f_2 + f_3}{f_2} \qquad (3.1.)$$

$$H_2O_{uz}\ (\%) = \left(\frac{m_{H2O}}{m_{alikv}}\right) \times \frac{f_2 + f_3}{f_2} \qquad (3.2.)$$

f_2 masa uzorka liofilizata (mg);

f_3 masa predtitriranog Karl-Fischer otapala dodana u uzorak liofilizata (mg);

H_2O_{alikv} udjel vode u titriranom alikvotu otopine uzorka (%).



Slika 12. Shematski prikaz postupka određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

U svrhu priprave slijepe probe za referentnu Karl-Fischer volumetrijsku titraciju, tri prazne smeđe staklene bočice u koje nije dodan finalni *bulk* cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C priređene su za liofilizaciju paralelno sa svakom proizvodnom serijom cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C. Karl-Fischer volumetrijska titracija ovih triju slijepih proba provedena je pod istovjetnim eksperimentalnim uvjetima odnosno paralelno s uzorcima serija gotovog proizvoda iz istog ciklusa liofilizacije (m = 59-73).

3.2.1.2.1. Test sukladnosti

U testu sukladnosti (engl. *suitability test*) za novu referentnu Karl-Fischer volumetrijsku metodu za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C korišten je standard s 1 % vode s deklariranim sadržajem vode od 9,97 mg/g tj. 0,997 % te definiranom mjernom nesigurnosti koja iznosi 0,997 % ± 0,010 %. Nadalje, u testu sukladnosti je korištena jedna serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C označena brojem 60 (m = 60). Nakon određivanja mase vode (mg) u uzorku ove jedne serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (m = 60) pod zadanim eksperimentalnim uvjetima (poglavlje 3.2.1.2.), u istu otopinu u posudu za titraciju dodano je i titrirano u nizu pet različitih volumena standarda s 1% vode. Prethodno je šprica s injekcijom isprana s približno 1 ml standarda s 1 % vode, te je pomoću iste šprice s injekcijom iz staklene ampule uvučen maksimalan volumen preostalog standarda s 1% vode. Nakon svakog od pet injektiranja alikvota standarda s 1% vode u posudu za titraciju, masa titriranog alikvota standarda određena je povratnim vaganjem. Provedena je linearna regresija kumulativno dodane vode (mg) prema masi vode (mg) određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom te su izračunati odsječak na osi ordinata (a), nagib pravca (b), kao i sjecište ekstrapoliranog pravca i apscise (d) (EDQM, 2015).

Kriteriji prihvatljivosti za sukladnost referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom meningokoknom cjepivu serogrupa A i C obuhvaćaju nagib pravca (b), pogreške (e_1 i e_2) i aritmetičku sredinu iskorištenja, kako slijedi:

$$0{,}975 < b < 1{,}025 \tag{3.3.}$$

$$e_1 = \frac{a-m}{m} \times 100\% \leq 2{,}5\ \% \tag{3.4.}$$

$$e_2 = \frac{d-m}{m} \times 100\% \leq 2{,}5\ \% \qquad (3.5.)$$

a odsječak na osi ordinate (mg);

d odsječak na osi apscise (mg);

m masa vode u uzorku liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C (*m* = 60), (mg).

Prema dodatnom kriteriju prihvatljivosti aritmetička sredina iskorištenja (%) u testu sukladnosti nije manja od 97,5 % niti viša od 102,5 % (EDQM, 2015).

3.2.1.2.2. Validacija

U postupku validacije referentne Karl-Fischer volumetrijske metode procijenjeni su sljedeći validacijski parametri: odstupanje od prave vrijednosti (engl. *trueness*), preciznost (engl. *precision*) i linearnost (engl *linearity*).

U svrhu procjene odstupanja od prave vrijednosti (engl. *trueness*) referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C, titrirano je šest različitih nasumičnih alikvota standarda s 1% vode (poglavlje 3.2.1.2.). Ovaj eksperimentalan protokol je ponovljen kroz četiri različita dana od strane dva analitičara. U tu svrhu šprica s injekcijom isprana je s približno 1 ml standarda s 1% vode te je iz staklene ampule uvučen maksimalan volumen standarda s 1% vode. Potom je alikvot ovog standarda injektiran u posudu za titraciju te je masa alikvota standarda određena povratnim vaganjem. U svrhu procjene odstupanja od prave vrijednosti korišten je test iskorištenja (poglavlje 3.2.3.3.).

U svrhu procjene preciznosti metode, ponovljivosti (engl. *repeatability*) i intermedijarne preciznosti (engl. *intermediate precision*), korišteni su rezultati određivanja udjela vode (%) u standardu s 1% vode. Dodatno su u svrhu procjene preciznosti korišteni i rezultati određivanja udjela ostatne vode (%) u tri konsekutivne serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (*m* = 59, 60, 61) referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Procjena varijabilnosti unutar serije i između serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C provedena je analizom rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u tri konsekutivne serije ovog cjepiva (*m* = 59, 60, 61).

Za procjenu preciznosti metode korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), (poglavlje 3.2.3.4.).

Procjena linearnosti u zadanom rasponu metode provedena je analizom rezultata određivanja udjela vode (%) u standardu s 1 % vode. Analizirana je osjetljivost (engl. *sensitivity, response factor*), tj. omjer analitičkog signala i pripadne koncentracije kao funkcija koncentracije (Ermer i Miller, 2005). Provedena je linearna regresija i izračunati parametri linearne regresije metodom najmanjih kvadrata (engl. *linear square regression*), koeficijent određivanja (engl. *coefficient of determination*, R^2), nagib regresijskog pravca (engl. *slope*) i odsječak na osi ordinate (engl. *intercept*) (poglavlje 3.2.3.5.).

3.2.1.3. Karl-Fischer volumetrijska metoda za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i C

Definirani su optimalni uvjeti za izvođenje Karl-Fisher volumetrijske titracije: jakost struje polarizacije I_{pol} = 20 µA, maksimalna i minimalna brzina titracije izražena na 0,1 s: Δv_{min} = 0,5 µl, Δv_{max} = 8 µl, Δv_{max} faktor 100 % te relativna vrijednost *drift* za završnu točku titracije 15 µg/min. Nakon određivanja koncentracije Karl-Fischer titranta 5 pomoću standarda dinatrijevog tartarata dihidrata u posudu za titraciju dodano je približno 40 ml Karl-Fischer otapala. Pokrenuta je predtitracija te uspostavljena stabilna *drift* vrijednost (5 µg vode/min). Izvagano je približno 100 mg uzorka pročišćenog meningokoknog polisaharida serogrupe A (A1-A72) ili C (C1-C68) u posudicu za vaganje, posudica je položena na semi-mikro analitičku vagu i vaga je tarirana. Uzorak je prenesen u posudu za titraciju i pokrenuta je titracija. Nakon završetka titracije, posudica za vaganje ponovno je položena na vagu i masa titriranog uzorka određena je povratnim vaganjem. Postupak je ponovljen ukupno tri puta za svaki uzorak te je rezultat izražen kao aritmetička sredina udjela vode (%) u tri titrirana uzorka za svaku seriju pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A ili pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C.

Procijenjeni validacijski parametri Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C iznosili su redom: odstupanje od prave vrijednosti (0,4 %), ponovljivost (0,3 %), intermedijarna preciznost odnosno reproducibilnost (0,3 %) te linearnost (R^2 = 1,00).

3.2.2. Spektroskopijske NIR metode

3.2.2.1. Spektroskopijska NIR metoda za određivanje udjela ostatne vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C

Slučajnim odabirom iz ukupno 11 serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (m = 62 - 72) odabrano je sedam serija ovog gotovog proizvoda za kalibracijski set, a preostale četiri serije gotovog proizvoda dodijeljene su optimizacijskom test setu. U postupku uzorkovanja iz svake od 11 serija liofiliziranog cjepiva slučajnim odabirom izdvojeno je po pet uzoraka tj. ukupno 55 uzoraka liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C. Na taj je način kalibracijski set obuhvatio ukupno 35 uzoraka gotovog proizvoda (po pet uzoraka iz sedam odabranih serija) te je nakon toga iz ovog kalibracijskog seta slučajnim odabirom izdvojeno 25 uzoraka, u koje je dodana voda za injekcije *in bulk* s Hamilton špricom bez otvaranja bočice. Tako su načinjeni uzorci s većim udjelom vode, koji su korišteni za formiranje NIR modela. Uzorci kalibracijskog seta u koje je dodana voda inkubirani su kroz 24 h pri kontroliranoj sobnoj temperaturi (CRT), kako bi se omogućile interakcije između vode i matriksa prije snimanja NIR spektra. Uzorci kalibracijskog seta označeni su rednim brojevima (m_{kal} = 1 - 35).

Iz optimizacijskog test seta koji je obuhvatio 20 slučajno odabranih uzoraka iz 4 serije ovog cjepiva, slučajno je odabrano 14 uzoraka u koje je dodana voda za injekcije *in bulk* uz korištenje Hamilton šprice bez otvaranja bočice. Uzorci optimizacijskog test seta u koje je dodana voda inkubirani su kroz 24 h pri CRT, kako bi se omogućile interakcije između vode i matriksa prije snimanja NIR spektra. Uzorci optimizacijskog test seta označeni su rednim brojevima (m_{opt} = 36 - 55).

NIR spektri snimljeni su difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 10000–3700 cm^{-1}; razlučivanje 8 cm^{-1}; 64 snimaka. Netaknuti (engl. *intact*) uzorci (uzorci liofiliziranoga cjepiva u primarnom pakiranju koje nije otvarano niti su na bili koji način promijenjena izvorna svojstva uzorka) kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta u staklenim smeđim bočicama rotirani su oko aksijalne osi kako bi se snimili NIR spektri za nasumično odabrane položaje, odozdo prema gore kroz dno bočice uz 3-5 ponavljanja, kako bi se dobio prosječan NIR spektar. Uzorak liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (m = 73), odabran je za pripravu tzv. SAM seta uzoraka metodom standardnog dodavanja (engl. *Standard Addition Method*, SAM). U sljedećoj fazi snimljeni su NIR spektri ovog uzorka (SAM0) difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 10000–3700 cm^{-1}; razlučivanje 8 cm^{-1}; 64

snimaka. Netaknut SAM0 uzorak u staklenoj smeđoj bočici rotiran je oko aksijalne osi kako bi se snimili NIR spektri za nasumično odabrane položaje, odozdo prema gore kroz dno bočice, uz pet ponavljanja u dva različita dana. Sukcesivnim dodatkom različitih volumena vode za injekcije *in bulk* s Hamilton špricom u isti nativni uzorak liofiliziranog cjepiva (SAM0) pripravljeno je bez otvaranja bočice ukupno devet SAM uzoraka (SAM1-SAM9) s različitim udjelom dodane vode (%) koji obuhvaćaju raspon NIR analitičke metode. Nakon svakog dodavanja vode za injekcije *in bulk*, određena je masa dodane vode (mg). Nakon inkubacije svih dodatkom vode priređenih uzoraka (SAM1-SAM9) kroz 24 h te 48 h nakon dodavanja vode, snimljeni su NIR spektri SAM1-SAM9 uzoraka difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 10000–3700 cm^{-1}; razlučivanje 8 cm^{-1}; 64 snimaka. Svaki netaknuti SAM uzorak u staklenoj smeđoj bočici rotiran je oko aksijalne osi kako bi se snimili NIR spektri za nasumično odabrane položaje, odozdo prema gore kroz dno bočice kako bi se dobio prosječan NIR spektar. Snimanje NIR spektara prema opisanom eksperimentalnom protokolu provela su dva analitičara uz pet ponavljanja. Postupak je ponovljen za svaki SAM uzorak (SAM1-SAM9).

3.2.2.2. Spektroskopijska NIR metoda za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i C

Istraživanje je obuhvatilo ukupno 72 proizvodne serije pročišćenog meningokoknog polisaharida serogrupe A. Iz svake od konsekutivnih serija ove djelatne tvari izdvojen je testni uzorak nakon završne faze sušenja u vakuumu. Testni uzorci (A1-A72) su čuvani pri temperaturi -20° C. Testni uzorci koji su uzorkovani iz posljednjih 20 konsekutivnih proizvodnih serija ove djelatne tvari (A53-A72) izdvojeni su za validacijski test set. Preostali testni uzorci pročišćenog meningokoknog polisaharida serogrupe A (A1-A52) predviđeni su za formiranje kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta na osnovi matematičkog algoritma.

Za formiranje novog NIR multivarijatnog kalibracijskog modela za određivanje udjela vode (%) u pročišćenom meningokoknom polisaharidu serogrupe C nakon završne faze sušenja u vakuumu, uzorkovano je 68 konsekutivnih proizvodnih serija ove djelatne tvari. Testni uzorci pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C (C1-C68) čuvani su pri temperaturi -20° C. Testni uzorci koji su uzorkovani iz posljednjih 17 konsekutivnih proizvodnih serija (C52-A68) ove djelatne tvari izdvojeni su za validacijski test set. Preostali testni uzorci pročišćenog meningokoka serogrupe C (C1-C51) predviđeni su za formiranje kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta.

NIR spektri snimljeni su difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 10000–3800 cm^{-1}; razlučivanje 16 cm^{-1}; 64 snimaka. Uzorci pročiščenog meningokoknog polisaharida serogrupe A ili C u prozirnim staklenim penicilinskim bočicama ravnog dna začepljeni gumenim čepom rotirani su oko aksijalne osi kako bi se snimili NIR spektri za nasumično odabrane položaje, odozdo prema gore kroz dno bočice uz tri ponavljanja i intenzivnu trešnju (engl. *shaking*) između ponavljanja, kako bi se dobio prosječan NIR spektar.

3.2.3. Statistička analiza

3.2.3.1. Deskriptivna statistika

Deskriptivna statistika opisana u ovome poglavlju primijenjena je za provjeru normalne razdiobe rezultata.

Izračunate su mjere centralne tendencije: aritmetička sredina (engl. *mean*), medijan (engl. *median*) te mod (engl. *mode*) koji predstavlja dominantnu vrijednost koja se ponavlja s najvećom frekvencijom.

Aritmetička sredina izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n} \quad (3.6.)$$

x_i dobivene vrijednosti udjela ostatne vode (%)

n broj uzoraka

Medijan je izračunat iz n vrijednosti (x) poredanih po rastućim vrijednostima $x_1, \ldots x_n$

n paran broj $\tilde{x} = \frac{x_{n+1}}{2}$ (3.7.)

n neparan broj $\tilde{x} = \frac{x_{n/2} + x_{(n+2)/2}}{2}$ (3.8.)

Mjere varijabilnosti: varijanca (engl. *variance*), standardna devijacija (engl. *standard deviation*) i relativna standardna devijacija (engl. *relative standard deviation*), izračunate su prema sljedećim jednadžbama:

Varijanca

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (3.9.)$$

Standardna devijacija

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.10.)$$

Relativna standardna devijacija

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.11.)$$

Mjera spljoštenosti (engl. *Kurtosis*) izračunata je prema jednadžbi:

$$Kurtosis = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^4}{(n-1) \times s^4} \quad (3.12.)$$

Mjera asimetrije (engl. *Skewness*), izračunata je prema jednadžbi:

$$Skewness = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^3}{(n-1) \times s^3} \quad (3.13.)$$

Interval pouzdanosti (engl. *Confidence Limit, CL*) aritmetičke sredine izračunat je prema jednadžbi:

$$CL(P)_{\bar{x}} = \bar{x} \pm \frac{t(P,df)}{\sqrt{n}} \quad (3.14.)$$

$t(P, df)$ Studentova *t*-vrijednost za nivo signifikantnosti *P* i broj stupnjeva sloboda *df*

3.2.3.2. CuSum analiza

Vrijednost CuSum izračunata je prema jednadžbi:

$$CuSum = \sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x}) \quad (3.15.)$$

x_i rezultat određivanja udjela ostatne vode (%)

$\bar{x}$ aritmetička sredina rezultata određivanja udjela ostatne vode (%).

Standardna devijacija (s_L) izračunata je prema jednadžbi:

$$s_L = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n}(x_{i+1} - x_i)^2}{2(n-1)}} \quad (3.16.)$$

Utvrđena je maksimalna apsolutna vrijednost CuSum, te izračunata vrijednost omjera maksimalne CuSum vrijednosti i standardne devijacije (s_L):

$$\frac{|CuSum_{max}|}{s_L} \tag{3.17.}$$

Uspoređene su izračunate vrijednosti omjera maksimalne apsolutne vrijednosti CuSum i standardne devijacije s kritičnom vrijednošću za zadani raspon podataka. Kritične vrijednosti za zadane raspone podataka prikazane su u tablici P1 (poglavlje Prilozi). U slučaju statistički značajne promjene, postupak je ponovljen za nove raspone podataka.

3.2.3.3. Test iskorištenja

Izračunato je iskorištenje (engl. *recovery*) i relativno odstupanje (engl. *relative bias*) prema sljedećim jednadžbama:

$$Iskorištenje(\%) = 100 \times \frac{\bar{x}}{\hat{\mu}} \tag{3.18.}$$

$$Relativno\ odstupanje(\%) = 100 \times \frac{x-\hat{\mu}}{\hat{\mu}} \tag{3.19.}$$

$\bar{x}$ aritmetička sredina određivanja udjela vode (%)
$\hat{\mu}$ teoretski udjel vode (%)

3.2.3.4. Analiza varijance

Jednosmjerna analiza varijance (engl. *one-way Analysis of Variance*, ANOVA) primjenjena je za procjenu ponovljivosti (engl. *repeatability*), intermedijarne preciznosti te varijabilnosti unutar i između serija. Procijenjena je varijanca između grupa (engl. *between-series variance,* s_B^2) i varijanca unutar grupe (engl. *within- series variance,* s_W^2). Izvor varijacije u intermedijarnoj preciznosti, tj. različiti uvjeti odgovaraju različitim danima (*p)*. Pri istovjetnim

uvjetima provedeno je *n* ponavljanja (engl. *replicates*). ANOVA je provedena prema sljedećim jednadžbama:

$$s_W^2 = s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n}(x_{ij}-\bar{x}_i)^2}{p(n-1)} \quad (3.20.)$$

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^{n} x_{ij}}{n} \quad (3.21.)$$

$$s_B^2 = \frac{\sum_{i=1}^{p}(\bar{x}_i-\bar{\bar{x}})^2}{p-1} - \frac{s_r^2}{n} \quad (3.22.)$$

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n} x_{ij}}{pn} \quad (3.23.)$$

Intermedijarna preciznost procijenjena je prema jednadžbi:

$$s_R^2 = s_r^2 + s_B^2 \quad (3.24.)$$

Iz ovih podataka izračunate su relativne standardne devijacije, RSD_r *i* RSD_R.

$$RSD_r = \frac{s_r}{\bar{\bar{x}}} \times 100\ \% \quad (3.25.)$$

$$RSD_R = \frac{s_R}{\bar{\bar{x}}} \times 100\ \% \quad (3.26.)$$

3.2.3.5. Linearna regresija

Nagib pravca (b) i odsječak (a) izračunati su prema jednadžbama:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}[(x_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})]}{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2} \quad (3.27.)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3.28.)$$

$\bar{y}$ aritmetička sredina volumena titranta (ml);

$\bar{x}$ aritmetička sredina mase standarda vode (mg);

x_i masa standarda vode (mg),

y_i volumen titranta (ml).

Intervali pouzdanosti (95%) za procjenu nagiba pravca i odsječka na osi ordinate izračunati su prema donjim izrazima:

$$b \pm t \times s_b \tag{3.28.}$$

$$a \pm t \times s_a \tag{3.29.}$$

t Studentova *t* vrijednost za zadan nivo signifikantnosti (95%)

Standardna devijacija za nagib (s_b) te standardna devijacija za odsječak (s_a) izračunate su prema jednadžbama:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}} \tag{3.30.}$$

$$s_a = s_{y/x}\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2}{n\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}} \tag{3.31.}$$

Standardna devijacija reziduala $\left(s_{y/x}\right)$ izračunata je prema jednadžbi:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \tag{3.31.}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje udjela ostatne vode u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom

Udjel ostatne vode (%) u 61 (*n*) proizvodnoj seriji liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C određen je standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Tablica 1.), kako je to opisano u poglavlju 3.2.1.1.

Tablica 1. Udjel ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C određen standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

Serija	Udjel ostatne vode (%)	Serija	Udjel ostatne vode (%)	Serija	Udjel ostatne vode (%)
1	1,83	21	1,54	41	1,71
2	1,89	22	1,53	42	1,81
3	2,10	23	1,52	43	1,81
4	2,08	24	1,46	44	2,02
5	2,13	25	1,47	45	1,76
6	2,19	26	1,51	46	1,79
7	2,24	27	1,60	47	1,88
8	2,23	28	1,73	48	1,72
9	2,21	29	1,50	49	1,81
10	2,14	30	1,50	50	1,53
11	2,19	31	1,45	51	1,63
12	2,07	32	1,42	52	2,13
13	2,09	33	1,50	53	1,92
14	1,99	34	1,46	54	2,14
15	1,77	35	1,51	55	2,39
16	1,82	36	1,39	56	1,47
17	1,80	37	1,42	57	2,02
18	1,66	38	1,49	58	2,20
19	1,76	39	1,41	59	2,19

Tablica 1. Udjel ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepiv protiv meningokoka serogrupa A i C određen standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom-nastavak.

Serija	Udjel ostatne vode (%)	Serija	Udjel ostatne vode (%	Serija	Udjel ostatne vode (%
20	1,80	40	1,32	60	2,34
				61	2,47

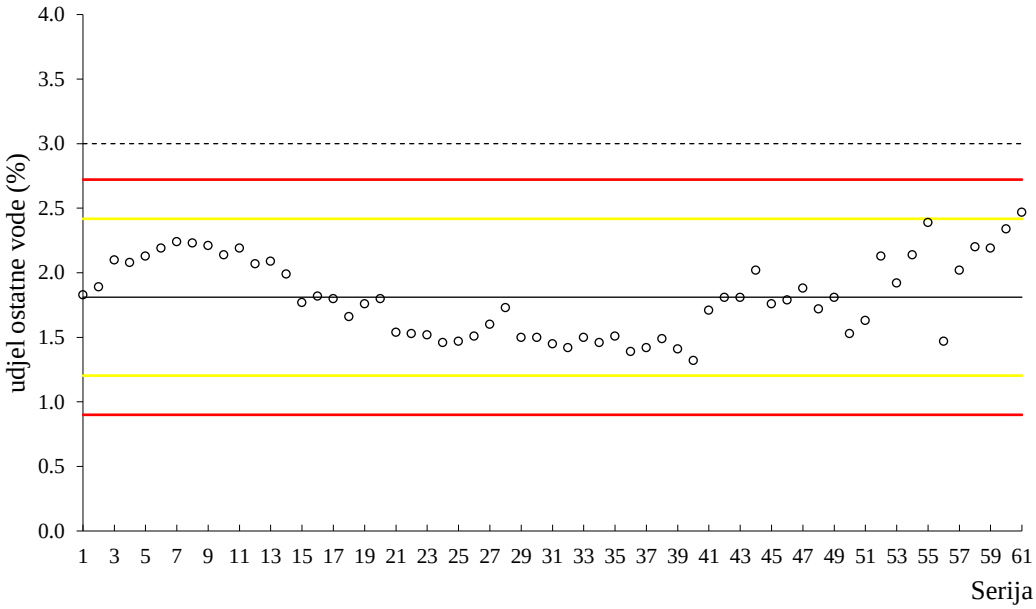
Rezultati određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom statistički su analizirani. Deskriptivna statistika ovih rezultata provedena je kako je to opisano u poglavlju 3.2.3.1, a rezultati provedene analize su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Deskriptivna statistika rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C (m = 1 - 61) standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

Statistički parametar	Vrijednost
Aritmetička sredina	1,81
Standardna greška	0,04
Medijan	1,8
Mod	2,19
Standardna devijacija	0,3
Varijanca	0,09
Kurtosis	-1,1
Skewnes	0,27
Minimum	1,32
Maksimum	2,47
Broj uzoraka	61
Relativna standardna devijacija	16,8
Interval pouzdanosti (95,0%)	(1,73, 1,89)

Usporedba aritmetičke sredine, mod vrijednosti i medijana te vrijednosti *Kurtosis* (mjera spljoštenosti) i *Skewness* (mjera asimetrije podataka), upućuje na normalnu razdiobu rezultata određivanja udjela vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

U svrhu kontinuiranog praćenja ukupnih varijacija kroz vrijeme u udjelu ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C tijekom procesa njegove proizvodnje, izrađena je Shewhart kontrolna karta, kako je to opisano u poglavlju 2.4.1. Shewhart kontrolna karta prikazana je na slici 13. Ukupna varijacija u udjelu ostatne vode (%) obuhvatila je varijaciju analitičke metode za određivanje udjela vode (standardna Karl-Fischer volumetrijska metoda) i varijaciju procesa liofilizacije cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C. Ukupne varijacije u udjelu vode (%) odnose se na reprezentativni uzorak od 61 konsekutivne proizvodne serije liofiliziranog cjepiva (n = 61), koje su proizvedene kroz vremenski period od približno 18 mjeseci.



Slika 13. Shewhart kontrolna karta rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Aritmetička sredina rezultata (μ) označena je punom crnom linijom, kontrolne granice ($\mu \pm 3\sigma$) označene su punom crvenom linijom, granice upozorenja ($\mu \pm 2\sigma$) označene su punom žutom linijom te granica specifikacije isprekidanom crnom linijom.

Shewhart kontrolna karta tj. analiza trenda ukazuje da su svi rezultati određivanja udjela ostatne vode (%) za sve proizvodne serije (n = 61) liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C unutar kontrolnih granica $\mu \pm 3\sigma$, koje približno odgovaraju 99,7 % granici pouzdanosti (poglavlje 2.4.1). Gotovo svi rezultati (n = 60) određivanja udjela ostatne vode (%) su unutar granica upozorenja $\mu \pm 2\sigma$ (vidi poglavlje 2.4.1), koja približno odgovara granici pouzdanosti od 95 %. Identificiran je samo jedna serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, kod koje je određen udjel ostatne vode iznosio 2,5 % (m = 61). Rezultati izvan granice upozorenja uz 95% pouzdanosti, očekuju se u prosjeku u jednom od dvadeset analiziranih uzoraka. Dakle, proces je pod statističkom kontrolom (poglavlje 2.4).
Nadalje, iz Shewhart kontrolne karte (Slika 13.) može se uočiti da dobiveni rezultati nisu slučajno raspodijeljeni oko centralne linije - μ, već je evidentan trend sa segmentima postojanog rasta ili pada vrijednosti udjela ostatne vode (%) kod nizova konsekutivnih serija liofiliziranog cjepiva.

U svrhu jasnijeg razlučivanja prirodnih varijacija procesa proizvodnje cjepiva i standardne Karl-Fischer volumetrijske metode od varijacija, koje su posljedica sustavnih utjecaja na cjelokupni proces proizvodnje i analitičku metodu za određivanje udjela ostatne vode, provedena je analiza kumulativnih suma (CuSum) rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka serogrupa A i C, kako je opisano u poglavlju 2.4.1. Na temelju dobivenih vrijednosti (Tablica 3.) načinjena je CuSum kontrolna karta (Slika 14.), kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2. Cilj izrade CuSum kontrolne karte bio je identificirati statistički značajne male permanentne pomake u vrijednostima za udjel ostatne vode (%), koje nije moguće identificirati kod interpretacije Shewhart kontrolne karte (Slika 13.).

Tablica 3. CuSum analiza rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

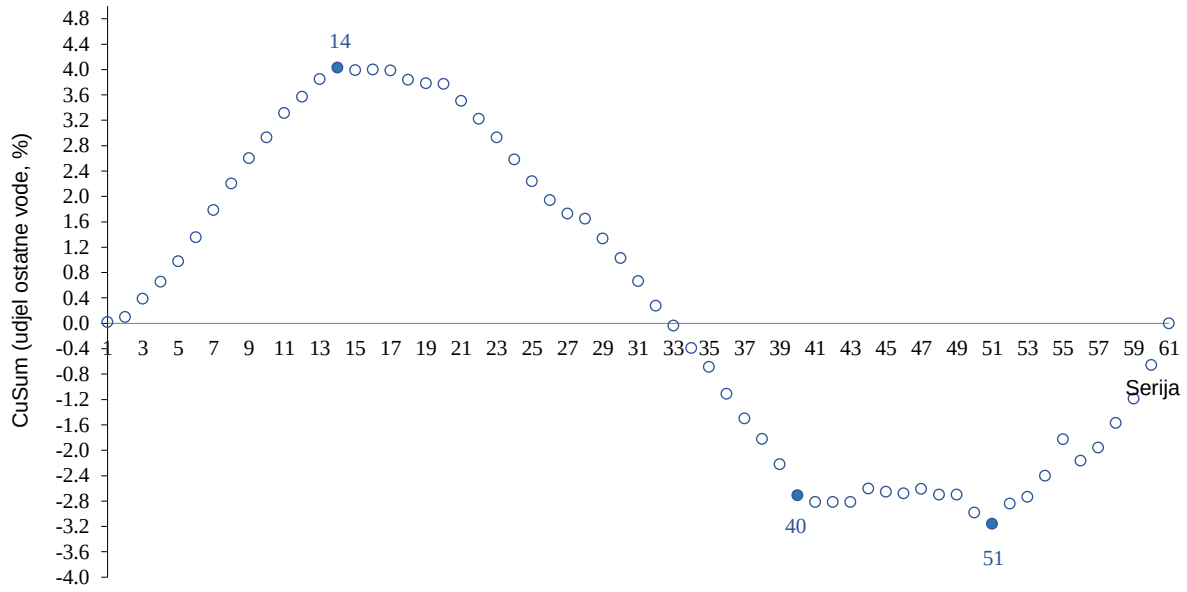
Serija	x_i	$x_i - \mu$	CuSum	$x_{i+1} - x_i$	$(x_{i+1} - x_i)^2$
1	1,83	0,019	0,019		
2	1,89	0,08	0,10	0,06	0,0036
3	2,10	0,29	0,39	0,21	0,0441
4	2,08	0,27	0,66	-0,02	0,0004
5	2,13	0,32	0,98	0,05	0,0025
6	2,19	0,38	1,36	0,06	0,0036
7	2,24	0,43	1,78	0,05	0,0025
8	2,23	0,42	2,20	-0,01	0,0001
9	2,21	0,40	2,60	-0,02	0,0004
10	2,14	0,33	2,93	-0,07	0,0049
11	2,19	0,38	3,31	0,05	0,0025
12	2,07	0,26	3,57	-0,12	0,0144
13	2,09	0,28	3,85	0,02	0,0004
14	1,99	0,18	4,03	-0,10	0,01
15	1,77	-0,04	3,99	-0,22	0,0484
16	1,82	0,01	4,00	0,05	0,0025
17	1,80	-0,01	3,99	-0,02	0,0004
18	1,66	-0,15	3,84	-0,14	0,0196
19	1,76	-0,05	3,78	0,10	0,01
20	1,80	-0,01	3,77	0,04	0,0016
21	1,54	-0,27	3,50	-0,26	0,0676
22	1,53	-0,28	3,22	-0,01	0,0001
23	1,52	-0,29	2,93	-0,01	0,0001
24	1,46	-0,35	2,58	-0,06	0,0036
25	1,47	-0,34	2,24	0,01	0,0001
26	1,51	-0,30	1,94	0,04	0,0016
27	1,60	-0,21	1,73	0,09	0,0081

Tablica 3. CuSum analiza rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom-nastavak.

Serija	x_i	$x_i - \mu$	CuSum	$x_{i+1} - x_i$	$(x_{i+1} - x_i)^2$
28	1,73	-0,08	1,65	0,13	0,0169
29	1,50	-0,31	1,34	-0,23	0,0529
30	1,50	-0,31	1,03	0,00	0
31	1,45	-0,36	0,66	-0,05	0,0025
32	1,42	-0,39	0,27	-0,03	0,0009
33	1,50	-0,31	-0,04	0,08	0,0064
34	1,46	-0,35	-0,39	-0,04	0,0016
35	1,51	-0,30	-0,69	0,05	0,0025
36	1,39	-0,42	-1,11	-0,12	0,0144
37	1,42	-0,39	-1,50	0,03	0,0009
38	1,49	-0,32	-1,82	0,07	0,0049
39	1,41	-0,40	-2,22	-0,08	0,0064
40	1,32	-0,49	-2,71	-0,09	0,0081
41	1,71	-0,10	-2,81	0,39	0,1521
42	1,81	0,00	-2,81	0,10	0,0100
43	1,81	0,00	-2,82	0,00	0,0000
44	2,02	0,21	-2,61	0,21	0,0441
45	1,76	-0,05	-2,66	-0,26	0,0676
46	1,79	-0,02	-2,68	0,03	0,0009
47	1,88	0,07	-2,61	0,09	0,0081
48	1,72	-0,09	-2,70	-0,16	0,0256
49	1,81	0,00	-2,70	0,09	0,0081
50	1,53	-0,28	-2,98	-0,28	0,0784
51	1,63	-0,18	-3,16	0,10	0,0100
52	2,13	0,32	-2,84	0,50	0,2500
53	1,92	0,11	-2,73	-0,21	0,0441
54	2,14	0,33	-2,40	0,22	0,0484
55	2,39	0,58	-1,83	0,25	0,0625

Tablica 3. CuSum analiza rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom-nastavak.

Serija	x_i	x_i - μ	CuSum	$x_{i+1} - x_i$	$(x_{i+1} - x_i)^2$
56	1,47	-0,34	-2,17	-0,92	0,8464
57	2,02	0,21	-1,96	0,55	0,3025
58	2,20	0,39	-1,57	0,18	0,0324
59	2,19	0,38	-1,19	-0,01	0,0001
60	2,34	0,53	-0,66	0,15	0,0225
61	2,47	0,66	0,00	0,13	0,0169
μ	1,82			s_L	0,141



Slika 14. CuSum analiza rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Tablica 3.).

Na slici 14 mogu se zamijetiti uzlazni i silazni trendovi udjela ostatne vode (%). Na temelju usporedbe vrijednosti omjera maksimalne vrijednosti CuSum ($CuSum_{max}$) i standardne devijacije (s_L) s pridruženim kritičnim vrijednostima za zadani raspon uz 95% pouzdanost

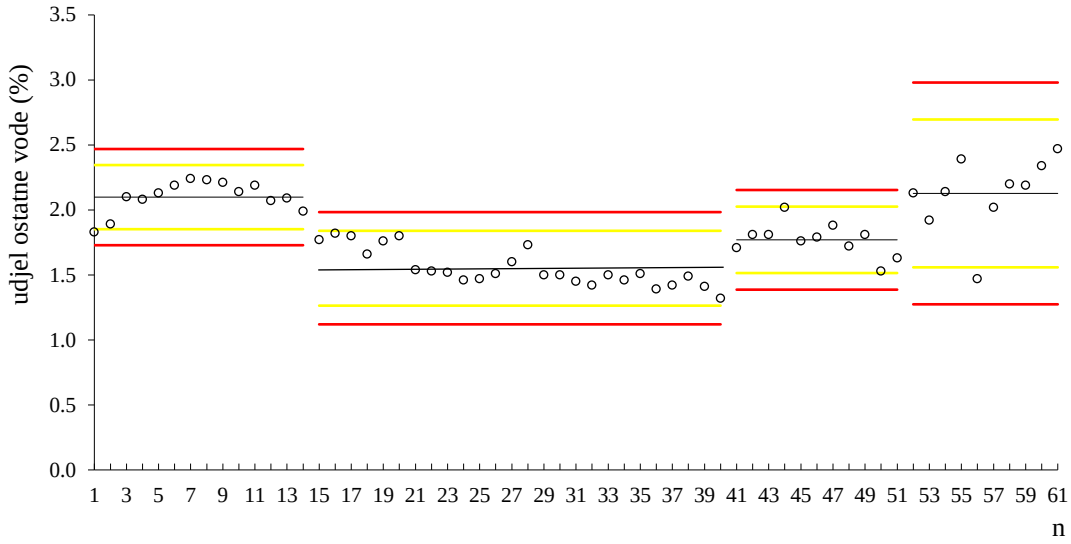
(Tablica P1 u Prilogu), utvrđene su tri statistički značajne promjene trenda i to kod serija liofiliziranog cjepiva označenih brojevima *m* = 14, 40 i 51.
Izračun za omjer ovih dviju vrijednosti ($CuSum_{max}$ i s_L; jednadžba 3.17, poglavlje 3.2.3.2) i pripadne kritične vrijednosti za statistički značajne promjene trenda (*n* = 14, 40 i 51), dane su u tablici 4.

Tablica 4. Usporedba omjera $CuSum_{max}$ i s_L s kritičnim vrijednostima (udjel ostatne vode, %)

n	Raspon	Kritična vrijednost (95%)	$\frac{\lvert CuSum_{max} \rvert}{s_L}$
14	61	9,6	28,6
40	47	8,4	27,6
51	21	5,6	11,3

Kako se može jasno vidjeti na slici 14, CuSum analiza rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) ukazuje na četiri statistički različita segmenta u ovom setu podataka: segment 1, koji odgovara rasponu liofiliziranih cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C označenih brojevima *m* = 1 - 14; segment 2, koji obuhvaća serije liofiliziranih cjepiva označene brojevima *m* = 15 - 40, segment 3, kojega čine serije liofiliziranih cjepiva označene brojevima *m* = 41 - 51; i segment 4, kojemu pripadaju serije označene brojevima *m* = 52 - 61.

U Manhattan kontrolnoj karti prikazan je svaki od četiri identificirana segmenta serija liofiliziranih cjepiva zasebno (Slika 15.), te je za svaki od navedenih segmenata izračunata i prikazana standardna devijacija i aritmetička sredina, a pridružene su im kontrolne granice i granice upozorenja (Slika 15.).



Slika 15. Manhattan kontrolna karta rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Aritmetička sredina rezultata (μ) označena je punom crnom linijom, kontrolne granice ($\mu \pm 3\sigma$) označene su punom crvenom linijom, granice upozorenja ($\mu \pm 2\sigma$) označene su punom žutom linijom.

Iz slike 15. je vidljivo da je u četvrtom segmentu (m = 52 - 61) standardna devijacija rezultata određivanja ostatne vode (%) znatno veća u odnosu u odnosu na segmente 1 - 3. Povećana standardna devijacija kao mjera varijacije u segmentu četiri moguća je posljedica analize pripadajućih serija liofiliziranih cjepiva (m = 52 - 61) standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom kroz dulji vremenski period nego je to slučaj kod prethodna tri segmenta. Segment 4 je obuhvatio analizu pripadajućih serija liofiliziranih cjepiva kroz približno devet mjeseci, dok preostala tri segmenta obuhvaćaju analizu pripadajućih serija liofiliziranih cjepiva kroz vremenski period od oko tri mjeseca.

Aritmetičke sredine rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u segmentima 1 i 4 su usporedive, dok su vrijednosti za aritmetičke sredine rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) za segmente 2 i 3 niže od vrijednosti u preostala dva segmenta. Vrijednosti iz segmenata 1, 2 i 3, odnose se na serije cjepiva koje su proizvedene i neposredno analizirane kroz vremenski period od oko tri mjeseca, i to segment 2 tijekom zimskog perioda, te segmenti 1, 3 tijekom ljetnih perioda.

Dakle, klimatski uvjeti tj. atmosferske prilike imaju značajan utjecaj na određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Volumetrijske metode po Karl-Fischeru provode se u uvjetima kontrolirane temperature (engl. *Controlled Room Temperature*, CRT) te je stoga isključen značajan utjecaj promjene temperature na rezultate određivanja udjela ostatne vode (%) u uzorcima u kontroliranim eksperimentalnim uvjetima.

Shodno tomu, istražen je utjecaj relativne vlažnosti zraka (φ, %) na rezultate određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C (m = 1 - 61). Pri provođenju titracija standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom paralelno se određivala relativna vlažnost zraka (φ, %) pomoću higrometra (poglavlje 3.2.1.1). Dobivene vrijednosti relativne vlažnosti zraka (φ, %) i CuSum analiza ovih vrijednosti prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. CuSum analiza rezultata određivanja relativne vlažnosti zraka (φ, %)

Serija	x_i	$x_i - \mu$	CuSum	$x_{i+1} - x_i$	$(x_{i+1} - x_i)^2$
1	43,6	8,7	8,7		
2	43,1	8,2	16,9	-0,5	0,25
3	43,2	8,3	25,2	0,1	0,01
4	56,8	21,9	47,1	13,6	184,96
5	51,6	16,7	63,7	-5,2	27,04
6	51,6	16,7	80,4	0,0	0,00
7	51,6	16,7	97,1	0,0	0,00
8	53,1	18,2	115,3	1,5	2,25
9	53,1	18,2	133,5	0,0	0,00
10	52,3	17,4	150,9	-0,8	0,64
11	49,9	15,0	165,9	-2,4	5,76
12	46,4	11,5	177,3	-3,5	12,25
13	49,3	14,4	191,7	2,9	8,41
14	49,3	14,4	206,1	0,0	0,00
15	34,5	-0,4	205,7	-14,8	219,04
16	34,5	-0,4	205,3	0,0	0,00

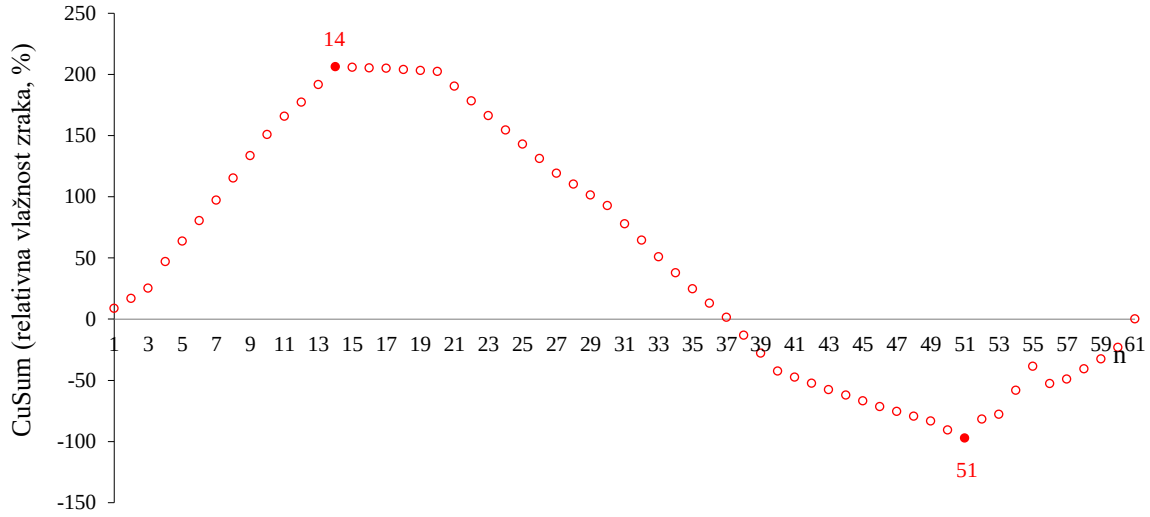
Tablica 5. CuSum analiza rezultata određivanja relativne vlažnosti zraka (φ, %) - nastavak.

Serija	x_i	$x_i - \mu$	CuSum	$x_{i+1} - x_i$	$(x_{i+1} - x_i)^2$
17	34,5	-0,4	204,9	0,0	0,00
18	34,1	-0,8	204,1	-0,4	0,16
19	34,1	-0,8	203,3	0,0	0,00
20	34,1	-0,8	202,4	0,0	0,00
21	22,8	-12,1	190,3	-11,3	127,69
22	22,8	-12,1	178,2	0,0	0,00
23	23,1	-11,8	166,4	0,3	0,09
24	23,1	-11,8	154,6	0,0	0,00
25	23,2	-11,7	142,9	0,1	0,01
26	23,2	-11,7	131,2	0,0	0,00
27	23	-11,9	119,3	-0,2	0,04
28	26	-8,9	110,3	3,0	9,00
29	26	-8,9	101,4	0,0	0,00
30	26,2	-8,7	92,7	0,2	0,04
31	20,1	-14,8	77,9	-6,1	37,21
32	21,4	-13,5	64,4	1,3	1,69
33	21,5	-13,4	51,0	0,1	0,01
34	21,8	-13,1	37,9	0,3	0,09
35	21,8	-13,1	24,7	0,0	0,00
36	23,2	-11,7	13,0	1,4	1,96
37	23,2	-11,7	1,3	0,0	0,00
38	20,3	-14,6	-13,3	-2,9	8,41
39	20,3	-14,6	-27,9	0,0	0,00
40	20,3	-14,6	-42,5	0,0	0,00
41	30	-4,9	-47,4	9,7	94,09
42	29,8	-5,1	-52,6	-0,2	0,04
43	29,8	-5,1	-57,7	0,0	0,00
44	30,3	-4,6	-62,3	0,5	0,25
45	30,3	-4,6	-66,9	0,0	0,00
46	30,3	-4,6	-71,5	0,0	0,00

Tablica 5. CuSum analiza rezultata određivanja relativne vlažnosti zraka (%) - nastavak.

Serija	x_i	$x_i - \mu$	CuSum	$x_{i+1} - x_i$	$(x_{i+1} - x_i)^2$
47	31	-3,9	-75,4	0,7	0,49
48	31	-3,9	-79,3	0,0	0,00
49	31	-3,9	-83,2	0,0	0,00
50	27,6	-7,3	-90,6	-3,4	11,56
51	28,1	-6,8	-97,4	0,5	0,25
52	50,5	15,6	-81,8	22,4	501,76
53	38,9	4,0	-77,8	-11,6	134,56
54	54,5	19,6	-58,2	15,6	243,36
55	54,5	19,6	-38,6	0,0	0,00
56	20,9	-14,0	-52,6	-33,6	1128,96
57	38,6	3,7	-49,0	17,7	313,29
58	43,1	8,2	-40,8	4,5	20,25
59	43,1	8,2	-32,6	0,0	0,00
60	44,4	9,5	-23,1	1,3	1,69
61	58	23,1	0,0	13,6	184,96
$\boldsymbol{\mu}$	34,9			$\boldsymbol{s_L}$	5,23

Na temelju CuSum analize za vrijednosti relativnih vlažnosti zraka (φ, %) (Tablica 5.) načinjena je CuSum kontrolna karta (Slika 16.), kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2.



Slika 16. CuSum analiza rezultata određivanja relativne vlažnosti zraka (φ, %), (Tablica 5.).

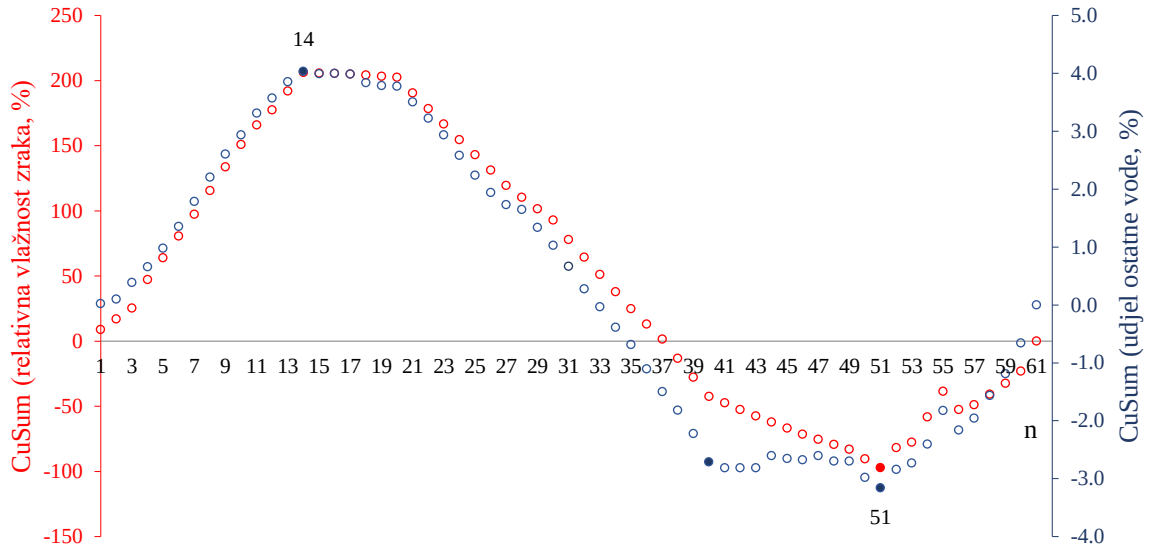
Iz grafičkog prikaza (Slika 16.) kumulativnih suma sukcesivnih razlika određenih vrijednosti relativne vlažnosti zraka (φ, %) i aritmetičke sredine relativne vlažnosti zraka (φ, %) uočljivi su i mali permanentni pomaci. Usporedbom omjera maksimalne vrijednosti CuSum i standardne devijacije (s_L) s kritičnim vrijednostima uz 95% pouzdanost, statistički značajne promjene relativne vlažnosti (φ, %) utvrđene su kod dvije serije liofiliziranoga cjepiva (m = 14, 51).

Izračun za omjer ovih dviju vrijednosti ($CuSum_{max}$ i s_L; jednadžba 3.17, poglavlje 3.2.3.2) i pripadne kritične vrijednosti za statistički značajne promjene trenda (m = 14, 51), dane su u tablici 6.

Tablica 6. Usporedba omjera $CuSum_{max}$ i s_L s kritičnim vrijednostima (relativna vlažnost zraka, %)

n	Raspon	Kritična vrijednost (95%)	$\frac{\lvert CuSum_{max}\rvert}{s_L}$
14	61	9,6	28,6
51	47	8,4	11,3

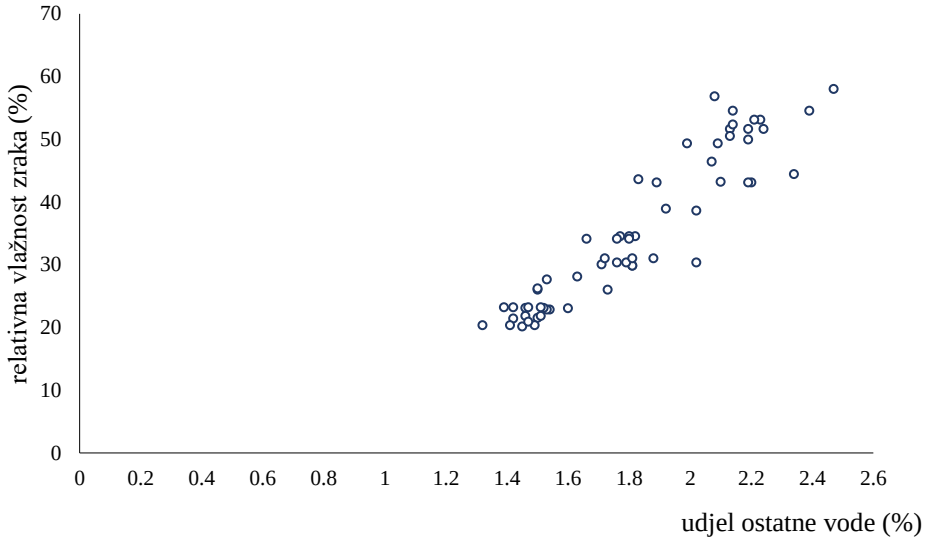
Dvije iste serije liofiliziranog cjepiva (m = 14 i 51) identificirane su kao statistički značajne i kod CuSum analize određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima (m = 14, 40 i 51). Zbog toga je načinjen usporedni prikaz CuSum analize rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u svim serijama liofiliziranoga cjepiva (m = 1 - 61) i pripadajućih vrijednosti za relativne vlažnost zraka (φ, %) (Slika 17.).



Slika 17. Usporedni prikaz CuSum analize rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) (označeno plavom bojom) u serijama liofiliziranoga cjepiva (m = 1 - 61) i pripadajućih vrijednosti relativne vlažnosti zraka (φ, %) (označeno crvenom bojom).

Na slici 17 je jasno uočljiva usporedivost uzlaznih i silaznih trendova dvaju niza podataka - vrijednosti kumulativnih suma sukcesivnih razlika analitičkih rezultata i pripadne aritmetičke sredine udjela ostatne vode (%) u serijama liofiliziranoga cjepiva (n = 1 - 61), te pripadajućih vrijednosti kumulativnih suma sukcesivnih razlika analitičkih rezultata i pripadne aritmetičke sredine relativne vlažnosti zraka (φ, %).

Kako bi se utvrdila korelacija između rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom i pripadajućih vrijednosti relativne vlažnosti zraka (φ, %), analizirana je korelacija ovih rezultata (Slika 18.).



Slika 18. Korelacija udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C i pripadajućih vrijednosti relativne vlažnosti zraka (φ, %).

Vrijednost koeficijenta korelacije (engl. *Pearson correlation coefficient*, R) od 0,93, ukazuje na visoku korelaciju između ovih dviju vrijednosti - udjela ostatne vode u liofiliziranom cjepivu (%) i relativne vlažnosti zraka (φ, %) (Slika 18.).

Vrijednost koeficijenta određivanja (engl. *coefficient of determination*, R^2) od 0,97 ukazuje na udio varijabilnosti koju jedna varijabla - udjel ostatne vode u liofiliziranom cjepivu (%), dijeli s drugom varijablom, relativnom vlažnosti zraka (φ, %).

Potvrđen je statistički značajan utjecaj relativne vlažnosti zraka (φ, %) na rezultate određivanja ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C standardnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Tijekom postupka priprave uzorka za titraciju (vidi poglavlje 3.2.1.1) zbog visoke higroskopnosti liofilizata, uzorak apsorbira vlagu iz zraka, što rezultira značajnom sustavnom pogreškom ove analitičke metode. Dodatno, vrlo mala masa liofilizata ($m \approx 96$ mg) i zahtjev za udjel ostatne vode vode ($\leq$ 3,0 %; prema Ph. Eur. 01/2019:0250), koji je ekvivalentan masi vode od $m \approx 2{,}90$ mg, zahtijevaju pripravu zbirnog uzorka (engl. *sample pooling*) iz većeg broja uzoraka liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka

serogrupa A i C za Karl-Fischer titraciju (poglavlje 3.2.1.1). Time se produljuje izlaganje higroskopnih uzoraka liofiliziranog cjepiva atmosferskim uvjetima u laboratoriju i dodatno povećava sustavna pogreška ove analitičke metode.

4.2. Razvoj i validacija referentne Karl-Fischer metode za određivanje ostatne vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C

Cilj istraživanja je bio razvoj nove referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka grupe A i C, kod koje relativna vlažnost zraka (φ, %) neće značajno utjecati na sustavnu pogrešku analitičke metode. Prema eksperimentalnom protokolu referentne metode, uzorak za volumetrijsku Karl-Fischer titraciju bio je alikvot otopine liofilizata cjepiva u predtitriranom Karl-Fischer otapalu za volumetrijsku titraciju (Slika 12., poglavlje 3.2.1.2). Time je izbjegnuto izlaganje liofiliziranog cjepiva zraku u laboratoriju te posljedično, apsorpcija vode u higroskopni uzorak.

U razvoju referentne Karl-Fischer volumetrijske metode, dodatni izazov predstavljala je mala masa uzorka liofilizata cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, koje je iznosila $m \approx 96$ mg, te pripadna mala masa ostatne vode za koju je prema povijesnim podacima očekivani raspon iznosio od 0,9 mg do 2,9 mg. Osim toga, u skladu s volumenom predtitriranog Karl-Fischer otapala (f_3), koje se injektira u bočice liofilizata cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (V = 1,2 – 3,0 ml), te volumenom alikvota otopine liofilizata cjepiva u ovome otapalu (V = 1,0 – 2,5 ml), koji predstavlja uzorak priređen za volumetrijsku titraciju, raspon analitičke metode pripada izuzetno zahtjevnom području Karl-Fischer volumetrijskih titracija s koncentracijom vode manjom od 1000 ppm, te minimalnim utroščima titranta blizu granice kvantifikacije (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ). Shodno tome, tijekom titracije priređene slijepe probe (poglavlje 3.2.1.2) nije određena vrijednost slijepe probe (engl. *blank*) za titraciju, jer je navedena vrijednost bila ispod granice detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD), odnosno ispod minimalnog utroška Karl-Fischer titranta.

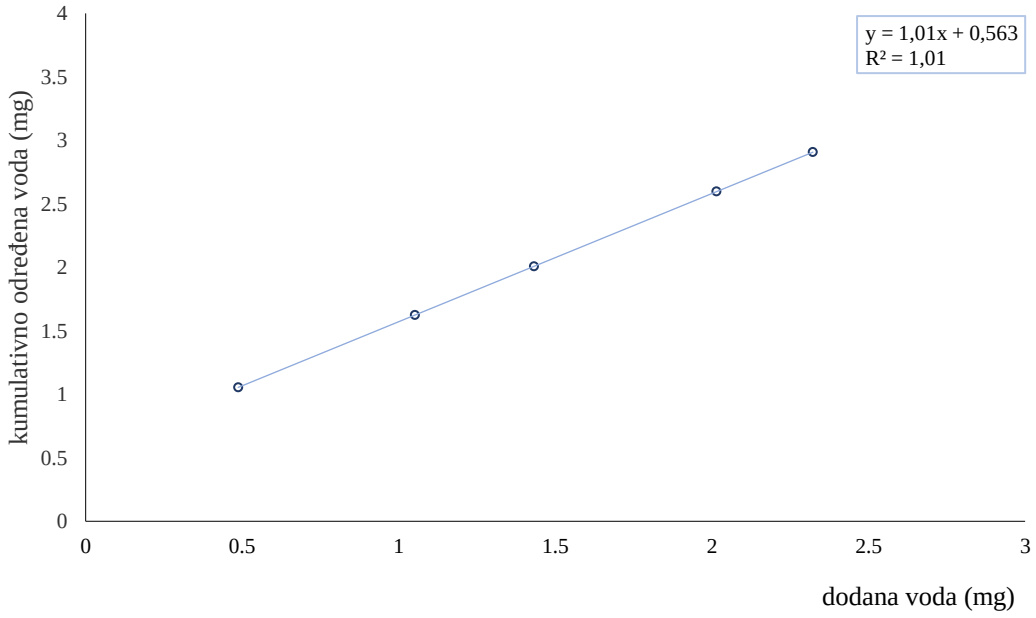
U fazi razvoja referentne Karl-Fischer volumetrijske metode provedeno je i ispitivanje topljivosti liofilizata cjepiva u malim volumenima dodanog predtitriranog Karl-Fischer otapala za volumetrijsku titraciju, te je za očekivani raspon volumena ovog otapala (f_3) (V = 1,0 – 3,0 ml) potvrđena dobra topljivost liofilizata.

Proveden je test sukladnosti (poglavlje 4.2.1) te su u procesu validacije referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C procijenjeni validacijski parametri: odstupanje od prave vrijednosti (poglavlje 4.2.2), preciznost (poglavlje 4.2.3) kao i linearnost ove semi-mikro analitičke metode (poglavlje 4.2.4).

4.2.1. Test sukladnosti

Proveden je test sukladnosti za referentnu Karl-Fischer volumetrijsku metodu za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C. U ovom testu korišteni su podaci dobiveni volumetrijskom titracijom uzorka jedne serije (m = 60) liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, te niza od pet različitih volumena standarda s 1% vode. Ovaj postupak je detaljno opisan u poglavlju 3.2.1.2.1.

Provedena je linearna regresija mase kumulativno određene vode (mg) prema masi dodane vode (mg) u otopini titriranog uzorka cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, m = 60 (Slika 19.).



Slika 19. Test sukladnosti – linearna regresija kumulativno određene vode (mg) i dodane vode (mg) u seriji (n = 60) cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C.

Iz linearne regresije dobiveni su nagib pravca (b = 1,009), odsječak na osi ordinate (a = 0,563 mg) i odsječak na osi apscise odnosno sjecište ekstrapoliranog pravca s osi apscise (d = 0,558 mg). Nagib regresijskog pravca (b = 1,009) unutar je zadanih granica prihvatljivosti, koje su definirane dozvoljenim odstupanjima od ± 2,5 % (b = 0,975 - 1,025). Odvage (mg) za svaki dodani volumen standarda s 1% vode, vrijednosti mase vode (mg) za standard 1% vode određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom, te pripadna iskorištenja, prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Test sukladnosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode

$m_{standarda\ vode}$ (mg)	m_{H2O} (mg)	Iskorištenje (%)
48,84	0,49	1,008
56,59	0,57	1,010
38,21	0,38	1,006
58,46	0,59	1,012
30,84	0,31	1,006

Izračunate su greške e_1 i e_2, prema jednadžbama 3. 4. i 3. 5. iz poglavlja 3.2.1.2.1. Ovdje je a = 0,563 mg, d = 0,558 mg, kako je prije procijenjeno iz regresijskog pravca (Slika 19.), a M = 0,563 mg, masa vode u uzorku cjepiva (mg) iz serije m = 60 određena referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

$$e_1 = 100 \times \frac{0{,}563 - 0{,}563}{0{,}563} = 0\ \%$$

$$e_2 = 100 \times \frac{0{,}558 - 0{,}563}{0{,}563} = 1{,}0\ \%$$

Izračunate vrijednosti grešaka e_1 i e_2, iznose redom 0 % i 1,0 %, te su unutar zadanog kriterija prihvatljivosti, ne više od ± 2,5 %.

Izračunato je srednje iskorištenje iz omjera aritmetičke sredine titrimetrijskog određivanja udjela vode ($\bar{x}$) i deklarirane vrijednosti za udjel vode u standardu s 1 % vode (0,997 ± 0,010 %), prema jednadžbi 3.18.

$$Iskorištenje(\%) = 100 \times \frac{1{,}008}{0{,}997} = 101{,}1\%$$

Izračunata vrijednost srednjeg iskorištenja od 101,1 % udovoljava kriteriju prihvatljivosti ne manje od 97,5 % i ne više od 102,5 % (EDQM, 2015).

Izračunate vrijednosti za greške e_1 i e_2, srednje iskorištenje kao i nagib regresijskog pravca (b) potvrđuju sukladnost referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C.
Ovdje valja posebno istaknuti da je test sukladnosti definiran za uzorke koji sadrže od 2,5 mg do 25 mg vode.

4.2.2. Odstupanje od prave vrijednosti

Odstupanje od prave vrijednosti(engl. *trueness*) kod referentne Karl-Fischer volumetrijske metode procijenjeno je je na temelju podataka dobivenih volumetrijskom titracijom referentnog materijala - standarda s 1 % vode (0,997 ± 0,010 %), sljedivog do standardnog referentnog materijala SRM 2890 NIST, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.2. Određivanje udjela vode (%) ponovljeno je na šest alikvota standarda s 1 % vode od strane dvaju analitičara i uz ponavljanje kroz četiri dana. Na ovaj način provedeno je ukupno 24 određivanja udjela vode (%). Rezultati određivanja udjela vode prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Rezultati određivanja udjela vode (%) u standardu s 1 % vode, referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

$m_{standarda\ vode}$ (mg)	m_{H2O} (mg)	φ_{H2O} (%)
50,37	0,49	0,973
77,72	0,78	0,997
93,92	0,94	1,003
123,93	1,27	1,022
149,02	1,51	1,010
64,82	0,66	1,021
14,56	0,15	1,030
44,05	0,44	1,008
49,24	0,50	1,009
12,89	0,13	0,970
54,25	0,56	1,036
76,87	0,79	1,026
38,20	0,38	0,984
21,10	0,21	0,997
58,19	0,59	1,007
39,14	0,40	1,019
73,50	0,73	0,986
16,68	0,17	1,007
165,90	1,66	1,002
131,78	1,31	0,997
72,57	0,74	1,021
121,51	1,23	1,016
68,94	0,68	0,981
79,69	0,80	1,004

Deskriptivna statistika ovih rezultata prikazana je u tablici 9. (poglavlje 3.2.3.1).

Tablica 9. Deskriptivna statistika rezultata određivanja udjela vode (%) u u standardu s 1 % vode (0,997 ± 0,010 %) referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom.

Statistički parametar	Vrijednost
Aritmetička sredina	1,005
Standardna greška	0,004
Medijan	1,008
Mod	/
Standardna devijacija (%)	0,018
Varijanca	0,0003
Kurtosis	-0,3
Skewnes	-0,4
Raspon	0,066
Minimum	0,970
Maksimum	1,036
Broj uzoraka	24
Koeficijent varijacije (CV)	1,7
Interval pouzdanosti (95,0 %)	(0,998, 1,012)

Usporedba aritmetičke sredine i medijana te vrijednosti *Kurtosis* (mjere spljoštenosti), *Skewness* faktora (mjere asimetrije podataka), upućuju na normalnu razdiobu podataka.

Izračunato je srednje iskorištenje i relativno odstupanje udjela vode (%) od prave vrijednosti udjela vode u standardu s 1% vode kako je pokazano jednadžbama 3.18 i 3.19 (poglavlje 3.2.3.3). Relativno odstupanje izračunato je iz razlike aritmetičke sredine rezultata za udjel vode ($\bar{x}$) i deklarirane vrijednosti za udjel vode u standardu s 1 % vode (0,997 ± 0,010 %).

$$Iskorištenje(\%) = 100 \times \frac{1{,}005}{0{,}997} = 100{,}8\ \%$$

$$Relativno\ odstupanje = 100 \times \frac{1{,}005 - 0{,}997}{0{,}997} = 0{,}8\ \%$$

Relativno odstupanje udjela vode (%) u standardu od njegove prave vrijednosti iznosi 0,8 %, što je u skladu s zahtjevom, da relativno odstupanje od prave vrijednosti nije više od 2,5 % (Ermer i Miller, 2005).

4.2.3. Preciznost

Pri procjeni preciznosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode korišteni su rezultati određivanja udjela vode (%) u standardu s 1% vode (0,997 ± 0,010 %), prikazani u tablici 8. Procjena preciznosti referentne metode temelji se na jednosmjernoj analizi varijance te su njome su obuhvaćene različite razine preciznosti, ponovljivost i intermedijarna preciznost (poglavlje 3.2.1.3). Jednosmjerna analiza varijance rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u serijama liofiliziranog cjepiva *m* = 59, 60 i 61 ovom referentnom metodom omogućila je i procjenu varijabilnosti udjela ostatne vode između različitih serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C.

4.2.3.1. Preciznost - standard s 1 % vode

Prethodno je deskriptivnom statistikom potvrđena normalna razdioba rezultata određivanja udjela vode (%) u standardu s 1 % vode (0,997 ± 0,010 %) (Tablica 7.), čime je omogućeno korištenje parametrijske statistike.

Rezultati prikazani u tablici 7. su obrađeni statističkom metodom jednosmjerne analize varijance (ANOVA), (poglavlje 3.2.3.4). Na opisani način su procijenjeni ponovljivost i intermedijarna preciznost, a dobiveni rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. jednosmjerna ANOVA, procjena ponovljivosti i intermedijarne preciznosti referentne Karl-Fisher volumetrijske metode iz rezultata određivanja udjela vode u standardu s 1 % vode (0,997 ± 0,010 %).

Grupe (dani testa)	Broj određivanja	Suma	Aritmetička sredina	Varijanca
1	6	6,026	1,004	0,0003
2	6	6,004	1,001	0,0002
3	6	6,021	1,003	0,0002
4	6	6,080	1,013	0,0006

ANOVA

Izvor varijacije	SS	df	MS	F	*p*-vrijednost	F_{krit}
Između grupa	0,0005	3	0,0002	0,546	0,66	3,098
Unutar grupa	0,0065	20	0,0003			
Ukupno	0,0070	23				

s_r^2 (MS_{within})	s_g^2 ($MS_{between}$-MS_{within}/n_j)	s_R^2 ($\approx s_r^2$, $s_g^2 < 0$)	$\bar{\bar{x}}$
0,00030	-0,00002	0,00030	1,0061

Ponovljivost je izračunata iz jednadžbe 3.25 (poglavlje 3.2.3.4) i iznosila je ($s_r/\bar{\bar{x}}$) = 1,8 %. Intermedijarna preciznost je izračunata prema jednadžbi 3.26 (poglavlje 3.2.3.4) i iznosila je ($s_R/\bar{\bar{x}}$) = 1,8 %.

Relativna standardna devijacija za ponovljivost ove analitičke metode procijenjena titracijom referentnog standarda s 1% vode (0,997 ± 0,010 %), u skladu je sa zadanim kriterijem prihvatljivosti za preciznost u radnom području metode blizu granice kvantifikacije RSD ≤ 10% (Ermer i Miller, 2005). Relativna standardna devijacija za ponovljivost jednaka je relativnoj standardnoj devijaciji za intermedijarnu preciznost i obje iznose 1,8 %. Obzirom da oba nivoa preciznosti imaju istu procjenu RSD, nije uočena dodatna varijabilnost kao posljedica različitih dana testiranja i različitih analitičara. Različiti dani testiranja kao faktor intermedijarne preciznosti uključuju izvore varijabilnosti: određivanje koncentracije Karl-Fischer titranta, različite atmosferske uvjete u laboratoriju i dr.

Procijenjena preciznost, u skladu je s inicijalnim procjenama očekivane preciznosti, tj. vrijednostima Horowitz funkcije, koja u obzir uzima zavisnost kriterija prihvatljivosti za preciznost o koncentraciji analita (Taverniers i sur., 2004). Horowitz vrijednosti u inicijalnoj procjeni preciznosti se ne odnose na radno području metode pri granici kvantifikacije gdje se očekuju više vrijednosti RSD. Usprkos tome, dobiveni rezultati RSD = 1,8 %, u skladu su s Horowitz vrijednosti koja za razinu analita od 1 % predviđa optimalne izvedbene karakteristike metode za RSD ≤ 4%.

Vrijednost p >0,05 ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika između grupa koje predstavljaju različite dane testa.

4.2.3.2. Preciznost – liofilizirano cjepivo protiv meningokoka serogrupa A i C

Određivanje udjela ostatne vode (%) u tri konsekutivne serije cjepiva protiv menigokoka serogrupa A i C (m = 59, 60 i 61) referentnom metodom je provedeno na šest uzoraka kroz četiri različita dana (Tablica 11.).

Tablica 11. Rezultati određivanja udjela ostatne vode (%) u tri konsekutivne serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C (m = 59, 60 i 61)

	Serija 59	Serija 60	Serija 61
Dan	udjel ostatne vode (%)	udjel ostatne vode (%)	udjel ostatne vode (%)
1.	0,62	0,61	0,54
	0,62	0,60	0,61
	0,57	0,61	0,50
	0,57	0,61	0,54
	0,61	0,71	0,61
	0,61	0,69	0,50

Tablica 11. Rezultati određivanja udjela ostatne vode (%) u tri konsekutivne serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C (*m* = 59, 60 i 61) – nastavak.

Dan	Serija 59 udjel ostatne vode (%)	Serija 60 udjel ostatne vode (%)	Serija 61 udjel ostatne vode (%)
2.	0,62	0,57	0,53
	0,55	0,59	0,56
	0,51	0,52	0,59
	0,59	0,54	0,62
	0,6	0,62	0,54
	0,62	0,63	0,57
3.	0,59	0,51	0,61
	0,56	0,57	0,52
	0,51	0,54	0,54
	0,58	0,53	0,56
	0,61	0,54	0,52
	0,64	0,61	0,58
4.	0,63	0,70	0,66
	0,67	0,64	0,60
	0,66	0,62	0,58
	0,67	0,64	0,66
	0,58	0,59	0,64
	0,64	0,60	0,61

Deskriptivna statistika rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u serijama liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom (*m* = 59, 60, 61), prikazana je u tablici 12. (poglavlje 3.2.3.1).

Tablica 12. Deskriptivna statistika rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C (*m* = 59, 60, 61) referentnom Karl-Fischer metodom

Statistički parametar	Serija 59	Serija 60	Serija 61
Aritmetička sredina	0,601	0,599	0,575
Standardna greška	0,009	0,011	0,010
Medijan	0,610	0,605	0,574
Mod	0,620	0,610	0,54
Standardna devijacija	0,042	0,054	0,048
Varijanca	0,0018	0,0030	0,0023
Kurtosis	0,15	-0,19	-0,8
Skewnes	-0,5	0,3	0,2
Raspon	0,161	0,2	0,164
Minimum	0,510	0,51	0,5
Maksimum	0,671	0,71	0,664
Broj	24	24	24
Interval pouzdanosti (95,0 %)	(0,583, 0,619)	(0,576, 0,622)	(0,555, 0,595)

Usporedba aritmetičke vrijednosti, moda i medijana te vrijednosti *Kurtosis* (mjere spljoštenosti) *Skewness* faktora (mjere asimetrije podataka), upućuju na normalnu razdiobu podataka, čime je omogućena primjena parametrijske statistike.

Sukladno tome, ovi su rezultati obrađeni statističkom metodom jednosmjernom analize varijance (ANOVA) (poglavlje 3.2.3.4) i to kako bi se odredile: ponovljivost i intermedijarna preciznost (Tablice 13 – 15.). Kriteriji prihvatljivosti za ponovljivost i intermedijarnu preciznost definirani su uzimajući u obzir radno područje analitičke metode blizu granice kvantifikacije (Ermer i Miller, 2005).

Tablica 13. Jednosmjerna ANOVA, procjena ponovljivosti i intermedijarne preciznosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode iz rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u seriji liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C *m* = 59

Grupe (dani testa)	*Broj*	*Suma*	*Aritmetička sredina*	*Varijanca*
1	6	3,6	0,6	0,0006
2	6	3,49	0,582	0,0019
3	6	3,49	0,582	0,0020
4	6	3,84	0,640	0,0011

ANOVA

Izvor varijacije	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-vrijednost*	F_{krit}
Između grupa	0,0137	3	0,0046	3,3203	0,04	3,10
Unutar grupa	0,0276	20	0,0014			
Ukupno	0,0413	23				

s_r^2 (MS_{within})	s_g^2 ($MS_{between}$-MS_{within}/n_j)	s_R^2 ($\approx s_r^2$, $s_g^2 < 0$)	$\bar{\bar{x}}$
0,00138	0,00053	0,00191	0,601

Ponovljivost ($s_r/\bar{\bar{x}}$) = 6,2 %

Intermedijarna preciznost ($s_R/\bar{\bar{x}}$) = 7,3 %

Tablica 14. Jednosmjerna ANOVA, procjena ponovljivosti i intermedijarne preciznosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode iz rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u seriji liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C *m* = 60

Grupe (dani testa)	*Broj*	*Suma*	*Aritmetička sredina*	*Varijanca*
1	6	3,83	0,638	0,0023
2	6	3,47	0,578	0,0019
3	6	3,3	0,55	0,0012
4	6	3,786	0,631	0,0017

Tablica 14. Jednosmjerna ANOVA, procjena ponovljivosti i intermedijarne preciznosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode iz rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u seriji liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C *m* = 60 - nastavak.

ANOVA

Izvor varijacije	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-vrijednost*	F_{krit}
Između grupa	0,0324	3	0,0108	6,050	0,004193	3,098
Unutar grupa	0,0357	20	0,0018			
Ukupno	0,0681	23				

s_r^2 (MS_{within})	s_g^2 ($MS_{between}$-MS_{within}/n_j)	s_R^2 ($\approx s_r^2$, $s_g^2 < 0$)	$\bar{\bar{x}}$
0,00178	0,00150	0,00329	0,59941

Ponovljivost ($s_r/\bar{\bar{x}}$) = 7,0 %

Intermedijarna preciznost ($s_R/\bar{\bar{x}}$) = 9,6 %

Tablica 15. Jednosmjerna ANOVA, procjena ponovljivosti i intermedijarne preciznosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode iz rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u seriji liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C *m* = 61.

Grupe (dani testa)	*Broj*	*Suma*	*Aritmetička sredina*	*Varijanca*
1	6	3,3	0,55	0,0025
2	6	3,41	0,568	0,0011
3	6	3,33	0,555	0,00127
4	6	3,76	0,627	0,00122

ANOVA

Izvor varijacije	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-vrijednost*	F_{krit}
Između grupa	0,0226	3	0,0075	4,968	0,00975	3,098
Unutar grupa	0,0303	20	0,0015			
Ukupno	0,0529	23				

Tablica 15. Jednosmjerna ANOVA, procjena ponovljivosti i intermedijarne preciznosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode iz rezultata određivanja udjela ostatne vode (%) u seriji liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C *m* = 61 - nastavak.

s_r^2 (MS_{within})	s_g^2 ($MS_{between}$-MS_{within}/n_j)	s_R^2 ($\approx s_r^2$, $s_g^2 < 0$)	$\bar{\bar{x}}$
0,00152	0,001003	0,00252	0,575

Ponovljivost ($s_r/\bar{\bar{x}}$) = 6,8 %

Intermedijarna preciznost ($s_R/\bar{\bar{x}}$) = 8,7 %

Procijenjena ponovljivost za tri različite serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C je usporediva i kreće se u rasponu 6,2 - 7,0 %, što je niže od zadanog kriterija prihvatljivosti od 10,0 % (Ermer i Miller, 2005). Procijenjene ponovljivosti za tri serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka grupe A i C, više su u odnosu na ponovljivost utvrđenu za standard vode, koja je izražena kao RSD = 1,8 %, jer ove procijenjene ponovljivosti uključuju i varijabilnost udjela ostatne vode između uzoraka iste serije cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C.

Intermedijarna preciznost, koja uključuje rezultate dobivene kroz različite dane kroz koje je analiza provedena i dva različita analitičara, kreće se u rasponu 7,3 - 9,6 % za tri serije cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, što je u skladu sa zadanim kriterijem prihvatljivosti od 15,0 % (Ermer i Miller, 2005). Omjeri relativnih standardnih devijacija za intermedijarnu preciznost i ponovljivost koji određuju faktor između dvaju nivoa preciznosti, te omogućuje predikciju dugoročne varijabilnosti (engl. *long-term variability*) analitičke metode iz ponovljivosti, iznose za validacijske serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (*m* = 59, 60, 61) redom 1,2, 1,4, i 1,3. Ovi su omjeri unutar raspona definiranog gornjom granicom raspodjele (90 %) koja za liofilizate iznosi 2 (Ermer i Miller, 2005).

Intervali pouzdanosti (95 %) za serije *m* = 59, 60 i 61 (Tablica 12.), iznose redom (0,583; 0,619), (0,576; 0,622) i (0,555;0,595) te su međusobno usporedivi.

Nadalje, statističkom metodom jednosmjerne analize varijance ANOVA (Tablica 16.) procijenjena je varijabilnost udjela ostatne vode (%) između triju serija cjepiva (*m* = 59, 60, 61), koje su korištene za utvrđivanje preciznosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode, (Tablica 11.). Nadalje, iz ovih podataka utvrđeno je postoji li statistički značajna razlika između ove tri serije cjepiva obzirom na udjel ostatne vode (%).

Tablica 16. Jednosmjerna ANOVA, procjena varijabilnosti udjela vode (%) između triju serija cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C (*m* = 59, 60, 61)

Grupe (serije)	*Broj*	*Suma*	*Aritmetička sredina*	*Varijanca*
59	24	14,42	0,601	0,0018
60	24	14,39	0,599	0,003
61	24	13,80	0,575	0,0023

ANOVA

Izvor varijacije	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*p-vrijednost*	F_{krit}
Između grupa	0,01009	2	0,0050	2,146	0,124	3,13
Unutar grupa	0,1623	69	0,0024			
Ukupno	0,1724	71				

s_r^2 (MS_{within})	s_g^2 ($MS_{between}$-MS_{within}/n_j)	s_R^2 ($\approx s_r^2$, $s_g^2 < 0$)	$\bar{\bar{x}}$
0,00235	0,000112	0,002464	0,592

($s_r/\bar{\bar{x}}$) = 8,2 %

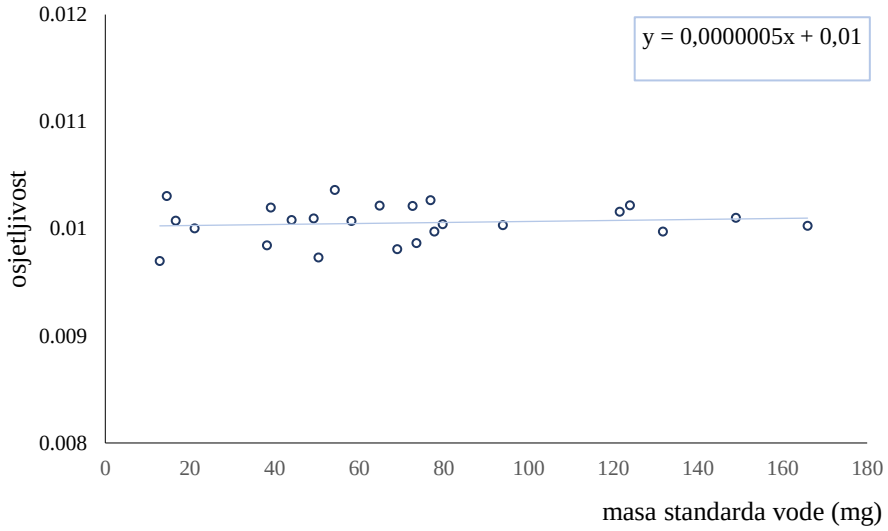
Varijabilnost serija ($s_R/\bar{\bar{x}}$) = 8,4 %

Varijabilnost unutar grupe tj. jedne serije cjepiva od 8,2 % usporediva je s varijabilnosti između različitih serija cjepiva koja iznosi 8,4 %. U skladu s tim varijabilnost između serija pridonosi približno s 4 % ukupnoj varijabilnosti između uzorka cjepiva protiv meningokoka grupe A i C. Vrijednost $p > 0,05$ ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika u udjelu ostatne vode (%) između triju serija cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (*m* = 59, 60, 61).

4.2.4. Linearnost

U svrhu verifikacije linearnosti u zadanom rasponu referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C, obrađeni su rezultati određivanja udjela vode (%) u standardu s 1 % vode (Tablica 8.). Raspon linearne kalibracije postavljen je tako da centralna vrijednost udjela vode (%) na osi apscise približno odgovara očekivanom udjelu ostatne vode (%) u proizvedenim serijama liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C. Nadalje, mase standarda s 1 % vode približno su jednoliko raspoređene unutar raspona, kako bi se izbjeglo da točke većeg utjecaja izazovu efekt (engl. *high leverage*) koji može utjecati na nagib i odsječak standardnog pravca (Slika 21.).

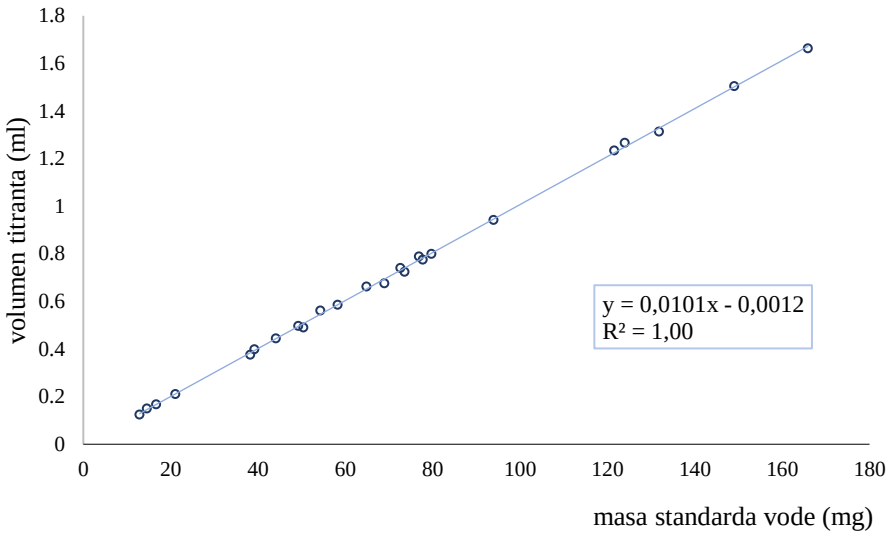
Eventualna odstupanja od linearnosti procijenjena su iz grafičkog prikaza osjetljivosti (engl. *sensitivity, response factor)* koja odgovara omjeru volumena titranta i pripadne mase standarda vode, prema masi standarda s 1 % vode, (Slika 20.).



Slika 20. Grafički prikaz osjetljivosti za verifikaciju linearnosti referentne Karl-Fischer volumetrijske metode

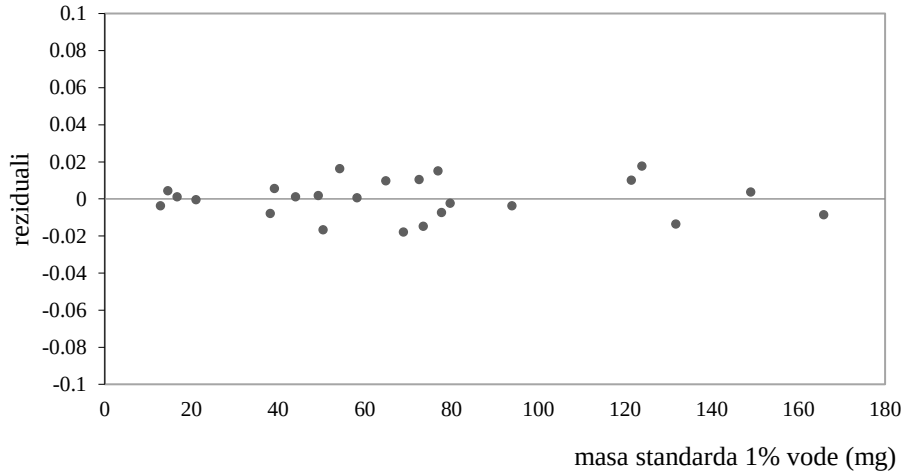
Grafički prikaz osjetljivosti potvrđuje linearnost u zadanom rasponu metode, uz odsječak na osi ordinata koji je približno jednak nuli (0,01) i približno konstantnu osjetljivost u cijelom rasponu. Pri tome su vrijednosti osjetljivosti slučajno raspršene bez izraženog obrasca. Rasipanje osjetljivosti pri niskim koncentracijama očekivano je više i uz konstantnu varijabilnost.

Provedena je linearna regresija metodom najmanjih kvadrata prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.5 (Slika 21.).



Slika 21. Linearna regresija

Nakon linearne regresije (Slika 21.) grafički su prikazani reziduali (Slika 22.) i određeni su regresijski koeficijenti (Tablica 17.).



Slika 22. Reziduali

Grafički prikaz reziduala (engl. *residual plot*) ukazuje na slučajnu raspodjelu reziduala oko vrijednosti nula, i u ovoj strukturi koju čine raspršeni reziduali nema pokazatelja heteroskedastičnosti niti nelinearnog trenda (Slika 22.).

Nakon verifikacije linearnosti analitičke metode, analizirani su i numerički parametri linearne regresije (Slika 21.), koeficijent određivanja (R^2), odsječak na osi ordinate i nagib pravca (Tablica 17.).

Tablica 17. Regresijski koeficijenti

	Koeficijent	Standardna greška	*t* Stat	*p*-vrijednost	Donja granica intervala pouzdanosti 95 %	Gornja granica intervala pouzdanosti 95 %
Odsječak	-0,0012	0,0042	-0,291	0,774	-0,01	0,0075
Nagib	0,0101	0,0001	195,4	3	0,0100	0,0102

Interval pouzdanosti (95 %) za odsječak obuhvaća vrijednost nula (-0,01, 0,01) i iz vrijednosti $p > 0,05$ slijedi da odsječak na osi ordinate nije statistički značajno različit od nule. Sukladno navedenom, može se zaključiti da nema statistički značajne konstantne sustavne pogreške analitičke metode.

Analizom validacijskih parametara potvrđena je prikladnost referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C analitičke metode za kontrolu kvalitete gotovog proizvoda. Nadalje, ostvaren je i preduvjet za razvoj novih NIR kalibracijskih modela, temeljem referentnih vrijednosti udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima bez značajne sustavne pogreške.

4.3. Razvoj i validacija kvantitativne NIR metode za određivanje udjela ostatne vode u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C

4.3.1. Razvoj i optimizacija NIR kalibracijskog modela

4.3.1.1. Formiranje kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta

Razvoj nove NIR metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C je proveden uz korištenje relativno velikog broja proizvodnih serija cjepiva (n = 11) kako je to detaljno opisano u poglavlju 3.2.2.1. Na ovaj se je način obuhvatila varijabilnost fizikalnih i kemijskih svojstava ovoga cjepiva, koje proizlaze iz proizvodnog procesa i time omogućila bolja sposobnost predikcije u budućim rutinskim primjenama nove NIR analitičke metode. Fizikalne i kemijske varijabilnosti liofiliziranog cjepiva proizlaze iz varijabilnosti različitih serija ekscipijenta i djelatnih tvari u cjepivu te proizvodnog procesa koji obuhvaća: proizvodnju pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A i pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C, otapanje djelatnih tvari u otopini laktoze i natrijeva klorida, nakon čega odmah slijedi faza sterilizacije finalnog *bulk-a* filtracijom, punjenje u finalne spremnike i liofilizacija.

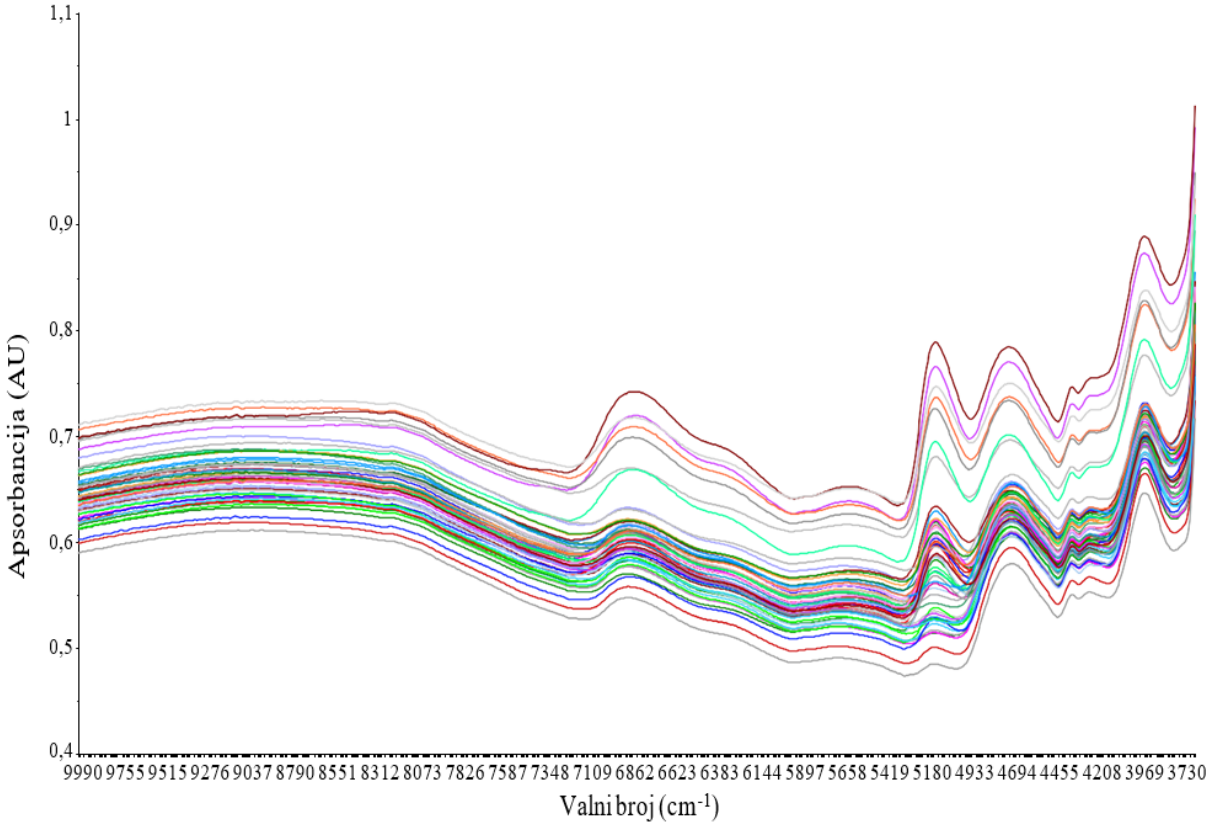
Uzorci liofiliziranog cjepiva su podijeljeni na kalibracijski set i optimizacijski test set. Formiranje reprezentativnog kalibracijskog seta presudno je za točnost predikcije s multivarijatnim modelom temeljenim na NIR spektroskopiji, te je shodno tome kalibracijski set obuhvatio fizikalne i kemijske varijabilnosti proizvodnog procesa kroz sedam serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C. Optimizacijski test set je obuhvatio uzorke četiri serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C, koje su nezavisne u odnosu na kalibracijski set, kako bi se omogućila manifestacija izvora varijabilnosti koji nisu prisutni u kalibracijskom setu.

Nadalje, kalibracijski set je trebao obuhvatiti širi raspon udjela ostatne vode (%), koji omogućuje predikciju i u uzorcima liofiliziranog cjepiva s višim udjelom ostatne vode (%), bilo da je riječ o rezultatima izvan specifikacije (OOS), rezultatima određivanja udjela ostatne vode (%) u stabilitetnim uzorcima tijekom ubrzanih ili dugotrajnih stabilitetnih studija, itd. Radi proširenja relativno uskog raspona udjela ostatne vode (%) koji je svojstven statistički dobro kontroliranim procesima proizvodnje liofilizata, u slučajno odabrane uzorke iz svake proizvodne serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (n = 11), dodana

je voda za injekcije *in bulk*. Postupak priprave uzoraka liofiliziranog cjepiva s povećanim udjelom vode (%) detaljno je opisan u poglavlju 3.2.2.1.

4.3.1.2. Snimanje NIR spektara

Snimljeni NIR spektri uzoraka liofiliziranoga cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C iz kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 10000 cm^{-1} do 3700 cm^{-1} prikazani su na slici 23. Postupak snimanja NIR spektara uzoraka kalibracijskog i optimizacijskog test seta detaljno je opisan u poglavlju 3.2.2.1.



Slika 23. NIR spektri uzoraka liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C iz kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta snimljeni tehnikom difuzne refleksije u spektralnom području 10000–3700 cm^{-1}.

U spektralnom području 10000-8000 cm^{-1} nisu zapažene značajne NIR vrpce i može se vidjeti da je glavnina spektralnih informacija u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 8000 cm^{-1} do 3700 cm^{-1}. Mogu se zamijetit pomaci (engl. *offsets*) u ovim NIR spektrima dobivenim difuznom refleksijom kao moguća posljedica varijacija u mikrostrukturi liofilizacijskog kolačića gotovog proizvoda, npr. varijacije u kompaktnosti kolačića te primarnog pakiranja, tj. optičkih aberacija smeđih staklenih bočica.

U ovim NIR spektrima jasno se mogu vidjeti spektralne vrpce kombinacije, O-H istezanja i H-O-H savijanja pri približno 5300-5100 cm^{-1} i prvi viši tonovi O-H istezanja pri približno 7100– 6800 cm^{-1}, koji su specifični za molekulu vode.

4.3.1.3. Određivanje referentnih vrijednosti udjela vode

Referentne vrijednosti udjela ostatne vode (%) u nativnim uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C te u uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C u koje je dodana voda, određene su neposredno nakon snimanja NIR spektara. Udjel ostatne vode (%) u nativnim uzorcima cjepiva i uzorcima cjepiva u koje je dodana voda, određen je referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom, kako je detaljno opisano u poglavlju 3.2.1.2. Dobiveni raspon referentnih udjela ostatne vode (%) u kalibracijskom setu iznosio je od 0,5 % do 7,5 %, a u optimizacijskom test setu od 0,5 % do 6,5 %. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C iz kalibracijskog seta (m_{kal} =1-35) prikazane su u tablici 18.

Tablica 18. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka grupe A i C iz kalibracijskog seta određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom

Uzorak	Udjel vode (%)	Uzorak	Udjel vode (%)	Uzorak	Udjel vode (%)
1	2,91	16	2,32	31	4,48
2	4,19	17	1,06	32	5,49
3	0,473	18	2,54	33	5,51

Tablica 18. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka grupe A i C iz kalibracijskog seta određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom-nastavak.

Uzorak	Udjel vode (%)	Uzorak	Udjel vode (%)	Uzorak	Udjel vode (%)
4	0,512	19	1,90	34	4,55
5	0,544	20	3,26	35	7,53
6	0,605	21	4,17		
7	0,522	22	4,87		
8	0,592	23	5,13		
9	1,75	24	2,35		
10	0,544	25	6,89		
11	6,89	26	6,69		
12	3,90	27	6,41		
13	0,398	28	1,31		
14	0,482	29	1,66		
15	5,46	30	2,71		

Referentne vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C iz optimizacijskog test seta (m_{opt} = 36-55) prikazane su u tablici 19.

Tablica 19. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka grupe A i C iz optimizacijskog test seta određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom

Uzorak	Udjel vode (%)	Uzorak	Udjel vode (%)
36	5,21	46	1,28
37	5,82	47	4,74
38	0,617	48	2,48
39	0,64	49	1,40
40	2,06	50	3,04
41	0,607	51	4,38
42	0,467	52	3,00

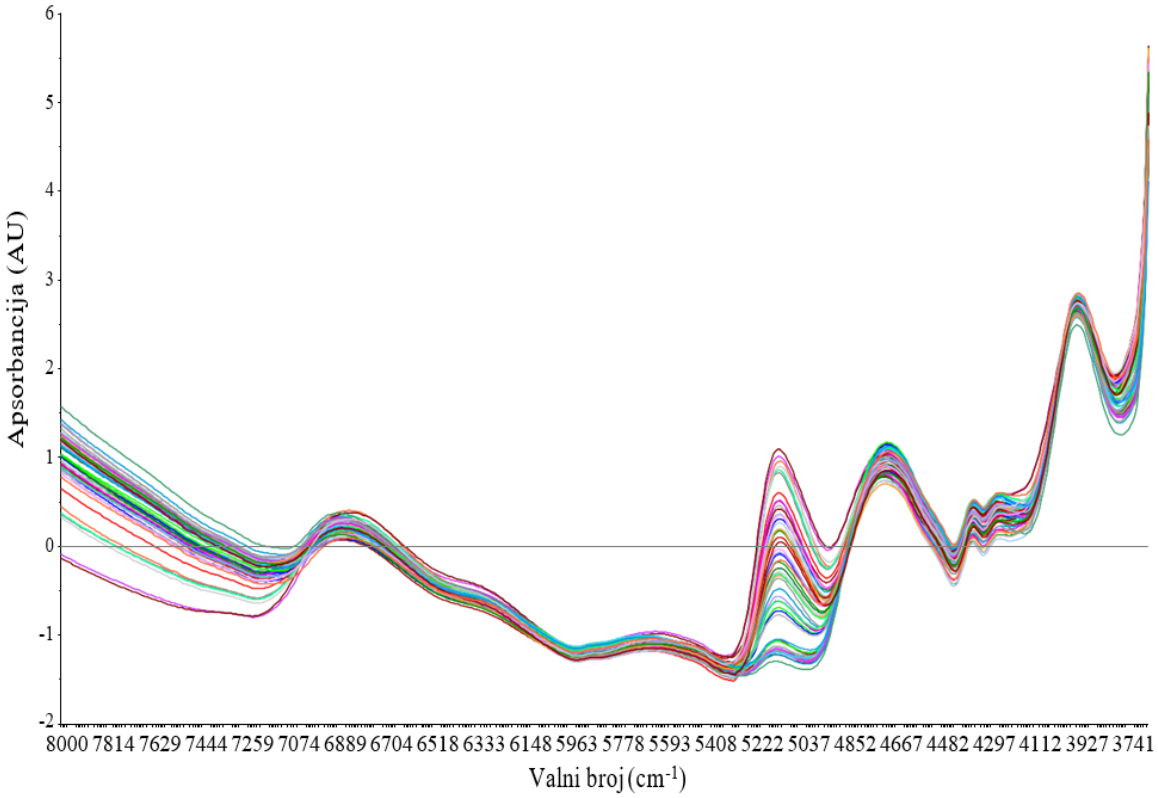
Tablica 19. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka grupe A i C iz optimizacijskog test seta određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom- nastavak.

Uzorak	Udjel vode (%)	Uzorak	Udjel vode (%)
43	0,470	53	0,657
44	3,75	54	3,68
45	5,21	55	6,55

4.3.1.4. Matematička transformacija i selekcija varijabli NIR spektra

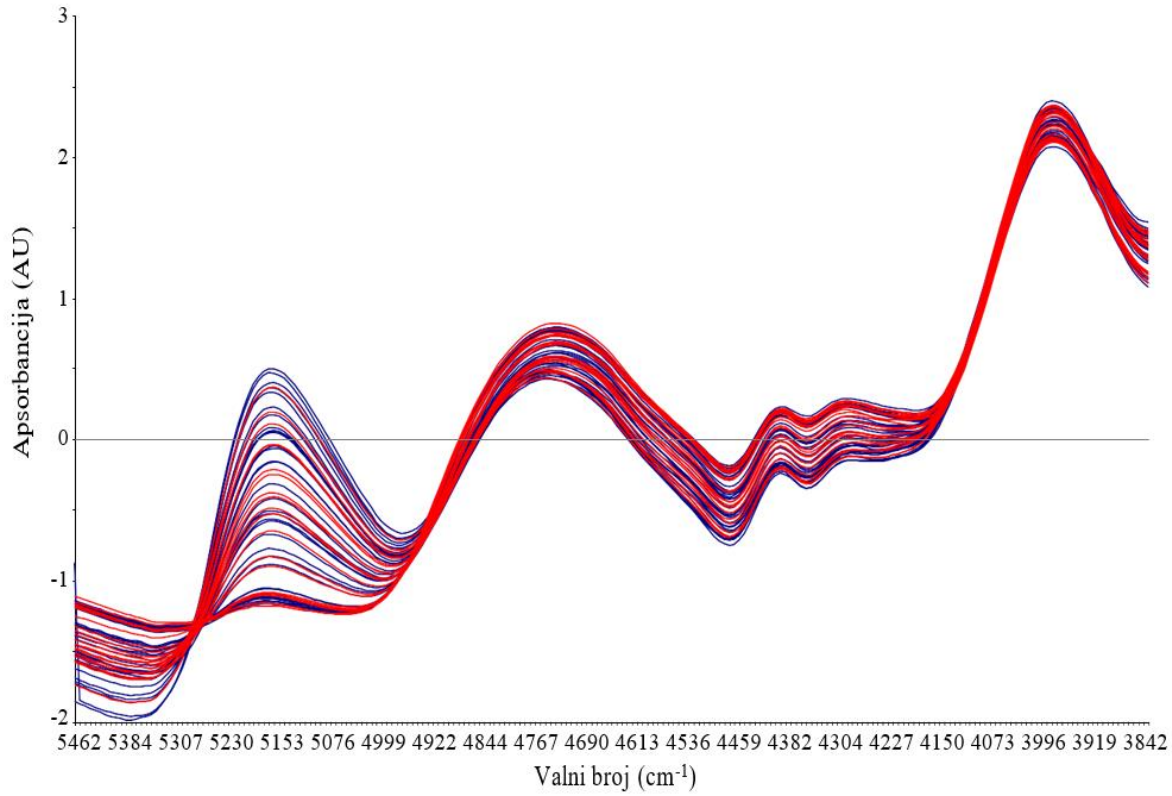
Provedena je matematička transformacija NIR spektara uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta kako bi se smanjile neželjene informacije o fizikalnim svojstvima te istovremeno sačuvale spektralne informacije o kemijskom sastavu uzoraka.

U svrhu uklanjanja aditivnih i multiplikativnih efekata koji nastaju uslijed difuzne refleksije svjetlosti korištena je standardna normalna variata (SNV), metoda matematičke transformacije iz skupine metoda za korekciju raspršenja elektromagnetskog zračenja, kako je to opisano u poglavlju 2.2.6.2 (Slika 24.).



Slika 24. SNV transformirani NIR spektri liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta u spektralnom području 8000–3700 cm^{-1}.

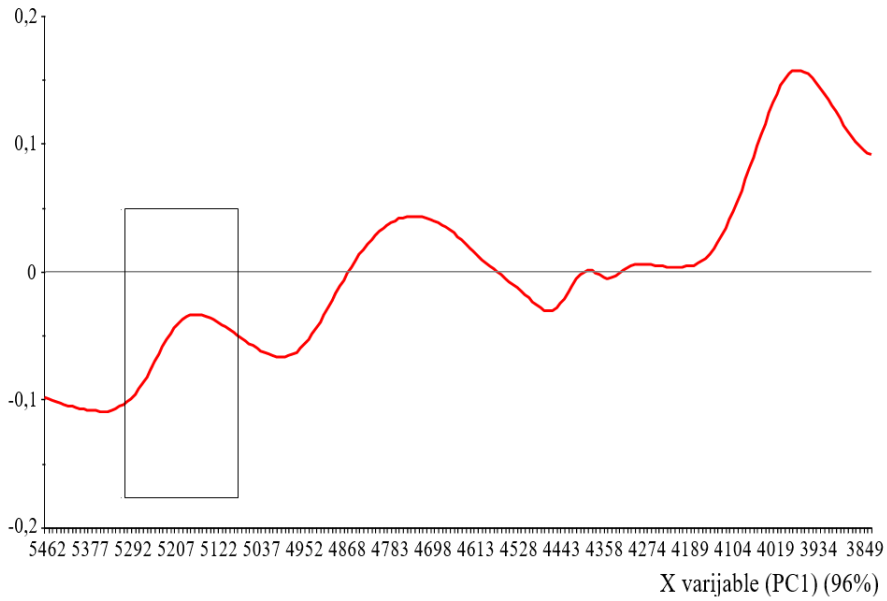
Umjesto cijelog spektralnog raspona u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 8000 cm^{-1} do 3700 cm^{-1}, na osnovi interpretativne NIR spektroskopije (poglavlje 2.2.3) selektirana su spektralna područja koja obuhvaćaju spektralne varijable karakteristične za molekulu vode. Spektralno područje od 5462-3842 cm^{-1} s dobro razlučenom spektralnom vrpcom specifičnom za molekulu vode, koju karakterizira kombinacijska vrpca O-H istezanja i H-O-H savijanja, odabrano je za NIR model radi izraženijih spektralnih varijacija, dobre razlučenosti od apsorpcijskih vrpca drugih kemijskih grupa liofiliziranog cjepiva, te bolje korelacije između NIR spektralnih varijabli i udjela ostatne vode (%) (Slika 25.). Naime, druga spektralna vrpca specifična za molekulu vode, koja odgovara prvim višim tonovima istezanja O-H veza pri približno $\tilde{\nu}$ = 6900 cm^{-1} iako pokazuje izražene varijacije, vrlo se često preklapa s C-H spektralnim vrpcama te je manje podesna za kvantifikaciju vode (Slika 24.). Selekcija informativnih spektralnih varijabli te izuzimanje neinformativnih spektralnih varijabli omogućilo je uspostavu jednostavnijeg regresijskog modela s relativno manjim brojem PLS faktora (poglavlje 2.2.6.2).



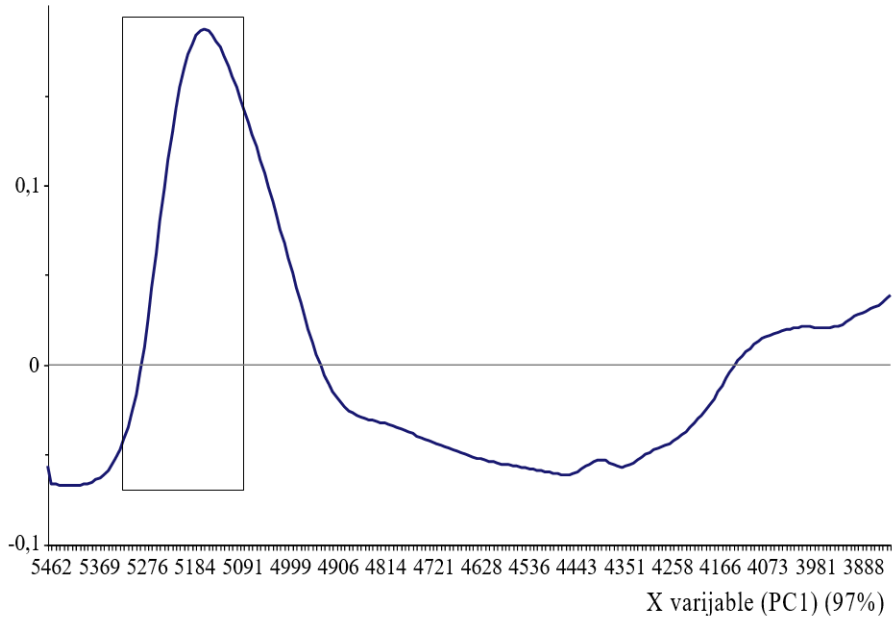
Slika 25. SNV transformirani NIR spektri liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C iz kalibracijskog seta (označeno plavom linijom) i optimizacijskog test seta (označeno crvenom linijom) u spektralnom području 5462–3842 cm^{-1}.

Provedena je analiza glavnih komponenti (PC1, PC2, PC3) za log 1/R i SNV transformirani spektar. Glavne komponente indikativne su za specifičnu frakciju varijacije koju objašnjavaju, redom prva, druga i treća glavna komponenta. Usporedba opterećenja za PC1, prije i poslije SNV transformacije prikazana je na slici 26.

A)



B)



Slika 26. Profil opterećenja (engl. *loadings*) za PC1 A) prije matematičke transformacije, log 1/R spektri, B) nakon matematičke transformacije, SNV transformirani spektri.

Profil opterećenja za prvu glavnu komponentu izveden iz SNV transformiranog spektra ima izraženiju strukturu u odnosu na profil opterećenja za prvu glavnu komponentu izveden iz log 1/R spektra u spektralnom području 5462–3842 cm^{-1} (Slika 26.). Nadalje, može se zaključiti da su u prvoj glavnoj komponenti SNV transformiranog spektra, koja sama objašnjava 97 % varijance, dominantne spektralne varijable u spektralnom području karakterističnom za kombinacijsku vrpcu molekule vode.

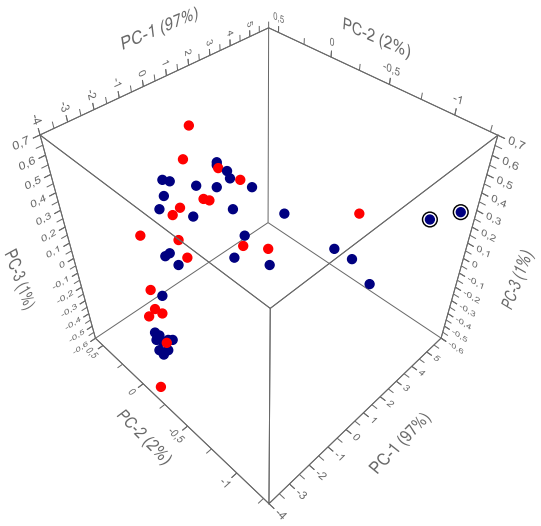
U velikoj mjeri kolinearnost u log 1/R spektru, uključujući i spektralne valne duljine karakteristične za molekulu vode, uvjetovana je efektima izazvanim mikrostrukturom liofilizacijskog kolačića.

4.3.1.5. PCA eksploracijska analiza

Kako bi se potvrdilo da su kalibracijski set i optimizacijski test set, koji su formirani slučajnim odabirom uzoraka liofiliziranih cjepiva i njihovom raspodjelom u podgrupe, reprezentativni za populaciju liofiliziranih cjepiva te da uniformno obuhvaćuju prostor dizajna, provedena je PCA eksploracijska analiza (engl. *exploratory analysis*) SNV transformiranih NIR spektara.

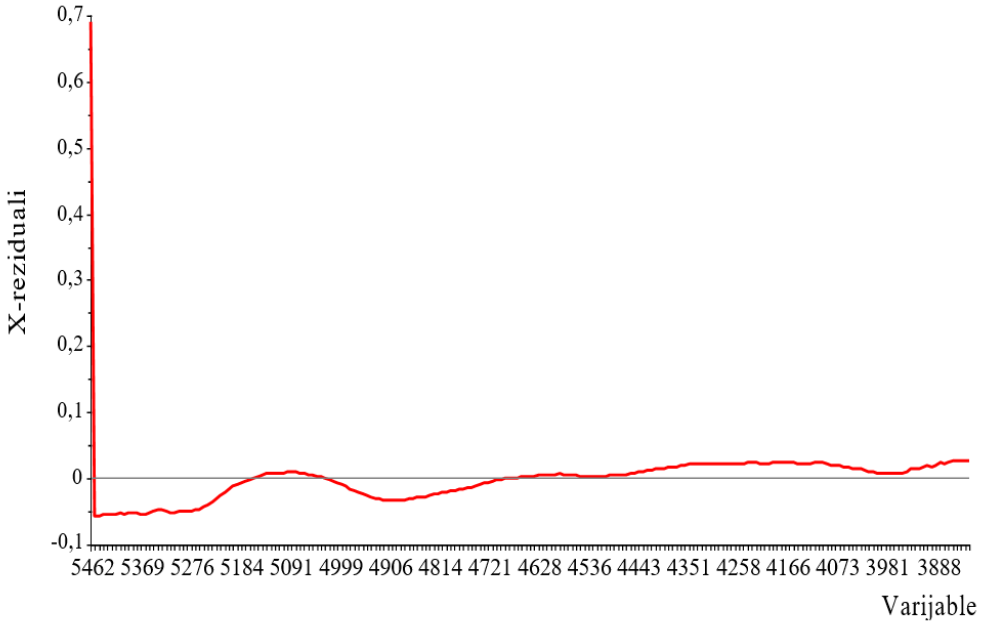
Struktura podataka u multidimenzionalnom prostoru, između ostalog grupiranje podataka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta, uzorci koji su značajno različitih vrijednosti od ostale populacije (engl. *outlier*) te postojanje obrazaca u strukturi (engl. *structure pattern*), analizirani su pomoću raspodjele faktorskih bodova (engl *scores scatter plot*). Pretpostavka je da tri glavne komponente (PC1, PC2 i PC3) objašnjavaju gotovo ukupnu varijaciju u NIR spektralnim podacima, (99,4%).

Raspodjela faktorskih bodova glavnih komponenata (PC1, PC2 i PC3) NIR spektara svih uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta uzoraka u rasponu valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 5462 cm^{-1} do 3842 cm^{-1}, ukazuje da je ukupna varijabilnost uzoraka uniformno obuhvaćena kako kalibracijskim setom tako i optimizacijskim test setom. Naime, uočena je ravnomjerna raspodjela uzoraka i usporedivo grupiranje uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta (Slika 27.).

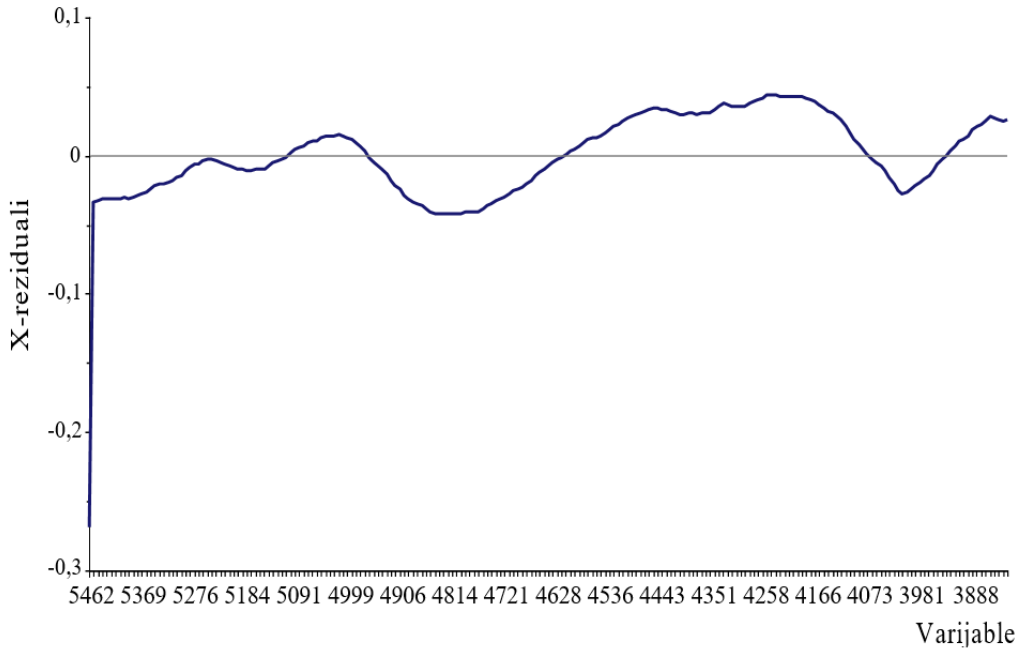


Slika 27. Raspodjela faktorskih bodova PC1, PC2 i PC3, SNV transformiranih NIR spektara uzoraka kalibracijskog seta (plavo označeno) i optimizacijskog test seta (crveno označeno) u spektralnom području 5462–3842 cm^{-1}.

Dva uzorka kalibracijskog seta (m_{kal} = 11, 35) identificirani su kao uzorci značajno različitih vrijednosti od ostalih uzoraka (engl. *outlier*). Temeljem analize doprinosa reziduala (engl. *residual contribution plot*) za uzorke kalibracijskog seta m_{kal} =11 (Slika 28.), m_{kal} = 35 (Slika 29.), procijenjeno je da doprinosi reziduala pri spektralnim varijablama u spektralnom području specifičnom za molekulu vode nisu značajni te su usporedivi s doprinosima reziduala pri istim spektralnim varijablama drugih uzoraka kalibracijskog seta.



Slika 28. Doprinos reziduala prema spektralnim varijablama za uzorak m_{kal} = 11 liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C



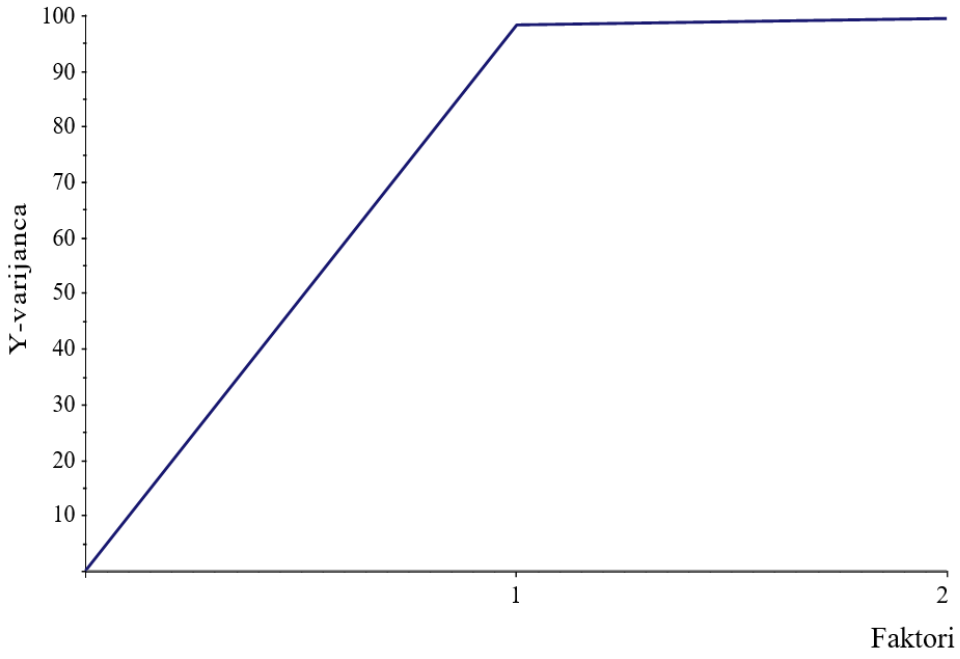
Slika 29. Doprinos reziduala prema spektralnim vairjablama za uzorak m_{kal} = 35 liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C

Može se zaključiti da nema osnova za njihovu verifikaciju kao uzoraka koji su značajno različitih vrijednosti (engl. *outlier*) te je vjerojatnije da ovi uzorci iz kalibracijskog seta predstavljaju podzastupljene uzorke, koji su rijetki ali svojstveni procesu proizvodnje liofiliziranoga cjepiva. Stoga su svi ovdje analizirani uzorci liofiliziranoga cjepiva iz kalibracijskoga seta i optimizacijskoga test seta uključeni u izradu NIR multivarijatnog kalibracijskog modela (4.3.1.6).

4.3.1.6. Multivarijatna regresija

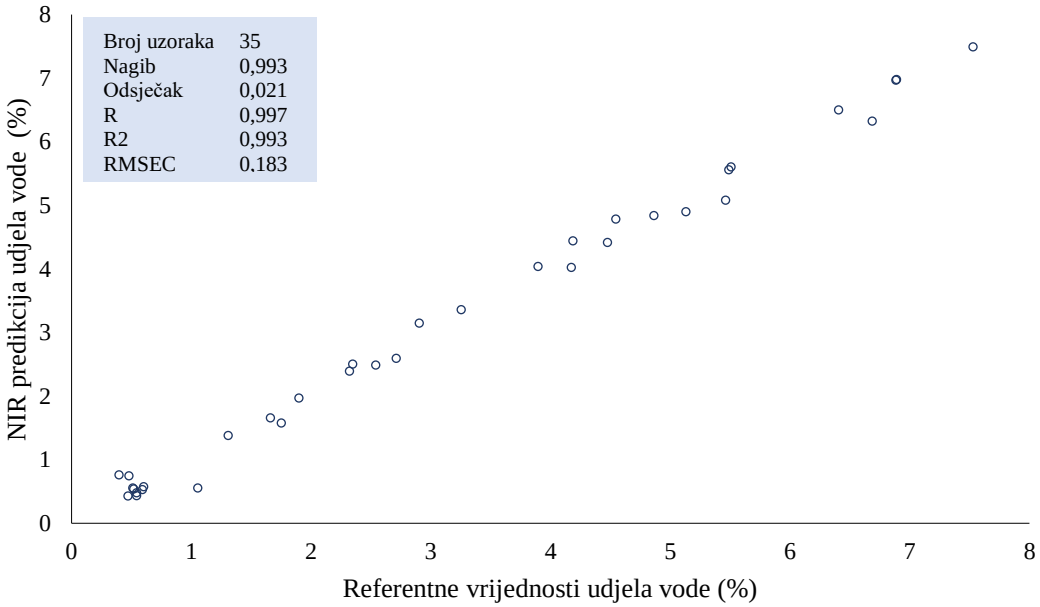
Za izradu multivarijatnog kalibracijskog modela za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima protiv meningokoka serogrupa A i C korišteni su SNV transformirani NIR spektri uzoraka iz kalibracijskog seta i to u spektralnom rasponu $\tilde{\nu}$ = 5462-3842 cm^{-1}. Kalibracijski set obuhvatio je 35 uzoraka liofiliziranog cjepiva s referentnim vrijednostima udjela ostatne vode (%) u rasponu od 0,5 % do 7,5 %, koji su određeni referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Tablica 18.).

U svrhu izrade NIR multivarijatnog kalibracijskog modela korištena je metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS), koja je detaljno opisana u 2.2.6.3. Dva PLS faktora zajedno objašnjavaju 99 % varijance (Slika 30.).



.a 30. Varijacija objašnjena PLS faktorima (faktor 1, faktor 2).

Korelacija između NIR spektralnih podataka i referentnih vrijednosti udjela ostatne vode (%) u uzorcima liofiliziranih cjepiva iz kalibracijskog seta, koje su određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom, za multivarijatan kalibracijski model s dva PLS faktora prikazana je na slici 31.

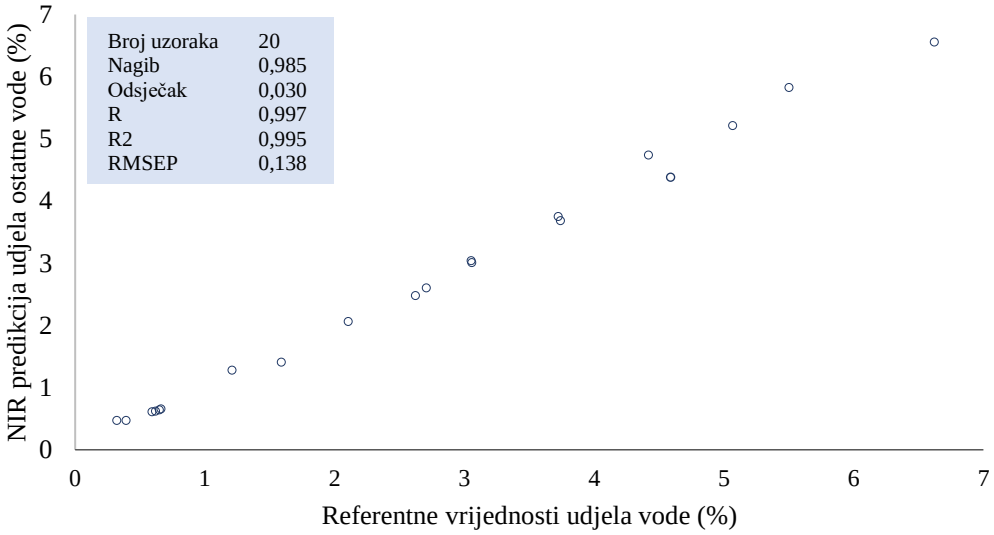


Slika 31. Korelacija dobivenih NIR vrijednosti (5462–3842 cm^{-1}) i referentnih vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima liofiliziranih cjepiva iz kalibracijskog seta za NIR multivarijatan kalibracijski model s dva PLS faktora.

Koeficijent određivanja (R^2 = 0,99) ukazuje na visoku korelaciju između ovih dviju metoda - NIR metode i referentne Karl-Fischer volumetrijske metode. Moguće je procijeniti iz vrijednosti nagiba regresijskog pravca od 1,0 (Slika 31.) da nema značajne proporcionalne pogreške NIR modela u odnosu na referentnu Karl-Fischer volumetrijsku metodu. Nadalje, iz vrijednosti odsječka na osi ordinata (b = 0,02) može se zaključiti da nema značajne konstantne pogreške u formiranom NIR multivarijatnom kalibracijskom modelu u odnosu na referentnu Karl-Fischer volumetrijsku metodu. Za ovaj kalibracijski model s dva PLS faktora dobivena je vrijednost RMSEC od 0,18 %, kako je detaljno opisano u 2.2.6.4.

U sljedećem koraku uspostave NIR predikcijskog modela analizirana je optimalna dimenzionalnost modela, odnosno optimalan broj PLS faktora (poglavlje 2.2.6.4), koji će konstituirati NIR multivarijatan model. Optimalan broj PLS faktora je odabran kako bi se izbjegla pretjerano fina konfiguracija modela (engl *overfitting*) i dobio jednostavan, robustan model dobrih izvedbenih karakteristika u fazi predikcije ciljnog analita, tj. udjela ostatne vode (%).

Sposobnost predikcije uspostavljenog NIR multivarijatnog modela procijenjena je korištenjem uzoraka optimizacijskog test seta, tj. nezavisnim uzorcima koji nisu korišteni u formiranju NIR kalibracijskog modela. Uzorci optimizacijskog test seta istovremeno su reprezentativni za populaciju proizvodnih serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C s udjelom ostatne vode (%) unutar i izvan granica specifikacije. Korelacija između rezultata za udjel ostatne vode (%) u uzorcima optimizacijskog test seta koji su dobiveni predikcijom novim NIR modelom s dva PLS faktora i pripadnih referentnih vrijednosti za udjel ostatne vode (%) koji su dobiveni referentnom Karl-Fischeru volumetrijskom metodom, prikazana je na slici 32.



Slika 32. Korelacija predikcija udjela vode (%) NIR kalibracijskim modelom s dva PLS faktora i referentnih vrijednosti udjela vode (%) dobivenih Karl-Fischer referentnom metodom u uzorcima liofiliziranih cjepiva iz optimizacijskog test seta.

Parametri ukazuju na visoku korelaciju predikcijom dobivenih vrijednosti i referentnih vrijednosti za udjel vode (%). Vrijednosti dobivene za kemometrijske parametre (poglavlje 2.2.6.4), RMSEC (Slika 31) i RMSEP (Slika 32.) su usporedive i iznose redom 0,18 % i 0,14 %, te inicijalno prejudiciraju robusnost formiranog NIR multivarijatnog modela.

Time je u fazi optimizacije formiranog kalibracijskog NIR modela s dva PLS faktora (Slika 31.) potvrđen ispravan izbor samo dva PLS faktora. Odabirom manjeg broja PLS faktora nastojalo se uspostaviti NIR kalibracijski model koji će biti robustan obzirom na spektralnu varijabilnost koja se očekuju između različitih proizvodnih serija liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C. Ovim će se poboljšati sposobnost predikcije formiranog NIR kalibracijskog modela u budućnosti.

4.3.2. Procjena prikladnosti za svrhu NIR analitičkog sustava na temelju procjene ukupne pogreške

Cilj validacije NIR analitičkog sustava, koji uključuje NIR kalibracijski model i referentnu Karl-Fischer volumetrijsku metodu, je utvrditi prikladnost za svrhu ovog analitičkog sustava (poglavlje 2.3). Na temelju relevantnih kemometrijskih parametara za analizu prikladnosti za svrhu pomoću profila točnosti odabran je NIR kalibracijski model s dva PLS faktora. Cilj analize prikladnosti za svrhu je bio da se procjenom ukupne pogreške obuhvati i pogreška referentne Karl-Fischer volumetrijske metode. Naime, visoka korelacija između vrijednosti udjela ostatne vode (%) dobivenih predikcijom NIR kalibracijskim modelom i referentnih vrijednosti dobivenih Karl-Fischer volumetrijskom metodom potvrđuje sposobnost formiranog NIR multivarijatnog modela da predvidi referentne vrijednosti udjela ostatne vode (%), ali ne ukazuje na odstupanje NIR predikcijom dobivenih rezultata od prave vrijednosti za udjel ostatne vode (%). Shodno tome, bilo koja značajna sustavna pogreška u referentnoj Karl-Fischer volumetrijskoj metodi ugradila bi se u novi NIR kalibracijski model (poglavlje 2.2.7).

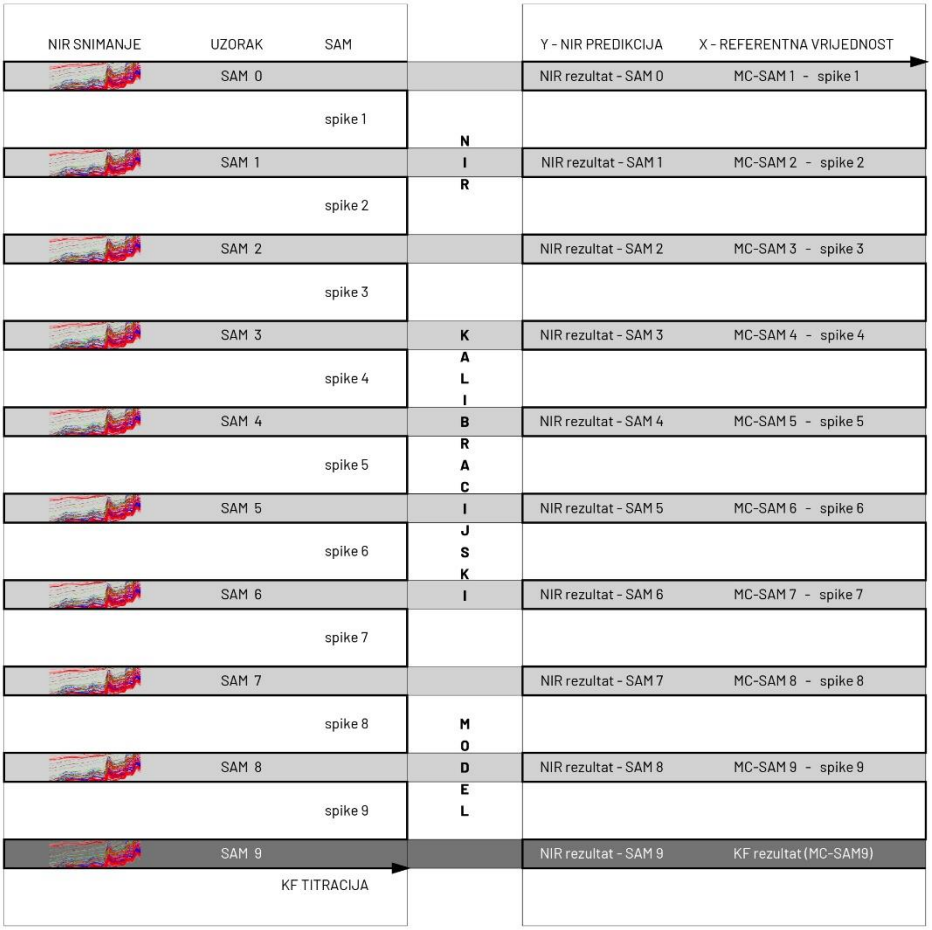
4.3.2.1. Novi eksperimentalni dizajn za procjenu ukupne pogreške NIR analitičkog sustava

Za procjenu ukupne pogreške NIR analitičkog sustava, koja uključuje i pogreške referentne Karl-Fischer volumetrijske metode, neophodne su referentne vrijednosti za koje je mjerna nesigurnost za udjel vode (%) zanemariva u odnosu na ukupnu mjernu nesigurnost. Teškoću kako u vezi liofiliziranih cjepiva tako i liofilizata općenito, predstavljaju: nedostupnost certificiranih referentnih materijala (CRM), nemogućnost priprave slijepe probe tj. matriksa bez ciljnog analita kao i liofilizata bez ostatne vode, kako je detaljno opisano u poglavlju 2.2.7. U skladu s navedenim, radi nemogućnosti procjene ukupne pogreške kod određivanja udjela ostatne vode (%) u liofiliziranim cjepivima, procjena točnosti NIR metode zasniva se na usporedbi s referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom, a da se pri tom ne uzimaju u obzir sustavne pogreške referentne Karl-Fischer volumetrijske metode.

U svrhu procjene ukupne pogreške novog NIR analitičkog sustava, koja uključuje i sustavne pogreške referentne Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C, osmišljen je inovativni eksperimentalni dizajn. Ovim inovativnim eksperimentalnim dizajnom dobivene su nove referentne vrijednosti za udjel ostatne vode (%) gravimetrijskom metodom za koje je mjerna nesigurnost za udjel vode (%) zanemariva u odnosu na ukupnu mjernu nesigurnost. Također, za procjenu ukupne pogreške bilo je bitno da su uzorci nezavisni, tj. da nisu korišteni niti u kalibraciji niti u optimizaciji formiranog NIR modela. Novi eksperimentalni dizajn temeljen je na metodi standardnog dodavanja vode (engl. *Standard Addition Method*, SAM) u jednu bočicu liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C.

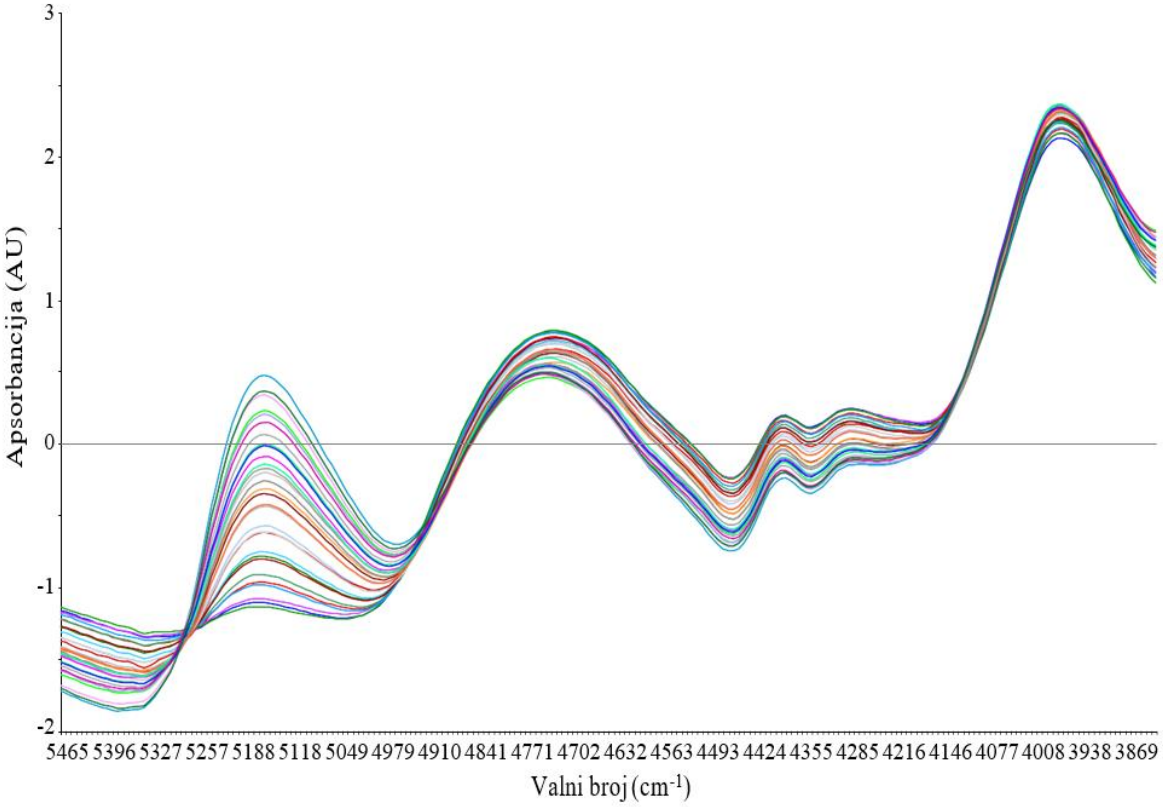
Ovim novim eksperimentalnim dizajnom postignuto je da su svi SAM uzorci, koji će se koristiti za procjenu ukupne pogreške NIR analitičkog sustava, pripravljeni iz samo jednog nativnog uzorka liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka grupe serogrupe A i C. Dakle, formirani uzorci su homogeni te je varijabilnost između različitih SAM uzoraka isključiva posljedica različitih udjela ostatne vode. Homogenost ovih uzorka preduvjet je za procjenu ukupne pogreške profilom točnosti. Nadalje, svi SAM uzorci imaju matriks koji je istovjetan proizvodnom liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C što ih u fazi validacije čini reprezentativnim za buduće uzorke u kojima će se kvantificirati ostatna voda novom NIR analitičkom metodom.

Novim eksperimentalnim dizajnom koji se temelji na metodi standardnog dodavanja vode u liofilizirano cjepivo, obuhvaćeno je deset referentnih vrijednosti ostatne vode (%) u rasponu NIR analitičke metode. Eksperimentalni protokol detaljno je opisan u poglavlju 3.2.2.1, a eksperimentalan dizajn shematski je prikazan na slici 33.



Slika 33. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna koji se temelji na metodi standardnog dodavanja (SAM) vode za procjenu ukupne pogreške novog NIR analitičkog sustava za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C.

Snimljeni su NIR spektri deset SAM uzoraka (SAM0-SAM9) u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 10000 cm^{-1} do 3700 cm^{-1}, nakon 24 h inkubacije od dodavanja vode u liofilizirano cjepivo te ponovno nakon 48 h od dodavanja vode. Postupak snimanja ukupno 100 NIR spektara detaljno je opisan u poglavlju 3.2.2.1. Matematički obrađeni NIR spektri SNV algoritmom u selektiranom spektralnom području 5462-3842 cm^{-1} prikazani su na slici 34.



Slika 34. SNV transformirani NIR spektri SAM0-SAM9 uzoraka u spektralnom području 5462- 3842 cm^{-1}.

Neposredno nakon snimanja ovih NIR spektara određen je udjel vode (%) u uzorku s najvišim udjelom vode (SAM9) novom referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom, kako je detaljno opisano u poglavlju 3.2.1.2.

Referentne vrijednosti udjela ostatne vode (%) u SAM uzorcima (SAM0 - uzorak liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C; SAM1 - SAM9 uzorci liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C u koje je kroz devet uzastopnih injektiranja dodana voda za injekcije *in bulk*) prikazane su u tablici 20. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u SAM0 - SAM8 uzorcima izračunate su retrogradno, tj. iz razlike mase vode (mg) u SAM9 uzorku određene referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom i konsekutivnih gravimetrijski određenih masa dodane vode (mg) (Slika 33.). Raspon novih deset referentnih vrijednosti udjela vode (%) u SAM0-SAM9 uzorcima je od 0,6 % što odgovara procijenjenom udjelu ostatne vode (%) u uzorku nativnog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C (SAM0), do 6,7 % u uzorku istog nativnog cjepiva s najvećim volumenom dodane vode za injekcije *in bulk* (SAM9). U navedenom rasponu zadan je relativno velik broj referentnih vrijednosti udjela vode (%) radi profila točnosti, kako bi se minimizirali intervali između susjednih koncentracija i time izbjegle velike interpolacije, a sve radi boljeg uočavanja obrasca u profila točnosti (engl. *pattern behaviour*).

Tablica 20. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u SAM0-SAM9 uzorcima izračunate prema shematskom prikazu (Slika 33.).

Uzorak	Masa dodane vode (mg)	Udjel vode (%)
SAM0*	-	0,555
SAM1	0,38	0,951
SAM2	0,46	1,43
SAM3	0,53	1,98
SAM4	0,80	2,81
SAM5	0,67	3,51
SAM6	0,46	3,99
SAM7	0,73	4,75
SAM 8	0,87	5,66
SAM9	0,99	6,69**

*Nativni uzorak cjepiva protiv meningokoka grupe A i C, polisaharidnog, liofiiziranog, serija 73

**Udjel vode (%) određen referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom

Za predikciju udjela vode (%) u SAM0-SAM9 uzorcima korišten je formiran NIR multivarijatan model s dva PLS faktora (poglavlje 4.3.1.6). NIR predikcije udjela vode (%) u SAM0-SAM9 uzorcima prikazane su tablici 21.

Tablica 21. NIR predikcije udjela vode (%) u SAM0 - SAM9 uzorcima

Uzorak	Referentna vrijednost udjela vode (%)	Redni broj ponavljanja	NIR predikcija udjela vode (%) /24h	NIR predikcija udjela vode (%) /48h
SAM0	0,555	1	0,590	0,533
		2	0,585	0,498
		3	0,597	0,559
		4	0,639	0,524
		5	0,627	0,557
SAM1	0,951	1	0,982	0,955
		2	1	1,01
		3	0,962	1,06
		4	0,944	0,931
		5	1,01	0,995
SAM2	1,43	1	1,46	1,47
		2	1,456	1,50
		3	1,44	1,47
		4	1,45	1,49
		5	1,52	1,48
SAM3	1,98	1	2,08	2,19
		2	2,17	2,17
		3	2,15	2,24
		4	2,10	2,06
		5	2,17	2,13
SAM4	2,81	1	2,95	2,97
		2	3,05	2,96
		3	2,94	2,95
		4	3,00	3,01
		5	3,01	3,14

Tablica 21. NIR predikcije udjela vode (%) u SAM0 - SAM9 uzorcima -nastavak.

Uzorak	Referentna vrijednost udjela vode (%)	Redni broj ponavljanja	NIR predikcija udjela vode (%) /24h	NIR predikcija udjela vode (%) /48h
SAM5	3,51	1	3,51	3,60
		2	3,49	3,61
		3	3,60	3,51
		4	3,56	3,46
		5	3,48	3,59
SAM6	3,99	1	4,25	4,21
		2	4,23	4,24
		3	4,27	4,19
		4	4,22	4,28
		5	4,26	4,24
SAM7	4,75	1	4,95	4,82
		2	4,90	4,89
		3	4,90	4,87
		4	4,86	4,84
		5	4,88	4,83
SAM8	5,66	1	5,85	5,73
		2	5,78	5,75
		3	5,73	5,75
		4	5,75	5,68
		5	5,65	5,72
SAM9	6,69	1	6,89	6,78
		2	6,82	6,72
		3	6,81	6,74
		4	6,81	6,77
		5	6,80	6,78

4.3.2.2. Odstupanje od prave vrijednosti

Odstupanje od prave vrijednosti (engl. *trueness*) nove NIR analitičke metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C procijenjeno je eksternom validacijom sa SAM test setom. Mjerna nesigurnost gravimetrijski određenih referentnih vrijednosti udjela vode (%) u SAM0 - SAM9 uzorcima aproksimirana je na nulu. Odstupanje od prave vrijednosti izraženo je kao apsolutni *bias* (%), relativni *bias* (%) i iskorištenje (%) za svaki pojedini SAM uzorak (Tablica 22.).

Tablica 22. Odstupanje od prave vrijednosti NIR metode za određivanje udjela vode (%)

Referentna vrijednost udjela vode (%)	Aritmetička sredina NIR predikcija udjela vode (%)	Apsolutni *bias* (%)	Relativni *bias (%)*	Iskorištenje (%)	Interval pouzdanosti iskorištenja (95%)
0,555	0,571	0,016	2,9	102,9	[97,05 ,108,7]
0,951	0,985	0,034	3,6	103,6	[100,7, 106,4]
1,43	1,47	0,04	3,0	103,0	[101,8, 104,2]
1,98	2,14	0,16	8,2	108,2	[106,2, 110,2]
2,81	3,00	0,19	6,8	106,8	[105,2, 108,4]
3,51	3,54	0,03	0,77	100,8	[99,59, 101,9]
3,99	4,24	0,25	6,2	106,2	[105,7, 106,7]
4,75	4,88	0,12	2,6	102,6	[102,0 ,103,1]
5,66	5,74	0,08	1,4	101,4	[100,8, 102,1]
6,690	6,79	0,10	1,5	101,5	[101,0, 102,0]

Značajno širi interval pouzdanosti (95%) za iskorištenje pri najnižem udjelu vode (%) u skladu je s relativno velikom razlikom u aritmetičkim sredinama dobivenih rezultata NIR predikcija udjela vode (%) koja su provela dva analitičara.

4.3.2.3. Preciznost

U svrhu procjene preciznosti određivanja udjela vode (%) novom NIR analitičkom metodom za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C, obrađeni su rezultati za udjel vode (%) dobiveni eksternom validacijom sa SAM0 - SAM9 uzorcima (Tablica 21.). Preciznost je procijenjena je na dvije razine - ponovljivost i intermedijarna preciznosti, u cijelom rasponu analitičke metode pri deset različitih udjela vode (%). Ponovljivost, odnosno procjena preciznosti pri istim eksperimentalnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu obuhvatila je instrumentalnu preciznost i varijabilnost uslijed različitih položaja bočice, što je očekivan izvor varijabilnosti pri rutinskoj analizi. U svrhu procjene intermedijarne preciznosti, ispitana su dva značajna izvora varijacije, različiti analitičari i dani testiranja. Preciznost je izražena pomoću mjera preciznosti, standardne devijacije (Tablica 23.) i relativne standardne devijacije (Tablica 24.). Dodatno je izražena i gornja granica intervala pouzdanosti (95%) za ponovljivost i intermedijarnu preciznost (Tablica 25.).

Tablica 23. Apsolutna intermedijarna preciznost i ponovljivost NIR metode za određivanje udjela vode (%) (SD)

Referentna vrijednost udjela vode (%)	Ponovljivost (s_r)	Standardna devijacija između serija (s_R)	Omjer varijance između grupa i varijance unutar grupe (s_R^2/s_r^2)	Intermedijarna preciznost
0,555	0,025	0,051	4,20	0,056
0,951	0,038	0	0	0,038
1,43	0,023	0,011	0,241	0,025
1,98	0,056	0	0	0,056
2,81	0,063	0	0	0,063
3,51	0,058	0	0	0,058
3,99	0,028	0	0	0,028
4,75	0,030	0,032	1,09	0,044
5,66	0,053	0	0	0,053
6,69	0,034	0,045	1,68	0,056

Tablica 24. Relativna intermedijarna preciznost i ponovljivost NIR metode za određivanje udjela vode (%) (RSD)

Referentna vrijednost udjela vode (%)	Ponovljivost (RSD %)	Intermedijarna preciznost (RSD %)
0,555	4,5	10,2
0,951	4,0	4,0
1,43	1,6	1,8
1,98	2,9	2,8
2,81	2,3	2,2
3,51	1,7	1,6
3,99	0,76	0,71
4,75	0,66	0,92
5,66	0,96	0,94
6,69	0,56	0,84

Tablica 25. Gornja granica intervala pouzdanosti (95%) za ponovljivost i intermedijarnu preciznost NIR metode za određivanje udjela vode (%)

Referentna vrijednost udjela vode (%)	95% gornja granica pouzdanosti za ponovljivost (SD)	95% gornja granica pouzdanosti za intermedijarnu preciznost (SD)
0,555	0,042	0,828
0,951	0,062	0,062
1,43	0,039	0,240
1,98	0,092	0,092
2,81	0,103	0,103
3,51	0,095	0,095
4,00	0,047	0,047
4,75	0,052	0,549
5,66	0,087	0,087
6,69	0,059	0,754

Iako su relativna ponovljivost i relativna intermedijarna preciznost izražene kao RSD (%) više pri nižim udjelima vode, odgovarajuće apsolutne vrijednosti (SD) usporedive su u čitavom rasponu od 0,6% do 6,7%, kao što je vidljivo u tablici 19., čime je potvrđena homoscedastičnost. U skladu s navedenim, ponovljivost i intermedijarna preciznost neovisne su o udjelu ciljnog analita.

Omjer intermedijarne preciznosti i ponovljivosti kreće se u rasponu od 1 do 1,6. Izuzetak je najniži udjel vode (0,56 %) u rasponu metode pri kojem navedeni omjer iznosi 2,3, što je posljedica relativno velike razlike u aritmetičkim sredinama NIR predikcija koja su provela dva analitičara.

Ponovljivost rezultata određivanja masenog udjela vode (%) u SAM0 – SAM9 uzorcima dodatno potvrđuje da je predloženim eksperimentalnim protokolom ostvarena homogenost raspodjele dodane vode 24 h i 48 h nakon dodavanja vode u uzorcima SAM test seta.

4.3.2.4. Točnost

Točnost (engl. *accuracy*) nove NIR analitičke metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C uzima u obzir ukupnu pogrešku, tj. sustavnu pogrešku i slučajnu pogrešku. Točnost je analizirana pomoću profila točnosti koji koristi *βETI* interval, kako je to detaljno opisano u 2.3.2.

Profil točnosti izveden je iz rezultata dobivenih eksternom validacijom sa SAM0 - SAM9 uzorcima (Tablica 21.). Statistički parametri za profil točnosti prikazani su u tablici 26.

Tablica 26. Statistički parametri profila točnosti

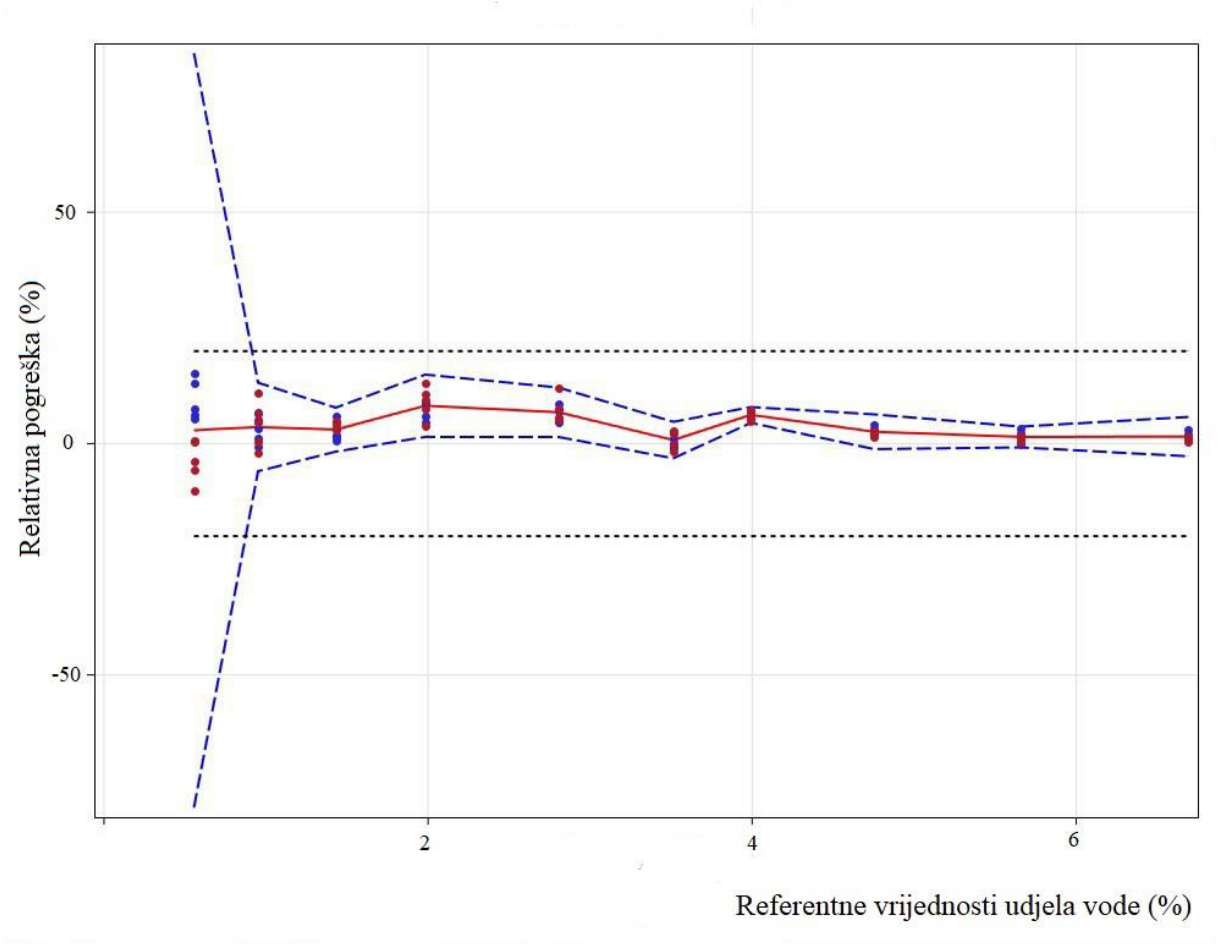
Referentna vrijednost udjela vode (%)	*βETI* interval (%)	Relativne granice (%)	Rizik* (%)
0,555	[0,118, 1,02]	[-78,6, 84,4]	29,6
0,951	[0,894, 1,08]	[-6,0, 13,1]	0,22
1,43	[1,41, 1,54]	[-1,7, 7,7]	0,01
1,98	[2,01, 2,28]	[1,4, 14,9]	0,18
2,81	[2,85, 3,15]	[1,4, 12,1]	0,02
3,51	[3,40, 3,68]	[-3,2, 4,7]	0
3,99	[4,17, 4,31]	[4,5, 7,9]	0

Tablica 26. Statistički parametri profila točnosti-nastavak.

Referentna vrijednost udjela vode (%)	*βETI* interval (%)	Relativne granice (%)	Rizik* (%)
4,75	[4,70, 5,05]	[-1,2, 6,3]	0,10
5,66	[5,61, 5,87]	[-0,82, 3,7]	0
6,69	[6,51, 7,08]	[-2,7, 5,8]	0,25

*Rizik da će rezultati određivanja udjela ostatne vode (%) biti izvan zadanih granica prihvatljivosti.

Profil točnosti prikazan je na slici 35. Granice prihvatljivosti (engl. *acceptance limits*) su definirane na ± 20 %, sukladno prikladnosti za svrhu analitičke metode.



Slika 35. Profil točnosti NIR analitičke metode za određivanje udjela vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C. Relativan *bias* označen je punom crvenom linijom. *βETI* interval omeđen je isprekidanim plavim linijama. Granice prihvatljivosti označene su isprekidanim crnim linijama. Kružići prikazuju relativnu pogrešku rezultata (%) za NIR

predikcije udjela ostatne vode (%) nakon 24 h (plavo označeno) te nakon 48 h (crveno označeno).

Metoda se smatra valjanom unutar raspona za koji je profil točnosti unutar granica prihvatljivosti (engl. *acceptance limits*). Valjanost (engl. *validity*) NIR analitičke metode potvrđena je u rasponu od 0,95 % do 6,7 %, unutar kojeg se predviđa da će točnost rezultata i u budućim rutinskim testovima udovoljavati zadanim kriterijima. Nadalje, profil točnosti potvrđuje ispravnost pretpostavke da uzorci koji su PCA eksploracijskom analizom (poglavlje 4.3.1.5) identificirani kao uzorci potencijalno značajno različitih vrijednosti od ostale populacije (engl. *outlier*) predstavljaju podzastupljene uzorke, reprezentativne za ukupnu populaciju proizvodnih serija liofiliziranih cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C.

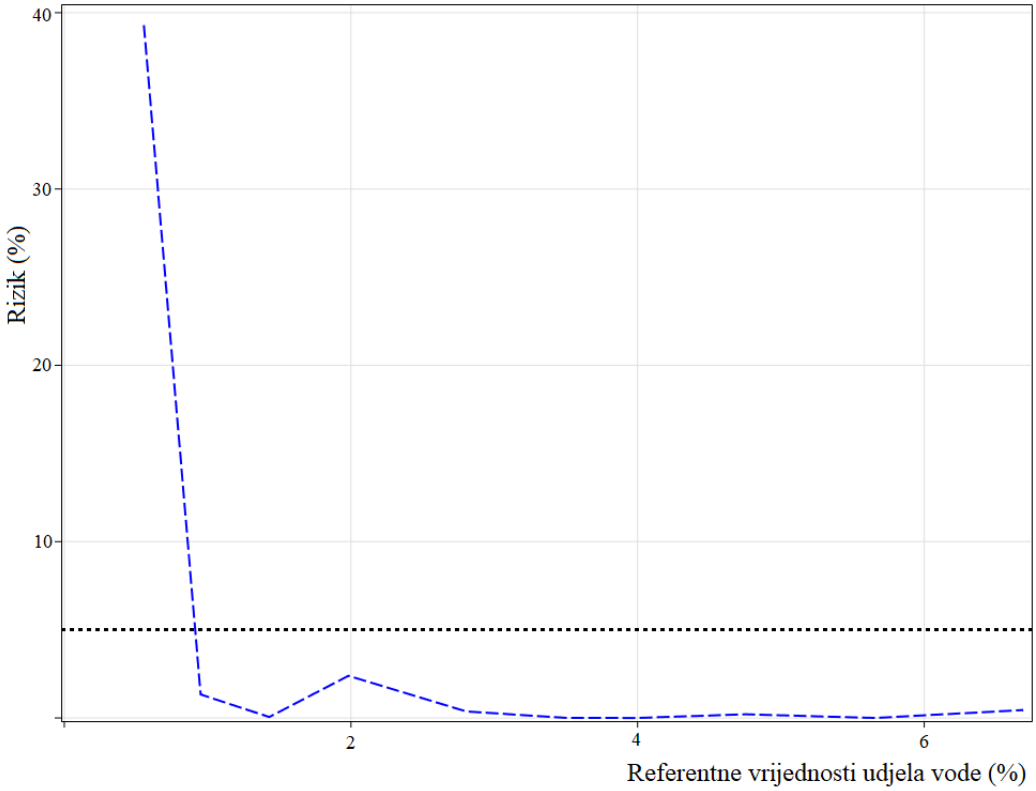
Rizik da NIR predikcije udjela ostatne vode (%) ovom metodom u budućim proizvodnim serijama liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C budu izvan postavljenih granica tolerancije iznosi 5 %.

Time je potvrđena prikladnost za svrhu, temeljem kemometrijskih parametara inicijalno odabranog, NIR kalibracijskog modela s dva PLS faktora za određivanje udjela ostatne vode (%) u cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C.

Nadalje, sposobnost NIR modela da točno odredi udjel ukupne vode (%) u uzorcima SAM0 - SAM9, nezavisno o fizikalnom stanju vode, ukazuje na ispravan odabir spektralnih varijabli NIR kalibracijskog modela (poglavlje 4.3.1.4).

Dodatno, procjena ukupne pogreške NIR analitičkog sustava temeljena na novom eksperimentalnom dizajnu potvrdila je ispravnost pretpostavke da se mjerna nesigurnost referentnih vrijednosti za udjel ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu dobivenih novom referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom može aproksimirati na vrijednost nula.

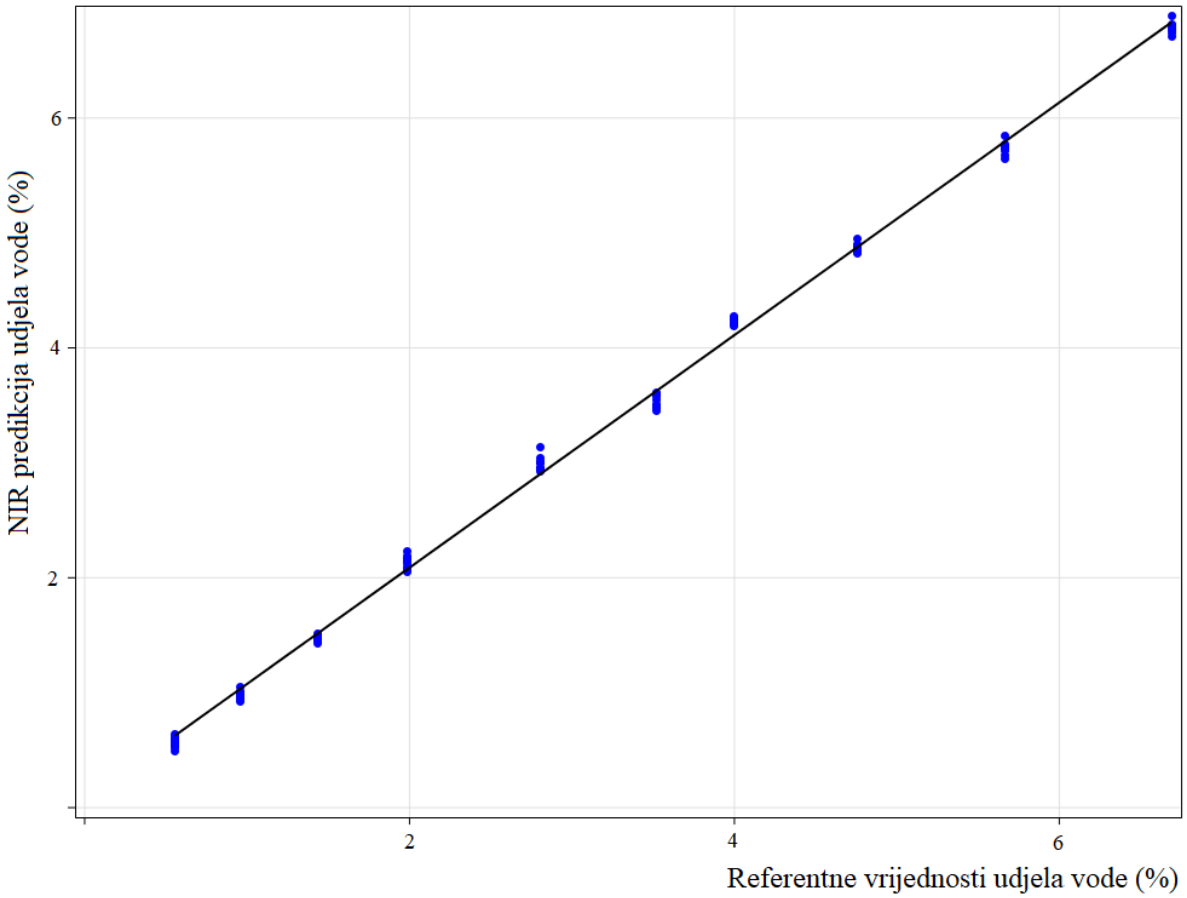
Profil rizika izveden je iz profila točnosti kako je detaljno opisano u poglavlju 2.3.3., te izražava vjerojatnost dobivanja rezultata izvan postavljenih granica prihvatljivosti u zadanom rasponu metode (Slika 36.).



Slika 36. Profil rizika za NIR analitičku metodu za određivanje udjela vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C. Isprekidanom crnom linijom označen je odabrani maksimalni rizik od 5%.

4.3.2.5. Linearnost

Linearni regresijski model NIR predikcija udjela vode u SAM0 - SAM9 uzorcima kao funkcije gravimetrijski određenih referentnih vrijednosti udjela vode (%) opisuje sposobnost analitičke metode odnosno mjeru u kojoj su njeni rezultati direktno proporcionalni udjelu ciljnog analita unutar zadanog raspona analitičke metode.



Slika 37. Linearna regresija – rezultati NIR analitičke metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupe A i C prema pripadnim referentnim vrijednostima udjela vode.

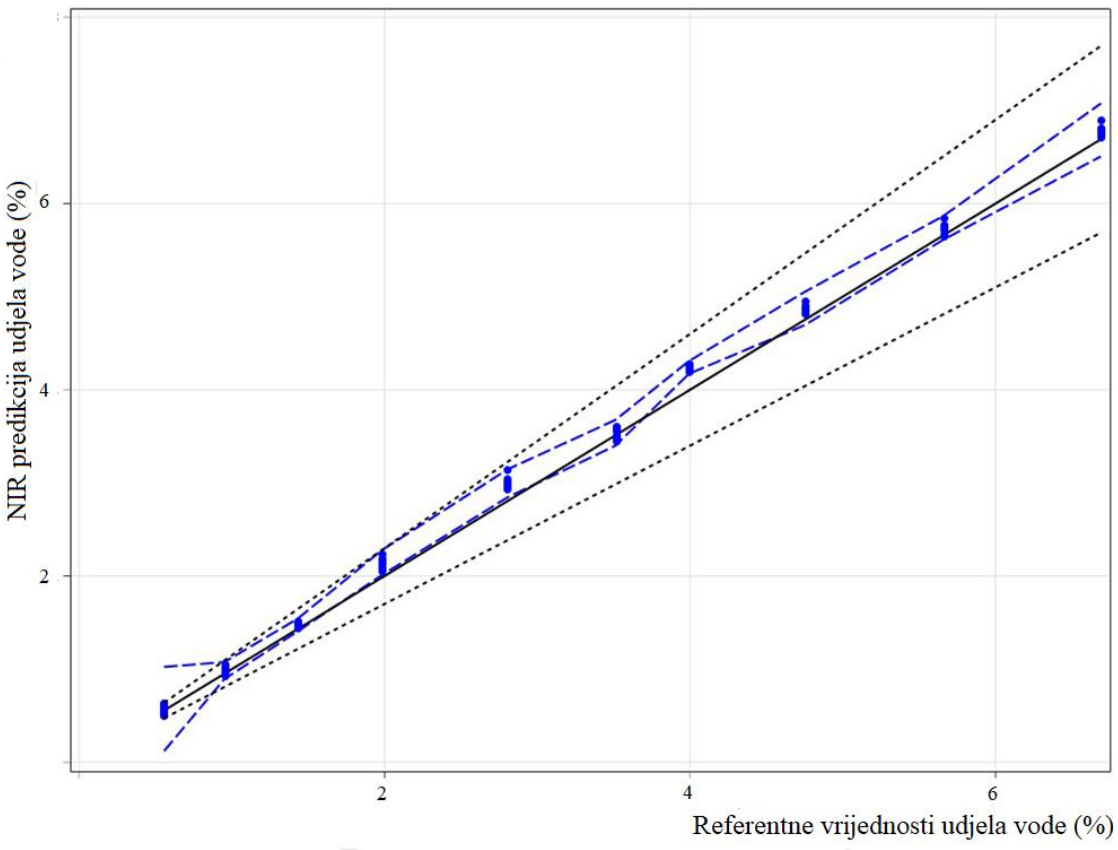
Odsječak, nagib pravca, te koeficijent određivanja prikazani su u tablici 27.

Tablica 27. Linearna regresija

Odsječak (%)	Nagib pravca	R^2
0,065	1,01	0,998

Linearnom regresijom dobiven nagib pravca od 1,01 koji je približno jednak vrijednosti 1,0 te odsječak pravca 0,065 % koji je približno jednak vrijednosti 0, ukazuju da nema značajne sustavne pogreške.

U grafičkom prikazu regresijskog pravca s granicama prihvatljivosti te naznačenim granicama *βETI* intervala, vidljiva je linearnost u valjanom rasponu metode od 0,95 % do 6,7 % udjela vode (Slika 38.), za koji su granice *βETI* intervala unutar apsolutnih granica prihvatljivosti.



Slika 38. Profil linearnosti. Pravac identičnosti Y=X označen je punom crnom linijom, *βETI* interval omeđen je isprekidanim plavim linijama u apsolutnim vrijednostima. Granice prihvatljivosti izražene u jedinicama udjela (%) označene su isprekidanom crnom linijom.

4.3.2.6. Granica kvantifikacije

Donja granica kvantifikacije (engl. *Lower Limit of Quantification*, LLOQ) za NIR analitičku metodu odgovara najnižem udjelu vode koja se može kvantitativno odrediti pod zadanim eksperimentalnim uvjetima sa zadanom točnosti.

Donja granica kvantifikacije izračunata je iz najnižeg udjela ostatne vode (%) ispod kojeg granice *βETI* intervala izlaze izvan zadanih granica prihvatljivosti (Slika 35.). Raspon metode odnosno interval između donje i gornje granice kvantifikacije u kojem metoda postiže zadanu točnost prikazan je u tablici 28.

Tablica 28. Granice kvantifikacije

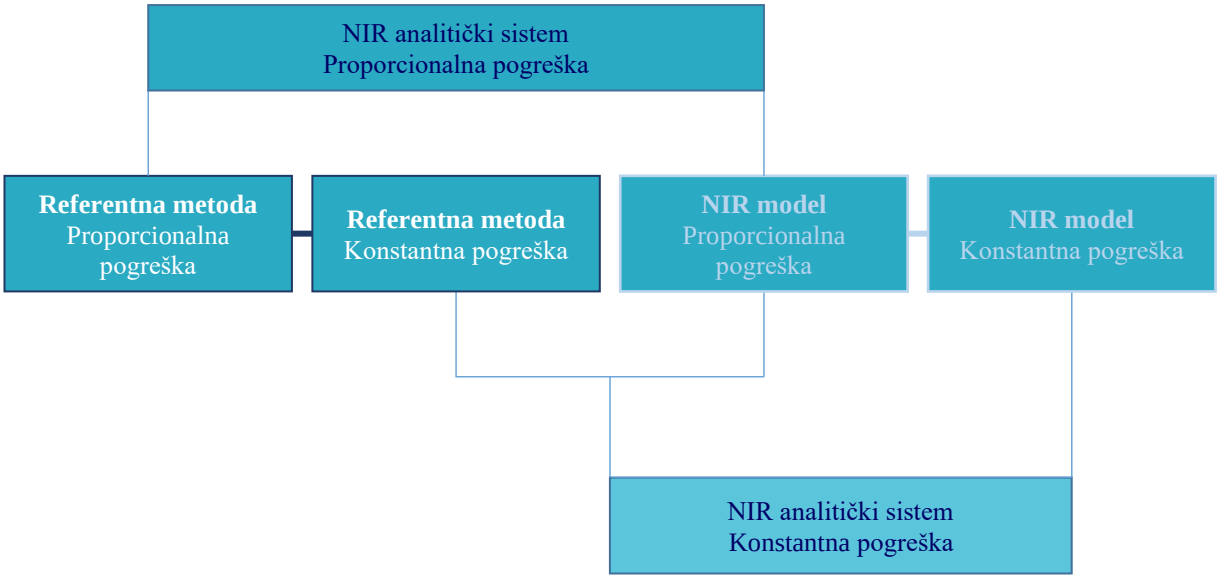
Donja granica kvantifikacije (%)	Gornja granica kvantifikacije (%)
0,95	6,7

4.3.3. Proporcionalna i konstantna sustavna pogreška NIR analitičkog sustava

Eksperimentalni dizajn temeljen na metodi standardnog dodavanja, detaljno opisan u poglavlju 4.3.2.1, omogućio je procjenu proporcionalne sustavne pogreške NIR analitičkog sustava koja uključuje i sustavnu pogrešku referentne Karl- Fischer volumetrijske metode.
Homogenost uzoraka SAM test seta koji su pripravljeni iz istog uzorka nativnog cjepiva (poglavlje 4.3.2.1) omogućila je selektivnu analizu utjecaja varijacije ciljnog analita, tj. udjela ostatne vode na selektirane spektralne varijable. Nadalje, uzorci SAM test seta reprezentativni su za proizvodne serije liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupe A i C, pa time prikladni i za ispitivanje utjecaja matriksa na sustavnu pogrešku ove analitičke metode.

Proporcionalna pogreška NIR modela prema referentnoj Karl-Fischer volumetrijskoj metodi procijenjena je u fazi optimizacije NIR kalibracijskog modela na temelju srednje vrijednosti iskorištenja (engl. *average recovery*) od 98,5 % (Slika 30.). Međutim, srednja vrijednost iskorištenja od 101,2 % dobivena statističkom obradom rezultata NIR predikcije udjela vode (%) u uzorcima SAM eksternog test seta procjena je ukupne proporcionalne pogreške NIR analitičkog sustava koja obuhvaća i pogrešku referentne Karl-Fischer metode (Slika 35.).
Vrijednost odsječka od 0,03 % procjena je konstantne pogreške NIR kalibracijskog modela prema Karl-Fischer referentnoj metodi (Slika 30.). Ova procjena konstantne pogreške ne uključuje konstantnu pogrešku referentne metode. Budući da konstantna pogreška nije ovisna o koncentraciji analita, u ovom slučaju udjelu ostatne vode (%), može se pretpostaviti da je povezana s korekcijom konstantne pogreške referentne Karl Fischer volumetrijske metode odnosno titracijom slijepe probe. Vrijednost slijepe probe titracije (engl. *blank*) referentne Karl-Fischer volumetrijske metode koja obuhvaća konstantnu pogrešku od priprave uzorka do završetka volumetrijske titracije, ispod je granice detekcije Karl Fischer volumetrijske metode (poglavlje 4.2). Temeljem poznate vrijednosti granice detekcije, procijenjena je maksimalna teoretski moguća vrijednost konstantne pogreške koja se iz referentne vrijednosti ugrađuje u NIR kalibracijski model. Shodno tome, granica detekcije od 25 μg vode odgovara konstantnoj pogrešci od 0,03 %.

Shematski prikaz utjecaja proporcionalnih i konstantnih pogrešaka kako referentne Karl-Fischer volumetrijske metode tako i NIR kalibracijskog modela na proporcionalnu i konstantnu pogrešku NIR analitičkog sustava prikazan je na slici 39.



Slika 39. Shematski prikaz proporcionalne i konstantne pogreške NIR analitičkog sustava

Analizom sustavnih pogrešaka objedinjen je konceptualan pristup validaciji nove NIR spektroskopijske metode za određivanje udjela ostatne vode (%) u cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C izveden iz hipoteza prema specifičnoj primjeni.

4.4. Razvoj i validacija novih NIR metoda za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A i C

4.4.1. Razvoj i validacija nove NIR metode za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A

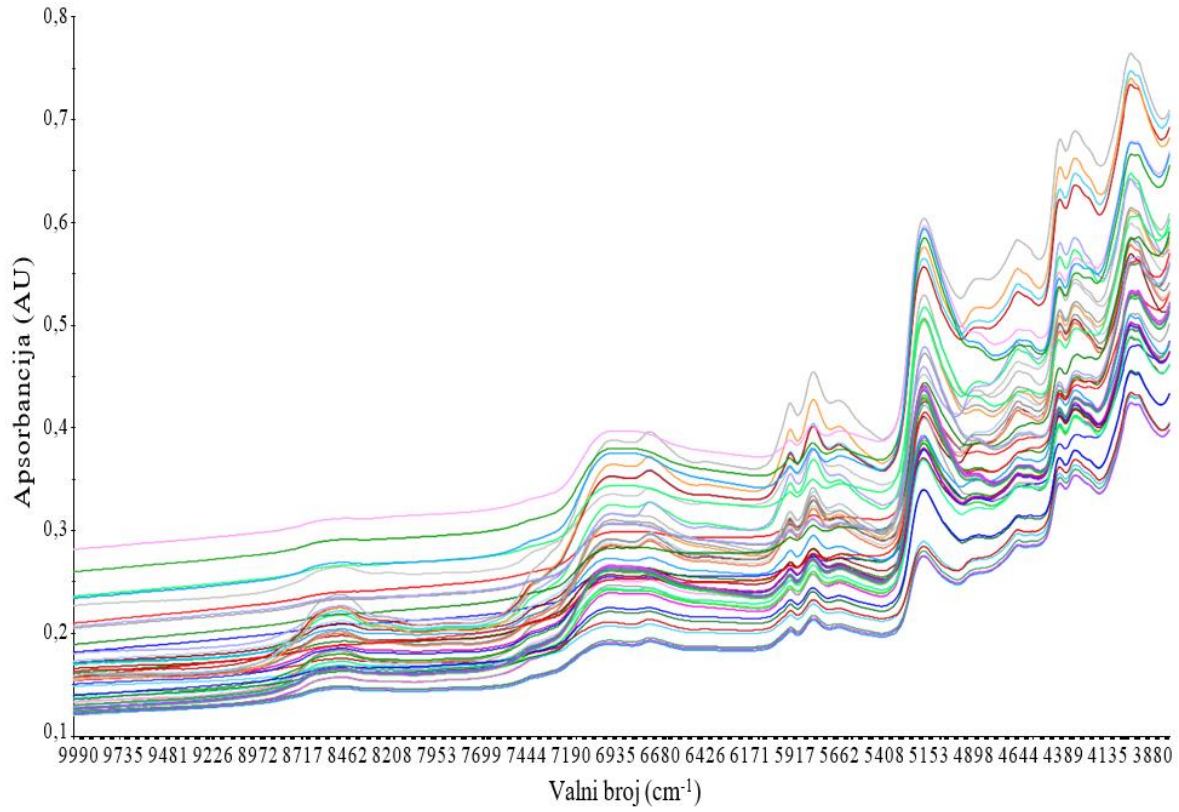
4.4.1.1. Formiranje podgrupa uzoraka

Varijabilnost fizikalnih i kemijskih svojstava pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A proizlazi iz složenosti biotehnološkog procesa proizvodnje koji uključuje kultivaciju bakterijskih stanica te pročišćavanje polisaharida u svrhu uklanjanja proteina, nukleinskih kiselina te lipopolisaharida. Shodno tome, proces podliježe velikom broju izvora varijabilnosti koje vrlo često nije moguće detektirati niti analizirati izdvojeno od ostalih faktora. Stoga je u fazi razvoja i optimizacije nove NIR spektroskopijske metode za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisahardima serogrupe A korišten relativno velik broj serija ove djelatne tvari (n = 72) kako bi se obuhvatila varijabilnost reprezentativna za ukupnu populaciju, kako je to detaljno opisano u poglavlju 3.2.2.2. Time je ostvaren preduvjet za poboljšanu sposobnost predikcije udjela vode (%) u budućim proizvodnim serijama ove djelatne tvari.

Validacijski test set formiran je iz dvadeset testnih uzorka (A53-A72), koji odgovaraju pripadnim konsekutivnim serijama pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (n = 20) kako je to opisano u poglavlju 3.2.2.2. Naime, validacijski test set formiran je iz posljednje proizvedenih serija ove djelatne tvari zbog procjene izvedbenih karakteristika NIR kalibracijskog multivarijatnog modela u rutinskoj primjeni u budućnosti. Ostali testni uzorci ove djelatne tvari (A1-A52) predstavljaju po jednu preostalu seriju pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (n = 52), te formiraju podgrupu testnih uzoraka unutar koje je izvršena raspodjela na kalibracijski test set i optimizacijski test set primjenom matematičkog algoritma.

4.4.1.2. Snimanje NIR spektara

Snimanje NIR spektara uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A detaljno je opisano u poglavlju 3.2.2.2. Snimljeni NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz podgrupe test uzoraka (A1-A52) u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 10000 cm^{-1} do 3800 cm^{-1}, prikazani su na slici 40.



Slika 40. NIR spektri uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta (A1-A52) snimljeni tehnikom difuzne refleksije u spektralnom području 10000–3800 cm^{-1}.

U spektralnom području 10000-8000 cm^{-1} nisu zapažene značajne NIR vrpce, te su analizirane spektralne informacije u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 8000 cm^{-1} do 3800 cm^{-1}. Vidljivi pomaci (engl. *offsets*) u ovim NIR spektrima dobivenim difuznom refleksijom, moguća su posljedica varijacija u veličini čestica, obliku čestica, gustoći pakiranja (engl. *packing density*), površini čestica te optičkih aberacija prozirnih staklenih penicilinskih bočica.

U ovim NIR spektrima vidljive su spektralne vrpce specifične za vibracijska gibanja molekule vode, spektralne vrpce kombinacije, O-H istezanja i H-O-H savijanja pri približno 5300 cm^{-1} - 5100 cm^{-1}, te spektralne informacije koje odgovaraju prvim višim tonovi O-H istezanja pri približno 7100– 6800 cm^{-1}.

Snimljeni su i NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz validacijskog test seta (A53-A72) u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 10000 cm^{-1} do 3800 cm^{-1}.

4.4.1.3. Određivanje referentnih vrijednosti udjela vode

Nakon snimanja NIR spektara test uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz podgrupe (A1-A52) i validacijskog test seta (A53-A72), određene su pripadne referentne vrijednosti udjela vode (%) Karl-Fischer volumetrijskom metodom, kako je to opisano u poglavlju 3.2.1.3. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima ove djelatne tvari (A1-A72) prikazane su u tablici 29.

Tablica 29. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A određene Karl-Fischer volumetrijskom metodom

Testni uzorak	Udjel vode (%)	Testni uzorak	Udjel vode (%)	Testni uzorak	Udjel vode (%)
A1	7,2	A25	5,8	A49	10,8
A2	11,8	A26	12,7	A50	13,7
A3	15,8	A27	13,2	A51	13
A4	8,1	A28	6,1	A52	10,3
A5	11,1	A29	12,1	A53	17,3
A6	15,4	A30	15,7	A54	16,9
A7	9	A31	6,4	A55	14,5
A8	14,9	A32	6,9	A56	14,4
A9	12,7	A33	16	A57	14,3
A10	12	A34	5,7	A58	12,1
A11	14,9	A35	7,6	A59	12,2
A12	12,5	A36	16,4	A60	13,1
A13	12,3	A37	11	A61	13,6
A14	12,9	A38	13,5	A62	13,4
A15	13,9	A39	13,4	A63	13,4
A16	12,6	A40	10,2	A64	13,7
A17	11,6	A41	13,6	A65	12,9
A18	14,4	A42	9,8	A66	13,2
A19	11,6	A43	10,9	A67	13,4
A20	11,1	A44	13,3	A68	12,7
A21	12,7	A45	13,5	A69	12,8
A22	6,1	A46	10,9	A70	14,3
A23	12,3	A47	13,4	A71	14,1
A24	13	A48	13,7	A72	14,4

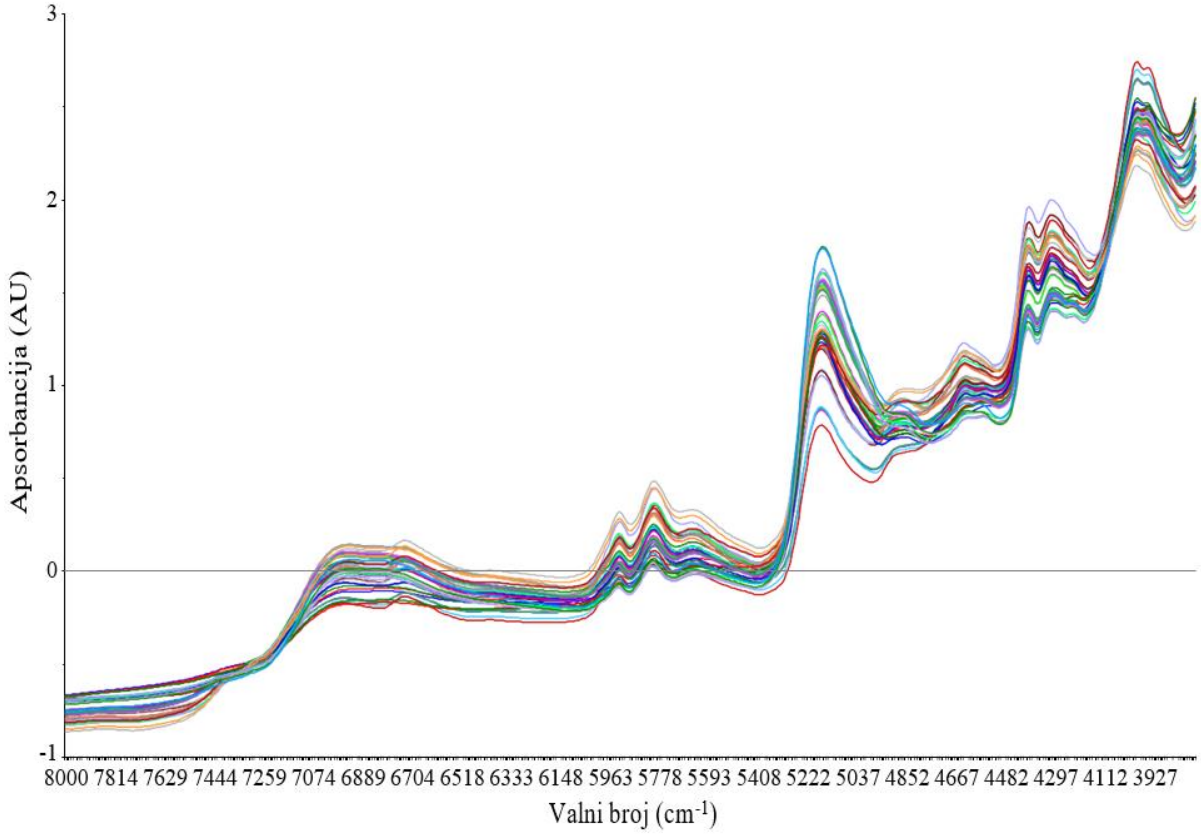
Raspon referentnih vrijednosti udjela vode (%) u test uzorcima podgrupe iz koje će se naknadno formirati kalibracijski set i optimizacijski test set (A1-A52) iznosio je od 5,3 % do 19,2 %. Raspon referentnih referentnih vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima validacijskog test seta (A53-A72) iznosio je od 12,6 % do 16,9 %.

Time je ispunjen preduvjet za formiranje NIR multivarijatnog kalibracijskog modela za određivanje udjela vode (%) u ovoj djelatnoj tvari koji se odnosi na minimalan raspon koncentracije ciljnog analita, definiran umnoškom procijenjene reproducibilnosti referentne metode i faktora ±5 (Pasquini, 2003). Reproducibilnost Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A procijenjena je na s_R = 0,3 % (poglavlje 3.2.1.3.), te je u ovom slučaju raspon koji obuhvaća dobivene referentne vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima kalibracijskog seta veći od utvrđenog minimalnog raspona za formiranje NIR multivarijatnog modela od 3,0 %.

Radno područje Karl-Fischer volumetrijske metode za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A odgovara optimalnim izvedbenim karakteristikama ove apsolutne analitičke metode (poglavlje 2.1.), te je mjerna nesigurnost referentnih vrijednosti za udjel vode (%) aproksimirana na vrijednost nula.

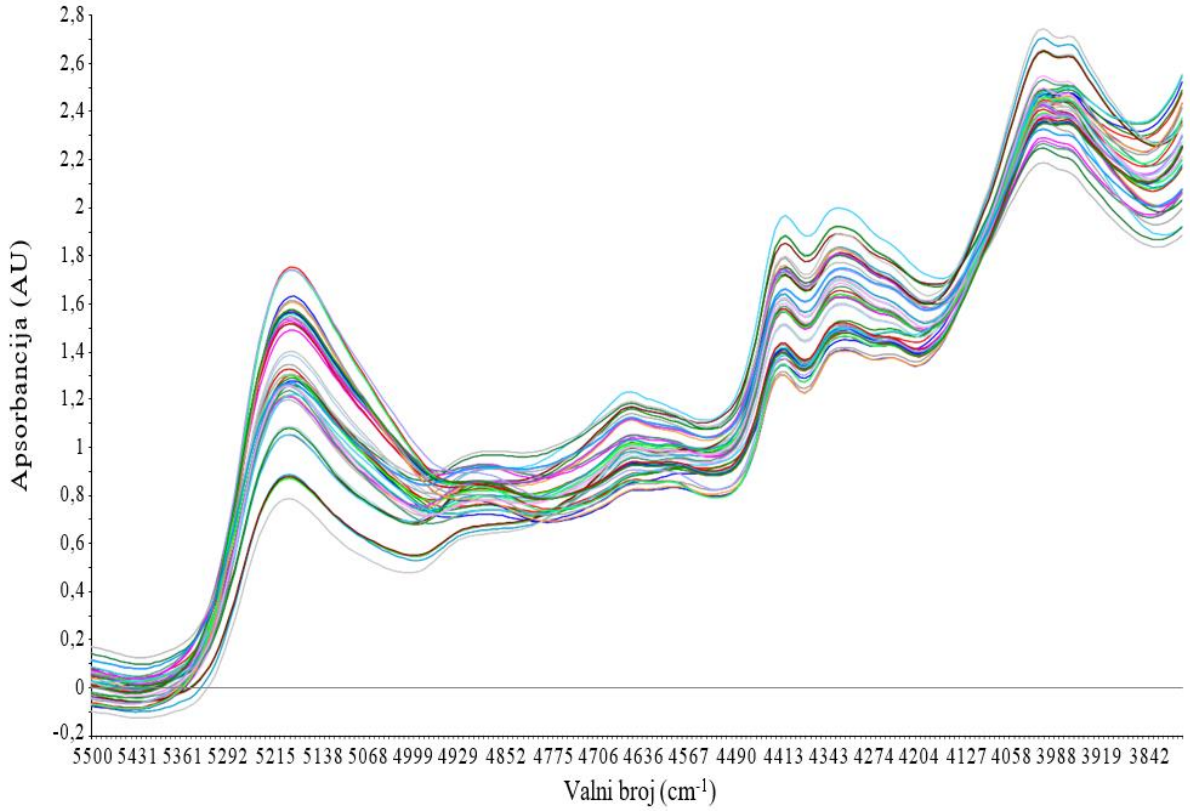
4.4.1.4. Matematička transformacija i selekcija varijabli NIR spektra

Prikladnim postupcima matematičke obrade umanjen je doprinos neželjenih varijacija signala u spektrima testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (A1-A52), slučajnih i sustavnih. Provedena je matematička transformacija ovih spektara primjenom SNV matematičkog algoritma za korekciju raspršenja (poglavlje 2.2.6.2). Na slici 41 prikazani su SNV transformirani NIR spektri podgrupe testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (A1-A52) u spektralnom području od 8000-3800 cm^{-1}.



Slika 41. Matematički obrađeni (SNV) NIR spektri pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (A1-A52) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području 8000–3800 cm^{-1}.

U svrhu formiranja NIR multivarijatnog kalibracijskog modela selektirane su spektralne varijable u području u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 5500 cm^{-1} do 3800 cm^{-1} zbog dobre razlučenosti od apsorpcijskih vrpca drugih kemijskih grupa pročišćenog polisaharida serogrupe A, te bolje korelacije između NIR spektralnih varijabli i udjela vode (%), kako je to detaljno opisano u poglavlju 4.3.1.4. Na slici 42 prikazani su SNV transformirani NIR spektri ove djelatne tvari (A1-A52) u odabranom spektralnom području 5500-3800 cm^{-1}.



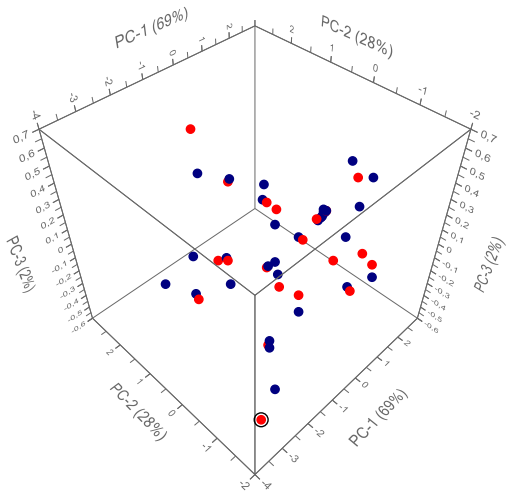
Slika 42. Matematički obrađeni (SNV) NIR spektri pročišćenih meningokoknih polisaharida grupe A (A1-A52) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području 5500–3800 cm^{-1}.

Selekcijom spektralnih varijabli na temelju interpretativne spektroskopije omogućeno je formiranje jednostavnijeg regresijskog modela s relativno manjim brojem PLS faktora.

4.4.1.5. Formiranje kalibracijskog seta i optimizacijskog test set

U svrhu raspodjele testnih uzoraka podgrupe pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (A1-A52) na kalibracijski set i optimizacijski test set korišten je Duplex algoritam, koji predstavlja modifikaciju Kennard-Stone algoritma, kako je to detaljno opisano u poglavlju 2.2.6.1.

Cilj je bio uspostaviti reprezentativan kako kalibracijski set tako i optimizacijski test set, kroz usporedivu različitost oba seta te uniformno rasprostiranje u prostoru dizajna. Kalibracijski set je obuhvatio fizikalne i kemijske varijabilnosti proizvodnog procesa kroz 32 testna uzorka iz podgrupe pročišćenog polisaharida serogrupe A, koji predstavljaju 32 proizvodne serije ove djelatne tvari. Optimizacijski test set obuhvatio je 20 testnih uzoraka iz iste podgrupe koji odražavaju varijabilnost drugih 20 proizvodnih serija ove djelatne tvari, koje nisu sudjelovale u kalibraciji. Raspodjela uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta prema Duplex algoritmu prikazana je na slici 43.



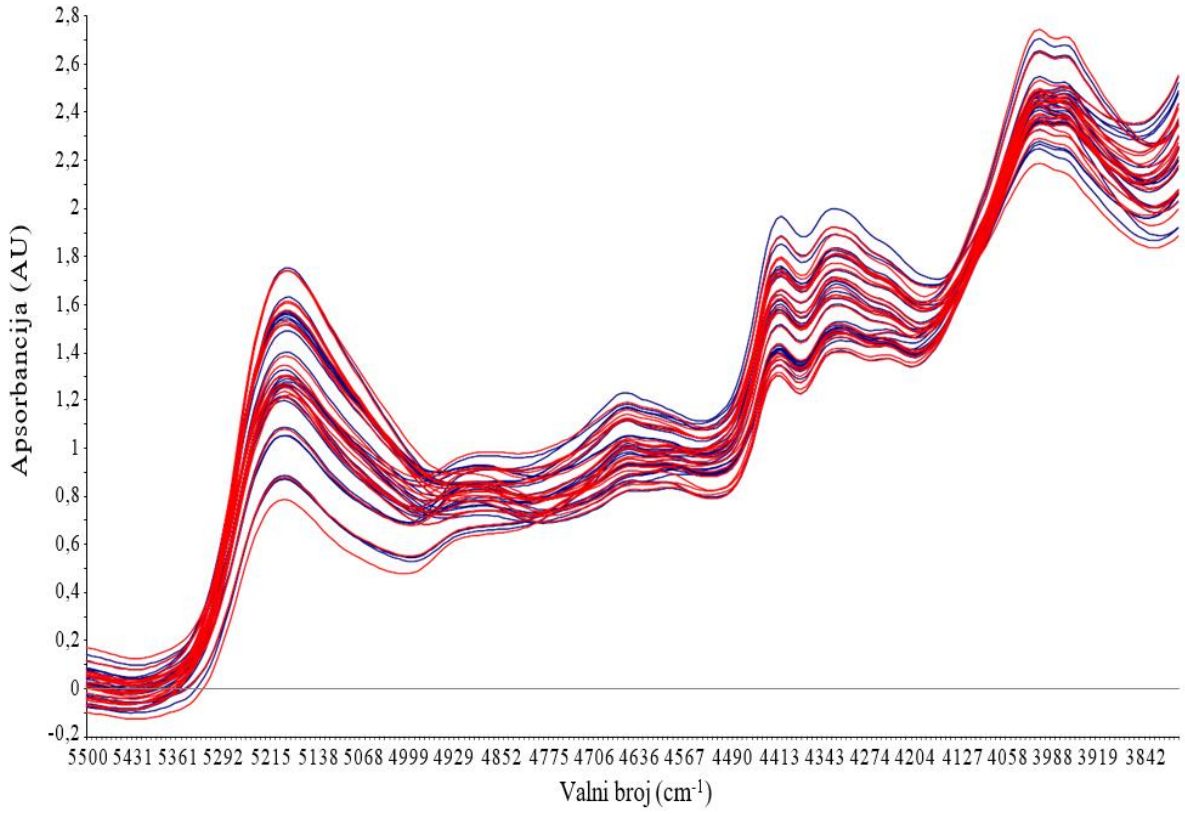
Slika 43. Raspodjela faktorskih bodova PC1, PC2 i PC3, SNV transformiranih NIR spektara u spektralnom području 5500–3800 cm^{-1}, testnih uzoraka kalibracijskog seta (plavi) i optimizacijskog test seta (crveni).

Vidljiva je ravnomjerna raspodjela uzoraka i usporedivo grupiranje testnih uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta (Slika 43.).

Grafički prikaz raspodjele faktorskih bodova ukazuje da prema vrijednostima faktorskih bodova jedan uzorak pridružen optimizacijskom test setu (A34) potencijalno odstupa značajno različitim vrijednostima od ostale populacije (engl. *outlier*). Nadalje, testni uzorak (A34) kojem odgovara relativno niska referentna vrijednost udjela vode (5,7%) udaljen je od izvora te blizu skupini drugih testnih uzoraka s relativno niskom referentnom vrijednosti udjela vode (%), pa

se može zaključiti da imaju sličan odgovor obzirom na 99% varijaciju koju objašnjavaju prva tri PC faktora. Shodno tome, vjerojatnije je da ovaj testni uzorak (A34) pročišćenog meningokoknog polisaharida serogrupe A predstavlja podzastupljene uzorke, koje su rijetki ali svojstveni procesu proizvodnje ove djelatne tvari. Budući da nema osnova za verifikaciju značajnosti različite vrijednosti ovog testnog uzorka optimizacijskog testa seta (A-34) obzirom na ciljni analit, uzorak nije izuzet iz optimizacijskog test seta.

SNV transformirani NIR spektri testnih uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A u području valnog broja broja ($\tilde{\nu}$) od 5500 cm^{-1} do 3800 cm^{-1} prikazani su na slici 44.



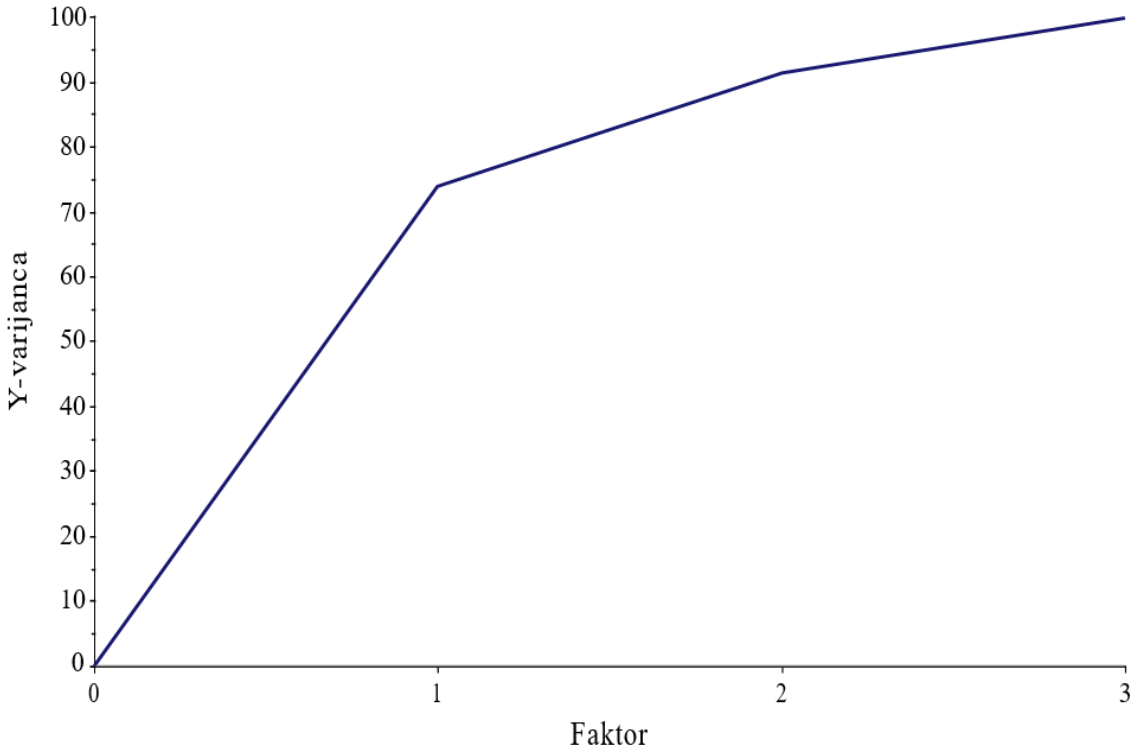
Slika 44. SNV transformirani NIR spektri pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz kalibracijskog seta (označeno plavom linijom) i optimizacijskog test seta (označeno crvenom linijom) u spektralnom području 5500–3800 cm^{-1}.

4.4.1.6. Multivarijatna regresija

Za izradu NIR multivarijatnog kalibracijskog modela za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A korišteni su SNV transformirani NIR spektri uzoraka iz kalibracijskog seta i to u spektralnom rasponu 5500 - 3800 cm^{-1}. Kalibracijski set čine 32 testna uzorka reprezentativna za 32 serije ove djelatne tvari, s pripadnim rasponom referentnih vrijednosti udjela vode od 5,8 % do 16,0 % (Tablica 29.).

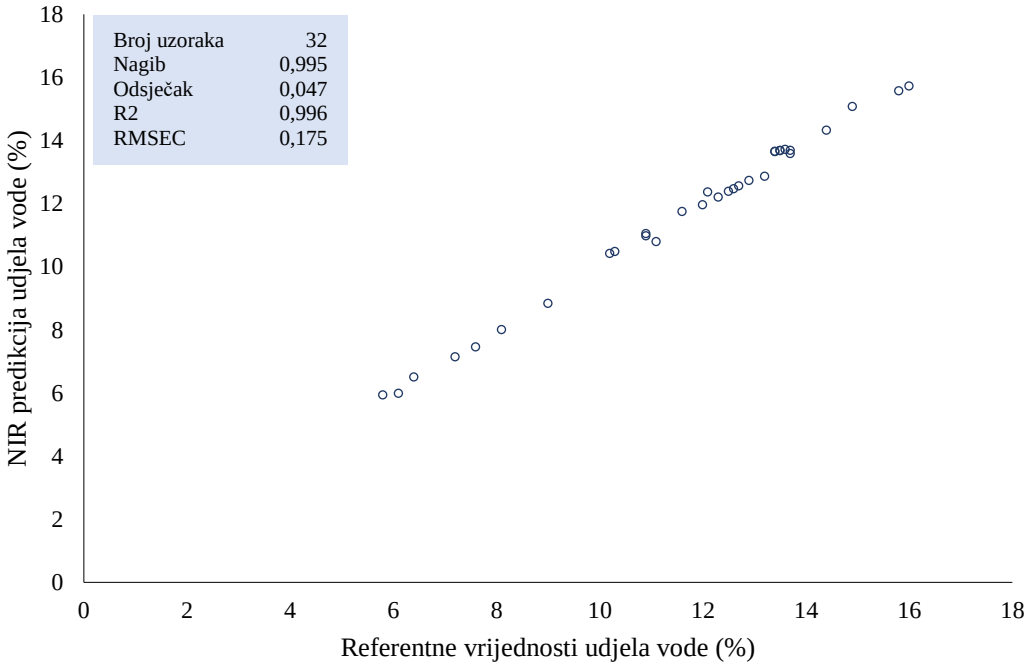
U svrhu formiranja NIR multivarijatnog kalibracijskog modela korištena je metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS), koja je detaljno opisana u 2.2.6.3. Ishodno je formiran NIR kalibracijski multivarijatan model s tri PLS faktora radi provjere izvedbenih karakteristika modela. Naime, NIR kalibracijski model s većim brojem PLS faktora inicijalno je odabran zbog očekivanog utjecaja složenog i varijabilnog matriksa neinformativnih varijabli na ukupnu spektralnu varijabilnost, koji je svojstven djelatnim tvarima dobivenim biotehnološkim postupcima proizvodnje.

Tri PLS faktora objašnjavaju 99,6 % ukupne varijacije (Slika 45.).



Slika 45. Varijacija objašnjena PLS faktorima (faktor 1, faktor 2, faktor 3).

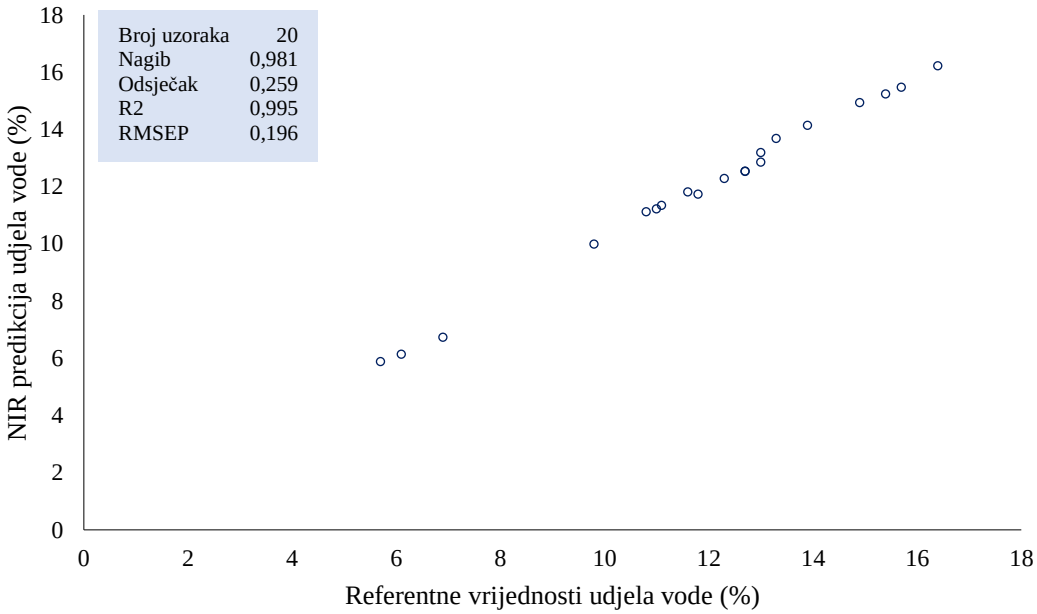
Korelacija između NIR spektralnih podataka i referentnih vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz kalibracijskog seta, za multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora prikazana je na slici 46.



Slika 46. Korelacija dobivenih NIR vrijednosti i referentnih vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz kalibracijskog seta za NIR multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora (5500–3800 cm^{-1}).

Koeficijent određivanja (R^2 = 1,00) ukazuje na visoku korelaciju između ovih dviju metoda - NIR spektroskopijske metode i Karl-Fischer volumetrijske metode. Vrijednost nagiba regresijskog pravca od 1,00 (Slika 46.) ukazuje da nema značajne proporcionalne pogreške NIR kalibracijskog modela u odnosu na referentne vrijednosti udjela vode (%) dobivene Karl-Fischer volumetrijskom metodom. Iz vrijednosti odsječka na osi ordinata od 0,05 % (Slika 46.) može se zaključiti da nema značajne konstantne pogreške u uspostavljenom multivarijatnom kalibracijskom NIR modelu s tri PLS faktora u odnosu na Karl-Fischer volumetrijsku metodu. Za ovaj NIR kalibracijski model s tri PLS faktora dobivena je vrijednost RMSEC od 0,18 %.

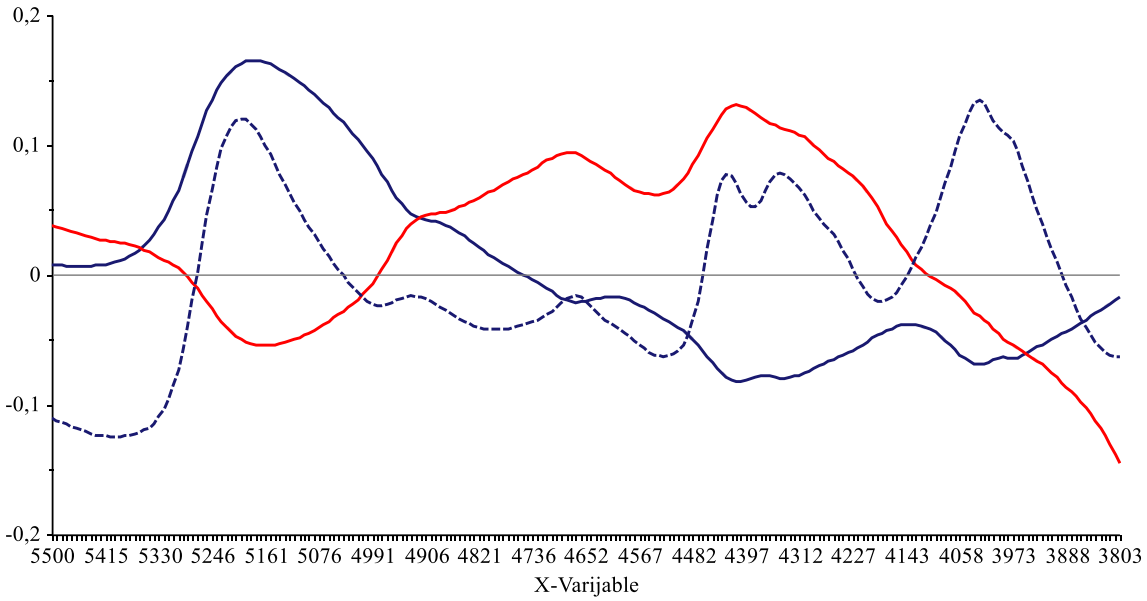
U sljedećem koraku uspostave NIR predikcijskog modela analizirana je optimalna dimenzionalnost, odnosno odabir broja PLS komponenti koji će konstituirati NIR multivarijatan model. Sposobnost predikcije formiranog NIR multivarijatnog kalibracijskog modela procijenjena je na testnim uzorcima optimizacijskog test seta, tj. nezavisnim uzorcima koji nisu korišteni u formiranju NIR kalibracijskog modela, a istovremeno su reprezentativni za populaciju proizvodnih serija pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (Slika 47.).



Slika 47. Korelacija NIR predikcija i referentnih vrijednosti udjela ostatne vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz optimizacijskog test seta za NIR multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora (5500–3800 cm^{-1}).

Kemometrijski parametri ukazuju na visoku korelaciju između rezultata za udjel vode (%) u testnim uzorcima optimizacijskog test seta dobivenih predikcijom s novim NIR kalibracijskim modelom s 3 PLS faktora i pripadnih referentnih vrijednosti dobivenih Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Slika 47.). Vrijednosti RMSEC i RMSEP su usporedive i iznose redom 0,18 % i 0,20 %, što ukazuje na robusnost formiranog NIR multivarijatnog modela.
Naknadno je formiran i NIR multivarijatan kalibracijski model s dva PLS faktora. Za NIR kalibracijski model s dva PLS faktora dobivena je vrijednost RMSEC od 0,81 %.

Nadalje, optimalan odabir NIR multivarijatnog modela s 3 PLS faktora potvrđen je analizom profila opterećenja. Profil opterećenja ukazuje da faktor 3 pridonosi kvaliteti predikcije ciljnog parametra, udjela vode (%) (Slika 48.).



Slika 48. Profil opterećenja (engl. *loadings*) za faktor 1 (označeno punom plavom linijom), faktor 2 (označeno punom crvenom linijom) i faktor 3 (označeno isprekidanom plavom linijom).

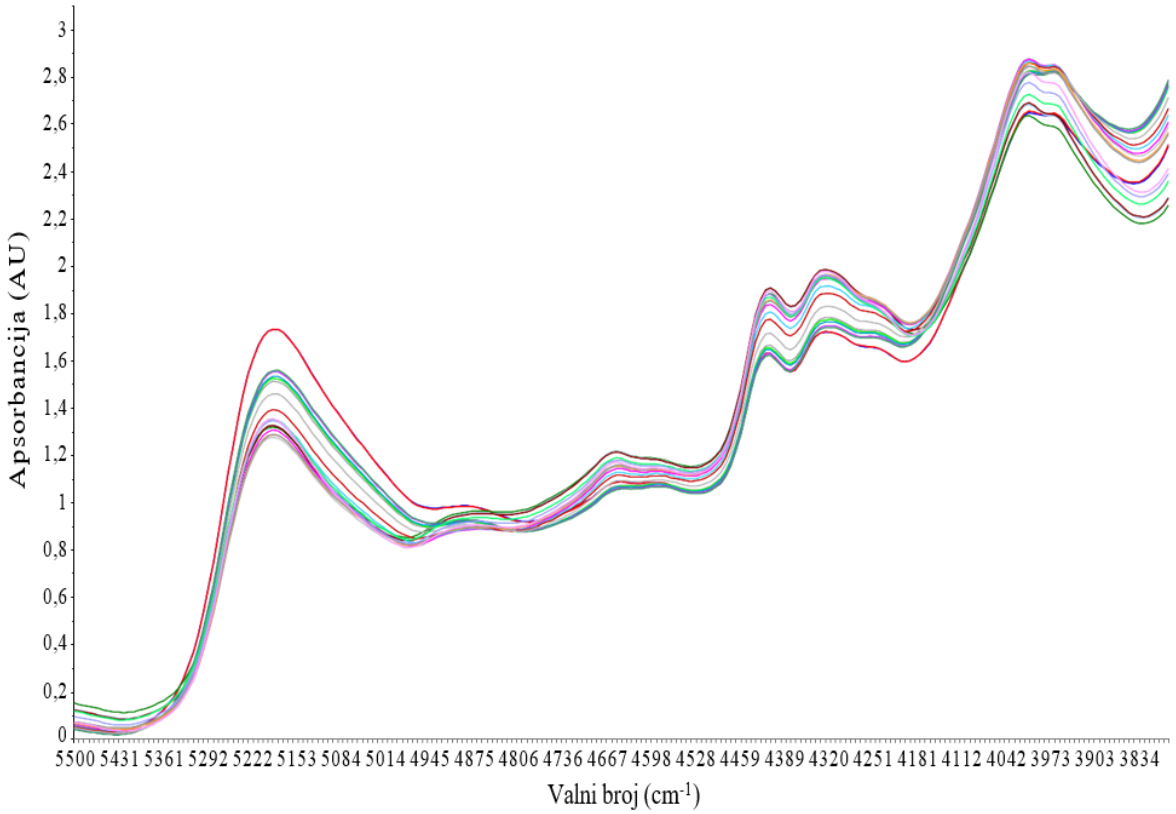
Upravo povezanost opterećenja za faktor 3 s spektralnim podacima releventnim za ciljni analit, opravdava ugradnju trećeg PLS faktora u NIR multivarijatan model.

4.4.1.7. Validacija NIR kalibracijskog modela

Validacija NIR kalibracijskog multivarijatnog modela s 3 PLS faktora provedena je na nezavisnim test uzorcima validacijskog test seta (A53-A72), koji nisu sudjelovali ni u formiranju niti u optimizaciji NIR multivarijatnog kalibracijskog modela. Validacijski test set reprezentativan je za populaciju budućih proizvodnih serija ove djelatne tvari, te obuhvaća varijabilnost 20 konsekutivnih proizvodnih serija pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A, kako je opisano u poglavlju 4.4.1.1.

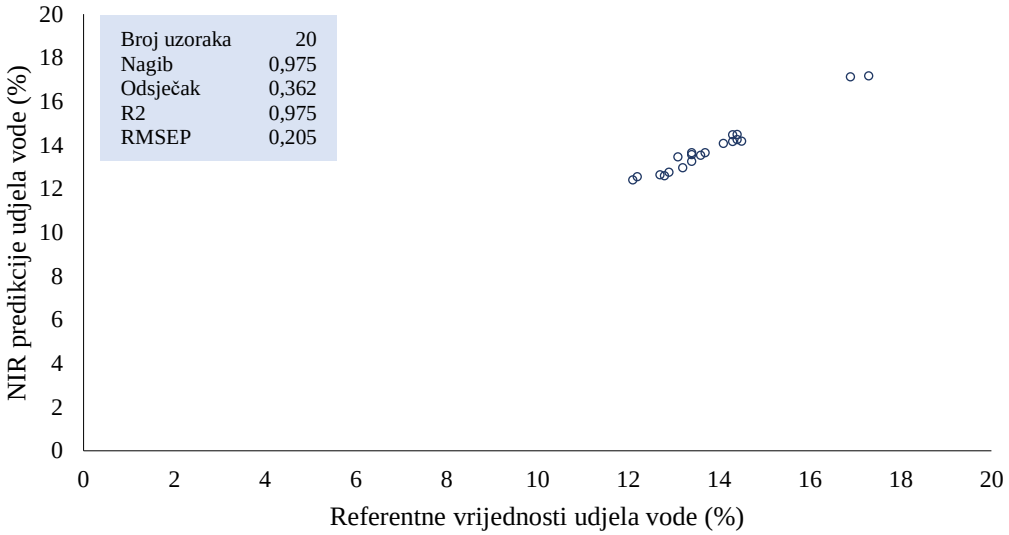
Referentne vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima validacijskog test seta određene su Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Tablica 29.). Referentni udjeli vode (%) u ovim testnim uzorcima koji su reprezentativni za 20 posljednje proizvedenih serija pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A kreću se u relativno uskom rasponu od 12,1 % do 17,3 % koji odgovara gornjem dijelu raspona NIR multivarijatnog kalibracijskog modela.

Provedena je matematička transformacija ovih spektara, primjenom SNV matematičkog algoritma, vidi sliku 49.



Slika 49. Matematički obrađeni (SNV) NIR spektri pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (A53-A72) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području 55000–3800 cm^{-1}.

Procijenjena je sposobnost predikcije formiranog NIR multivarijatnog kalibracijskog modela s tri PLS faktora na testnim uzorcima validacijskog test seta (Slika 50.).



Slika 50. Korelacije NIR predikcija i referentnih vrijednosti udjela ostatne vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A iz validacijskog test seta za NIR multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora (5500–3800 cm^{-1}).

Kemometrijski parametri ukazuju na visoku korelaciju između rezultata za udjel vode (%) u testnim uzorcima validacijskog test seta dobivenih predikcijom s novim NIR kalibracijskim modelom s 3 PLS faktora i pripadnih referentnih vrijednosti dobivenih Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Slika 50.). Vrijednost RMSEP dobivena s eksternim validacijskim test setom znatno je realnija procjena sposobnosti predikcije NIR kalibracijskog modela, te iznosi 0,21 %.

Formiran je NIR kalibracijski multivarijatan model s tri PLS faktora za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A kako bi se ugradili svi faktori koji pridonose kvaliteti predikcije ciljnog parametra te istovremeno izbjeglo pretjerano ugođavanje modela kalibracijskim spektralnim varijablama (engl *overfitting*) i dobio jednostavan, robustan model dobrih izvedbenih karakteristika u fazi predikcije ciljnog analita, udjela vode (%).

4.4.2. Razvoj i validacija nove NIR metode za određivanje udjela vode u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C

4.4.2.1. Formiranje podgrupa uzoraka

Složenost biotehnološkog procesa proizvodnje značajan je izvor varijabilnosti fizikalnih i kemijskih svojstava u uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C. Proizvodni postupak za proizvodnju pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C sastoji se od dviju faza, kultivacije bakterijskih stanica te završne faze pročišćavanja polisaharida.

Optimalna veličina uzorka za formiranje NIR multivarijatnog kalibracijskog modela za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C proizlazi i iz kompleksnosti i varijabilnosti ove djelatne tvari. Usprkos suboptimalnoj veličini uzorka, cilj je bio slučajnim odabirom testnih uzorka za formiranje i validaciju NIR multivarijatnog kalibracijskog modela obuhvatiti i nepoznate interferirajuće varijacije.

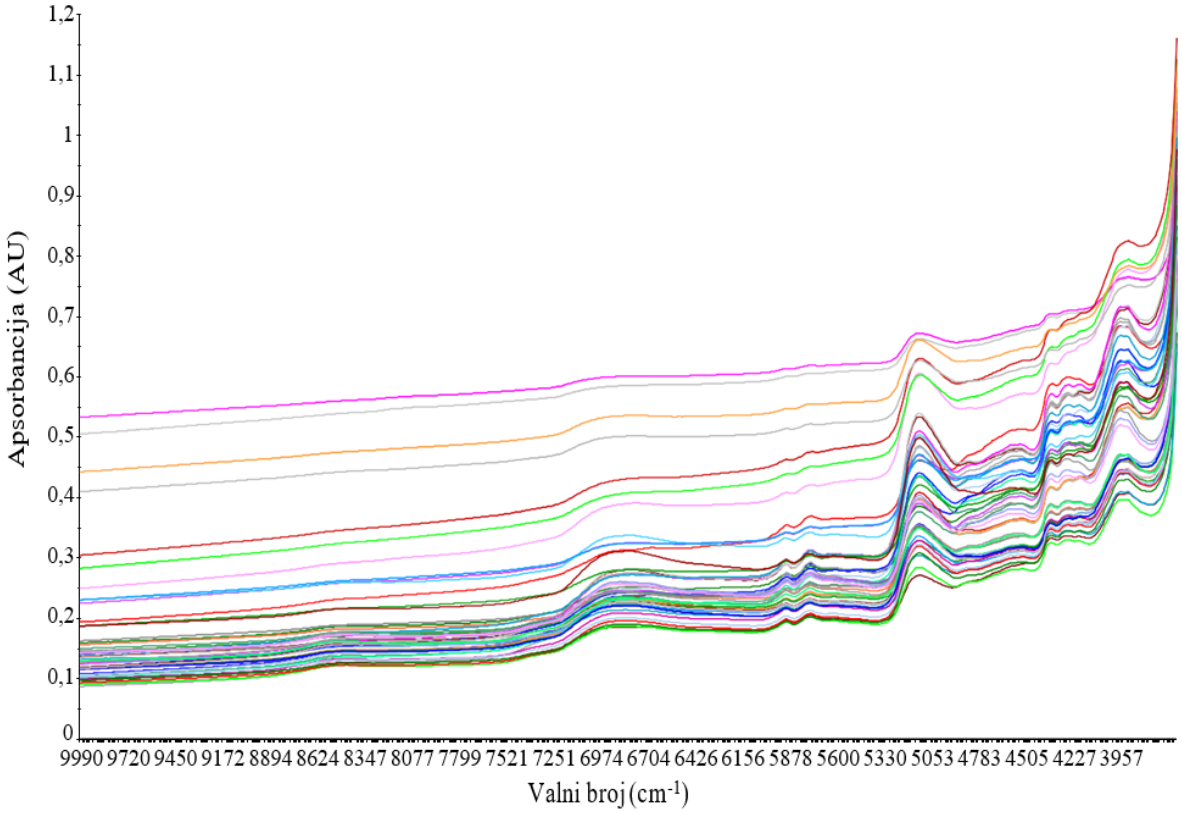
U fazi razvoja i optimizacije nove NIR spektroskopijske metode za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C korišteno je 68 serija ove djelatne tvari kako je to detaljno opisano u poglavlju 3.2.2.2.

Validacijski test set formiran je iz 17 testnih uzorka (C52-C68), koji odgovaraju 17 konsekutivnih serija pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C, kako je to opisano u poglavlju 3.2.2.2.. Naime, validacijski test set formiran je iz 17 posljednje proizvedenih serija ove djelatne tvari zbog procjene izvedbenih karakteristika NIR kalibracijskog multivarijatnog modela u rutinskoj primjeni u budućnosti. Ostali testni uzorci ove djelatne tvari (C1-C51) uzorkovani su iz 51 proizvodne serije pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C te predstavljaju podgrupu unutar koje je izvršena raspodjela uzoraka na kalibracijski test set i optimizacijski test set primjenom Duplex matematičkog algoritma.

4.4.2.2. Snimanje NIR spektara

Snimljeni NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz podgrupe test uzoraka (C1-C51) u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 10000 cm^{-1} do 3800 cm^{-1},

prikazani su na slici 51. Postupak snimanja NIR spektara uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C detaljno je opisan u poglavlju 3.2.2.2.



Slika 51. NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta snimljeni tehnikom difuzne refleksije u spektralnom području 10000–3800 cm^{-1}.

U spektralnom području 10000-8000 cm^{-1} nisu zapažene značajne NIR vrpce, pa je interpretacija spektralnih informacija obuhvatila područje valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 8000 cm^{-1} do 3800 cm^{-1}. Pretpostavka je da su uzrok pomaka (engl. *offsets*) u ovim NIR spektrima snimljenim difuznom refleksijom nekontrolirane fizikalne varijacije u uzorku poput varijacija veličine i oblika čestica, gustoće pakiranja, površine uzorka te optičke aberacije prozirnih staklenih penicilinskih bočica. Izražene su jake apsorpcijske vrpce vode, prije svega kombinacijska vrpca O-H istezanja i H-O-H savijanja pri približno 5300-5100 cm^{-1}, te prvi viši tonovi O-H istezanja pri približno 6800-7100 cm^{-1}

Posebno su snimljeni NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz validacijskog test seta (C52-C68) u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 10000 cm^{-1} do 3800 cm^{-1},

4.4.2.3. Određivanje referentnih vrijednosti udjela vode

Referentne vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C (C1-C68), određene su Karl-Fischer volumetrijskom metodom nakon snimanja NIR spektara, kako je to opisano u poglavlju 3.2.2.2.
Referentne vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima podgrupe ove djelatne tvari (C1-C51) te validacijskog test seta (C52-C68) prikazane su u tablici 30.

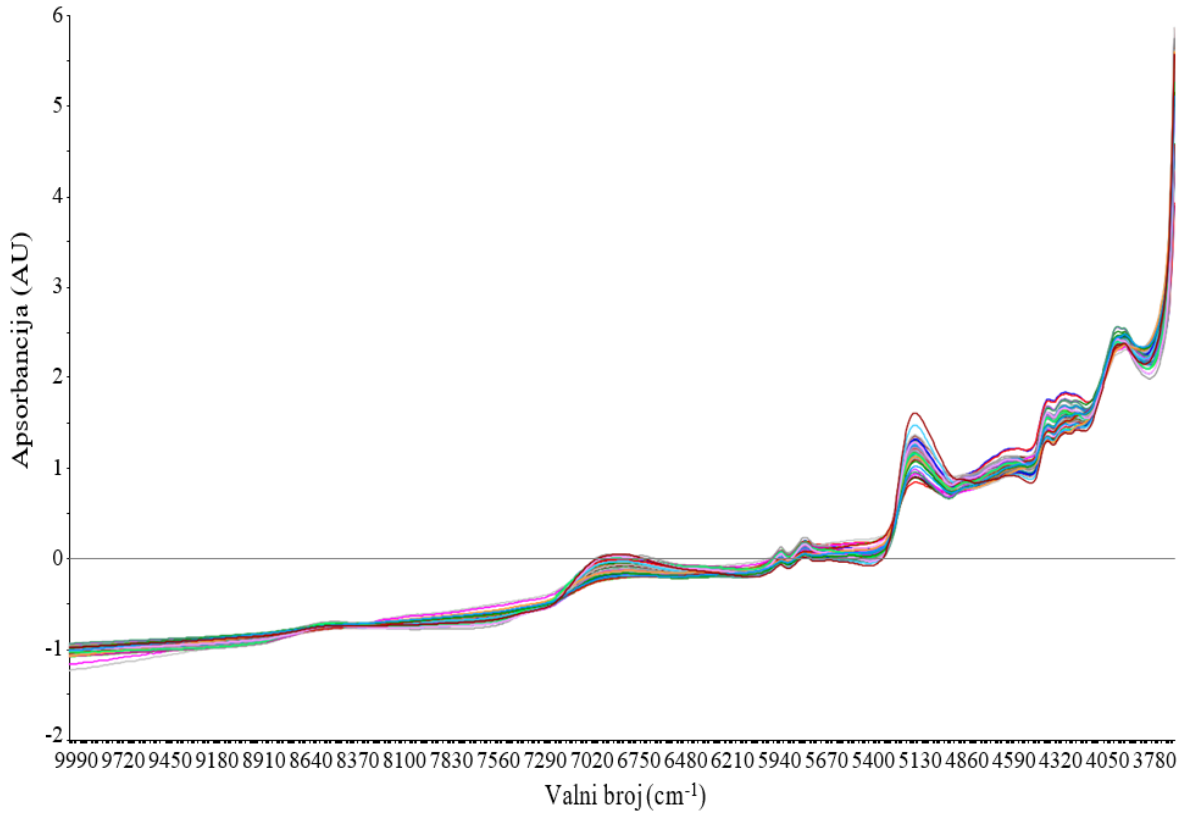
Tablica 30. Referentne vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C određene Karl-Fischer volumetrijskom metodom

Testni uzorak	Udjel vode (%)	Testni uzorak	Udjel vode (%)	Testni uzorak	Udjel vode (%)
C1	8,6	C24	9	C47	10
C2	7,1	C25	8,88	C48	9,8
C3	8,2	C26	9,8	C49	10
C4	8,1	C27	10,6	C50	9,6
C5	9,6	C28	9,5	C51	9,2
C6	9,7	C39	9,4	C52	8,25
C7	9,4	C30	10,4	C53	6,8
C8	10,1	C31	10	C54	10,2
C9	9,5	C32	10,5	C55	8,9
C10	9,5	C33	10,4	C56	9,5
C11	10,1	C34	10,3	C57	9,7
C12	10,4	C35	10,2	C58	10,1
C13	10,2	C36	9,5	C59	10,4
C14	10,4	C37	9,2	C60	10
C15	10,1	C38	8,9	C61	10,1
C16	9,7	C39	7,9	C62	9,0
C17	6,9	C40	10	C63	10,3
C18	8,45	C41	11	C64	8,9
C19	6,3	C42	10,8	C65	8,5
C20	7	C43	10,7	C66	8,8
C21	8,9	C44	10,6	C67	8,9
C22	9,3	C45	10,4	C68	8,6
C23	8,9	C46	10,9		

Raspon referentnih vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima podgrupe pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz koje će se formirati kalibracijski set i optimizacijski test set (C1-C51) iznosio je od 6,3 % do 11,0 %. Nadalje raspon referentnih referentnih vrijednosti udjela vode (%) u uzorcima validacijskog test seta (C52-C68) iznosio je od 6,8 % do 10,4 %.
Navedeni raspon referentnih vrijednosti koncentracije ciljnog analita, udjela vode (%) u testnim uzorcima pročišćenog meningokoknog polisaharida serogrupe C veći je od minimalnog raspona koji iznosi približno 3,0 %, kako je to detaljno opisano u poglavlju 4.4.1.3.
Mjerna nesigurnost referentnih vrijednosti za udjel vode (%) u testnim uzorcima pročišćenog meningokoknog polisaharida serogrupe C određenih Karl-Fischer volumetrijskom metodom aproksimirana je na vrijednost nula, kako je to detaljno opisano u poglavlju 4.4.1.3.

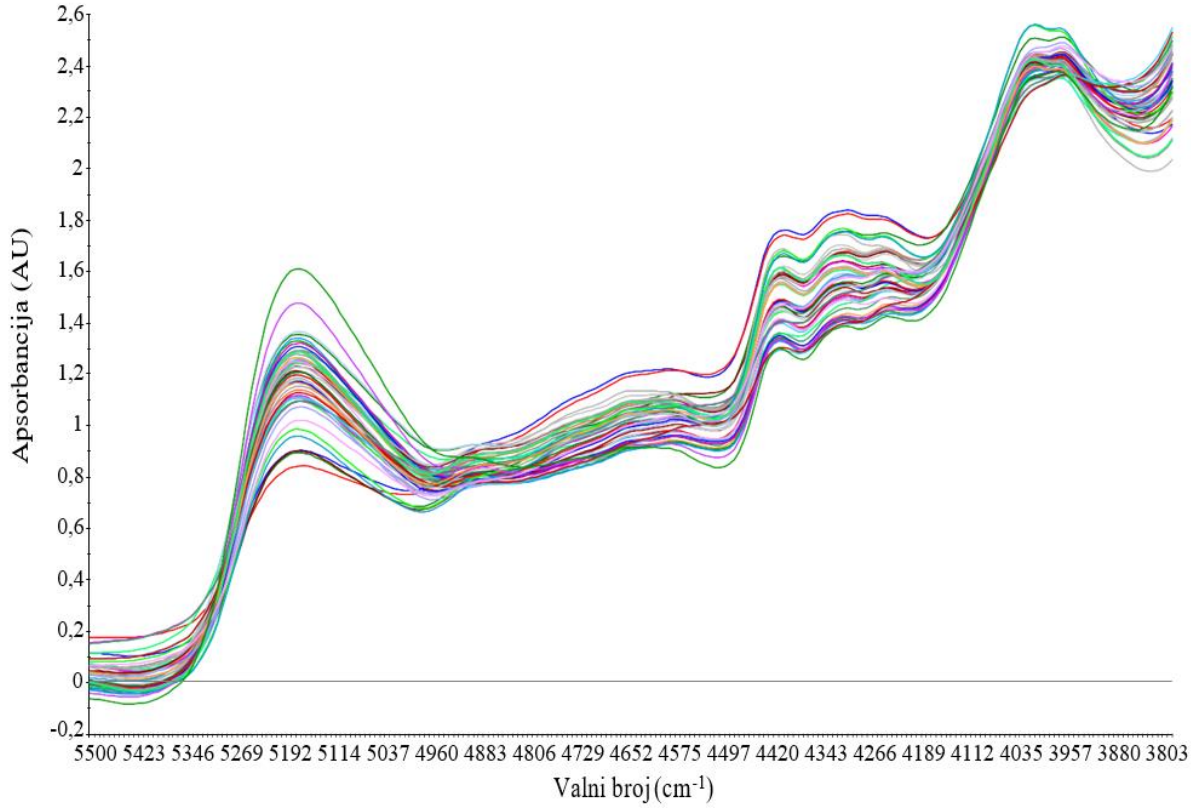
4.4.2.4. Matematička transformacija i selekcija spektralnih varijabli

Provedena je matematička transformacija NIR spektara testnih uzoraka primjenom SNV matematičkog algoritma za korekciju raspršenja (poglavlje 2.2.6.2.). Na slici 52 prikazani su SNV transformirani NIR spektri testnih uzoraka podgrupe pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C (C1-C51) u spektralnom području od 8000 do 3800 cm^{-1}.



Slika 52. Matematički obrađeni (SNV) NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C (C1-C51) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 8000–3800 cm^{-1}.

Selekcija spektralnih varijabli u području NIR spektra 5500-3800 cm^{-1} na temelju interpretativne spektroskopije omogućila je formiranje jednostavnijeg NIR multivarijatnog regresijskog modela s relativno manjim brojem PLS faktora, kako je to detaljno opisano u poglavlju 4.3.1.4. Naime, u spektralnom području 5500-3800 cm^{-1} apsorpcijska vrpca karakteristična za vodu bolje je odvojena od apsorpcijskih vrpca drugih kemijskih grupa pročišćenog polisaharida serogrupe C.
Na slici 53 prikazani su SNV transformirani NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida C (C1-C51) u odabranom spektralnom području 5500-3800 cm^{-1}.



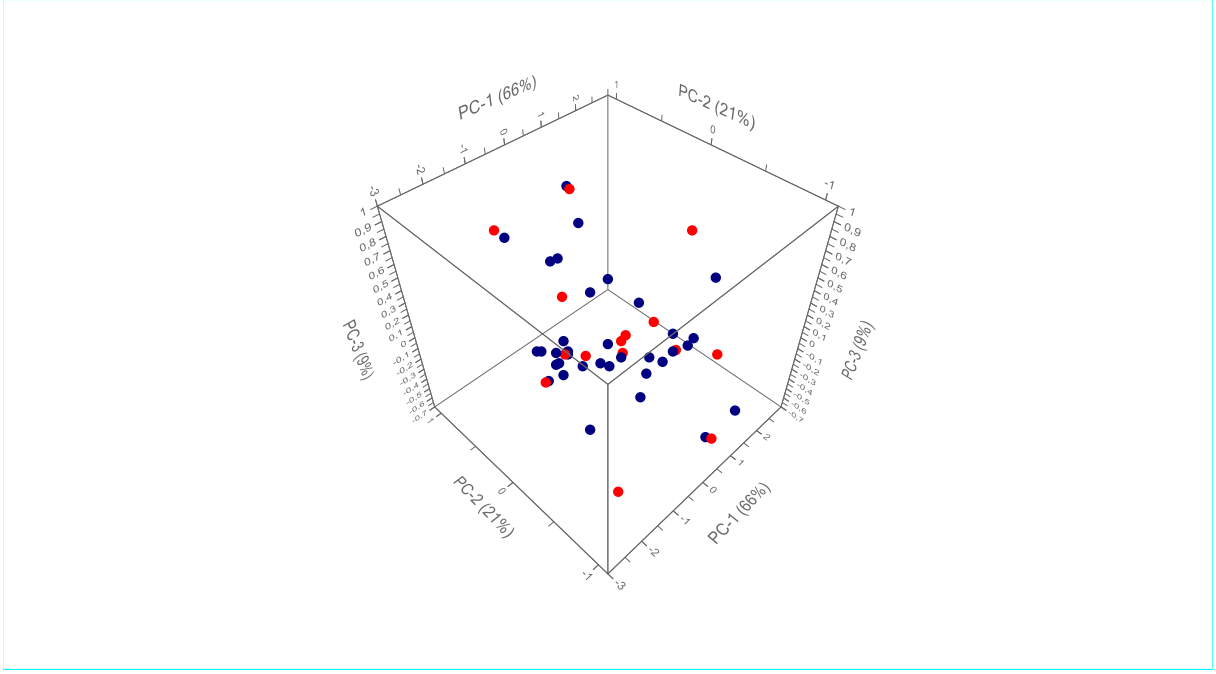
Slika 53. Matematički obrađeni (SNV) NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida grupe C (C1-C51) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u spektralnom području 5500–3800 cm^{-1}.

4.4.2.5. Formiranje kalibracijskog i optimizacijskog test seta

S ciljem što uniformnije raspodjele test uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C u spektralnom multidimenzionalnom prostoru primijenjen je Duplex matematički algoritam. Primjenom ovog kriterija za inteligentnu raspodjelu uzoraka nastojalo se postići da očekivani izvori varijacija budu usporedivo zastupljeni u oba seta, kako je to detaljno opisano u poglavlju 2.2.6.1.

Kalibracijski set je obuhvatio fizikalne i kemijske varijabilnosti 36 proizvodne serije pročišćenog polisaharida serogrupe C kroz 36 pripadni testni uzorak. Optimizacijski test set formiran je iz 15 testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C koji odražavaju varijabilnost drugih 15 proizvodnih serija ove djelatne tvari.

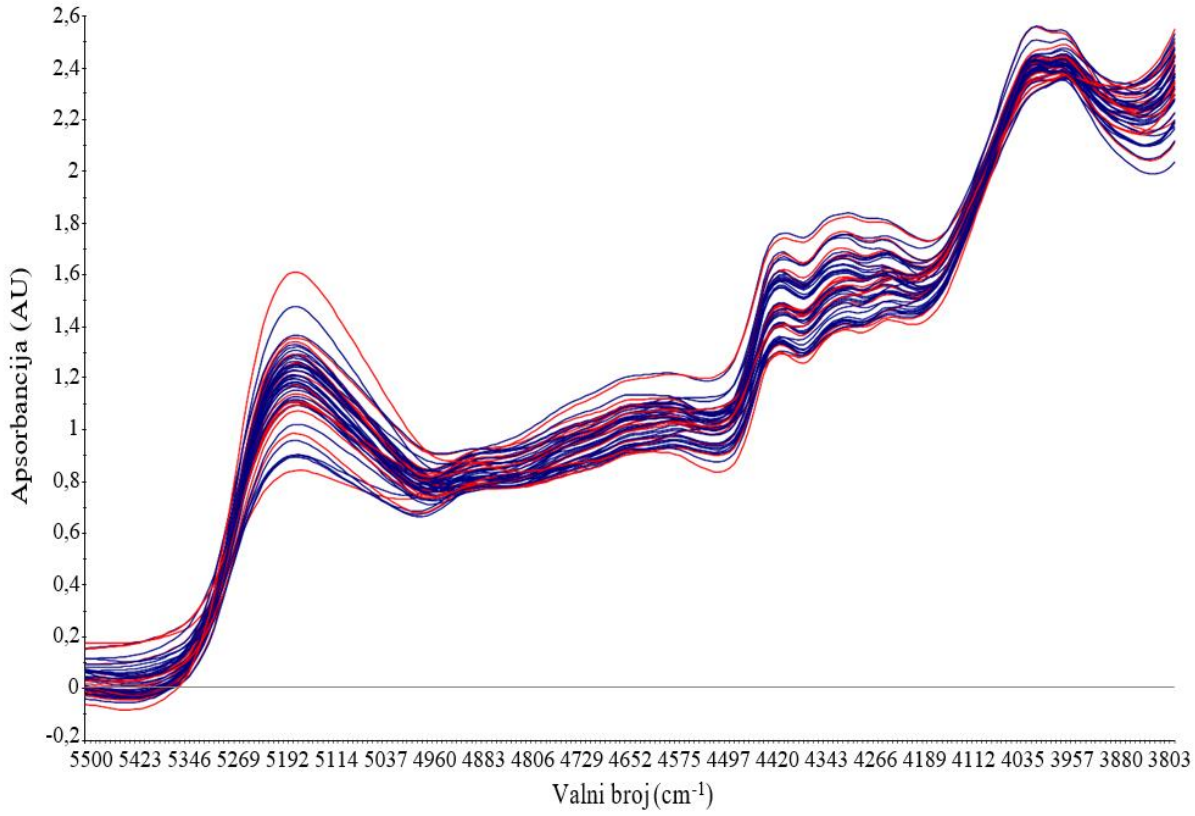
Raspodjela uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta prema Duplex algoritmu prikazana je na slici 54.



Slika 54. Raspodjela faktorskih bodova PC1, PC2 i PC3, SNV transformiranih NIR spektara u spektralnom području 5500–3800 cm^{-1}, testnih uzoraka kalibracijskog seta (plavi) i optimizacijskog test seta (crveni).

Niti jedan testni uzorak kalibracijskog seta niti optimizacijskog test seta nije identificiran kao potencijalan uzorak sa značajno različitim vrijednostima (engl. *outlier*) obzirom na prve tri glavne komponente (PC1, PC2, PC3) (Slika 54.).

SNV transformirani NIR spektri testnih uzoraka kalibracijskog seta i optimizacijskog test seta pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C u području valnog broja valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 5500 cm^{-1} do 3800 cm^{-1} prikazani su na slici 55.



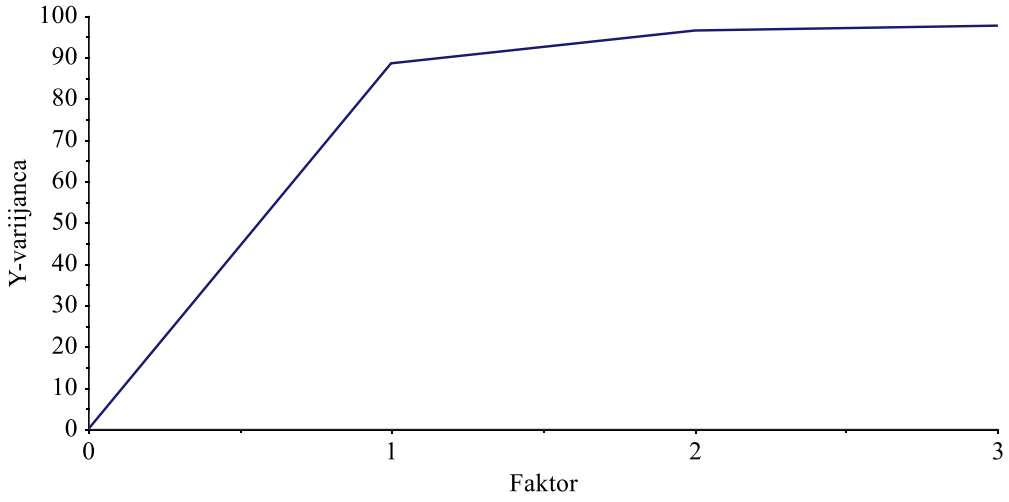
Slika 55. SNV transformirani NIR spektri testnih uzoraka pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz kalibracijskog seta (označeno plavom linijom) i optimizacijskog test seta (označeno crvenom linijom) u spektralnom području 5500–3800 cm^{-1}.

4.4.2.6. Multivarijatna regresija

Za formiranje NIR multivarijatnog kalibracijskog modela za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C korišteni su SNV transformirani NIR spektri testnih uzoraka iz kalibracijskog seta u području valnog broja ($\tilde{\nu}$) od 5500 cm^{-1} do 3800 cm^{-1}. Kalibracijski set čine 36 testni uzorak koji odgovara 36 proizvodne serije pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C s pripadnim rasponom referentnih vrijednosti udjela vode od 6,3 % do 11,0 %.

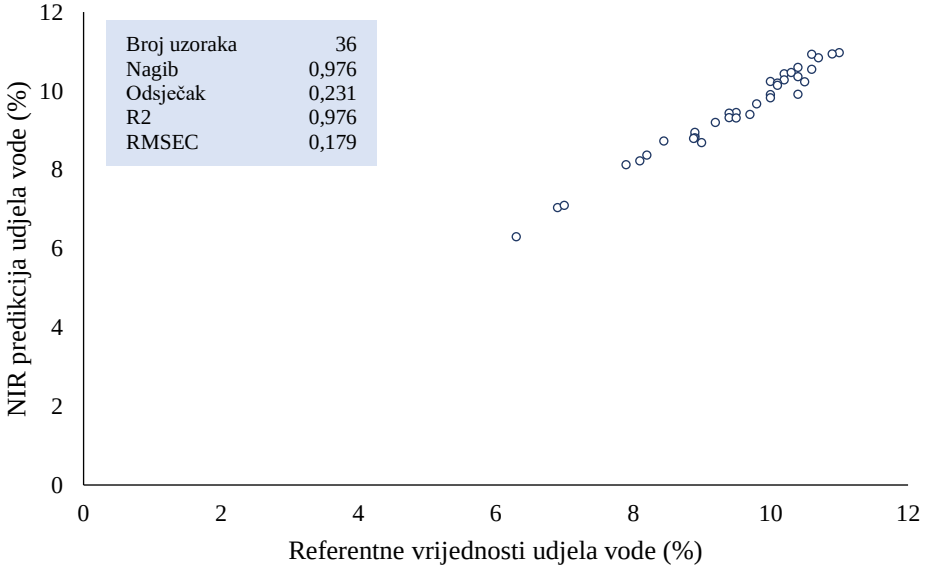
Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) korištena je za formiranje NIR multivarijatnog kalibracijskog modela, kako je detaljno opisano u poglavlju 2.2.6.3. Inicijalno je odabran NIR multivarijatan model s tri PLS faktora za procjenu izvedbenih karakteristika.

Tri PLS faktora zajedno objašnjavaju 97,6% ukupne varijacije (Slika 56.).



Slika 56. Varijacija objašnjena PLS faktorima (faktor 1, faktor 2, faktor 3).

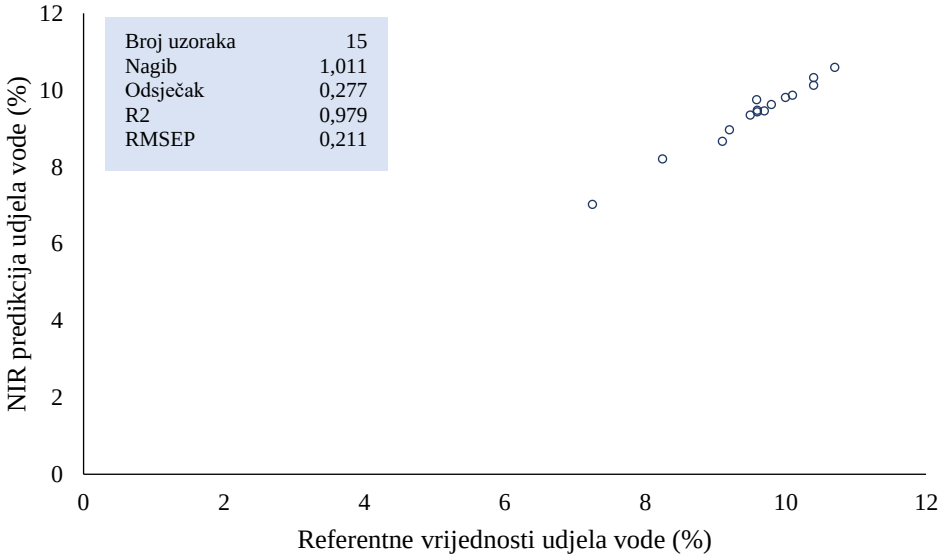
Korelacija između NIR spektralnih podataka i referentnih vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz kalibracijskog seta, za multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora prikazana je na slici 57.



Slika 57. Korelacija dobivenih NIR vrijednosti i referentnih vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz kalibracijskog seta za NIR multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora (5500–3800 cm^{-1}).

Odabirom tri PLS faktora dobiven je NIR multivarijatan model s RMSEC vrijednošću od 0,18 % (Slika 57.). Koeficijent određivanja (R^2 = 0,98) ukazuje na visoku korelaciju NIR spektroskopijske metode i Karl-Fischer volumetrijske metode (Slika 57.). Procijenjena je vrijednost nagiba regresijskog pravca (0,98) te vrijednost odsječka na osi ordinata (0,23 %).

U sljedećem koraku uspostave NIR predikcijskog modela analizirana je optimalna dimenzionalnost, odnosno odabir broja PLS faktora koji će konstituirati NIR multivarijatan kalibracijski model. Sposobnost predikcije formiranog NIR multivarijatnog kalibracijskog modela procijenjena je na testnim uzorcima optimizacijskog test seta koji nisu korišteni u formiranju NIR kalibracijskog modela (Slika 58.). Referentne vrijednosti udjela vode (%) određene Karl-Fischer volumetrijskom metodom u test uzorcima optimizacijskog test seta u rasponu su od 7,3 % do 10,7 % (Tablica 30.). Navedene vrijednosti udjela vode (%) su unutar raspona formiranog NIR multivarijatnog kalibracijskog modela (6,3 %-11,0 %).

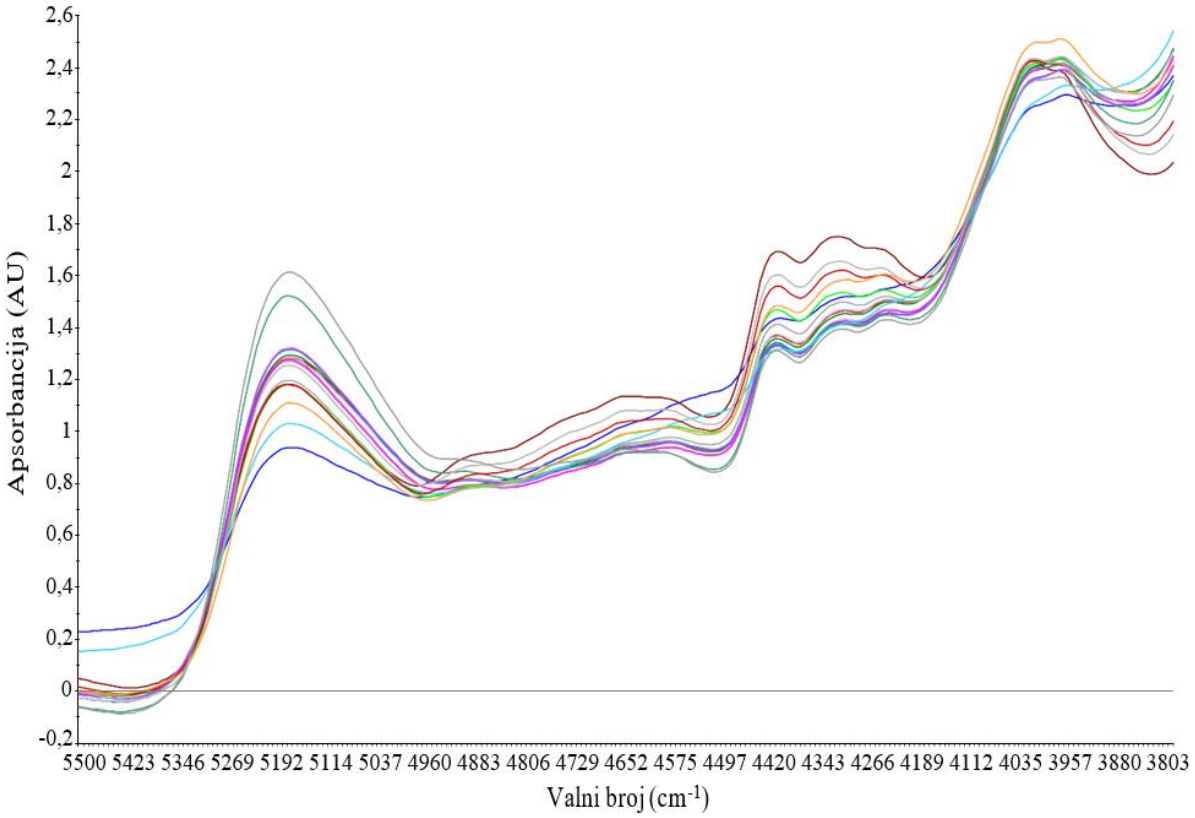


Slika 58. Korelacija NIR predikcija i referentnih vrijednosti udjela ostatne vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C iz optimizacijskog test seta za NIR multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora (5500–3800 cm^{-1}).

Kemometrijski parametri ukazuju na visoku korelaciju između rezultata za udjel vode (%) u testnim uzorcima optimizacijskog test seta dobivenih predikcijom novim NIR kalibracijskim modelom s 3 PLS faktora i pripadnih referentnih vrijednosti dobivenih Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Slika 58.). Vrijednosti RMSEC i RMSEP su usporedive i iznose redom 0,18 % i 0,21 %.

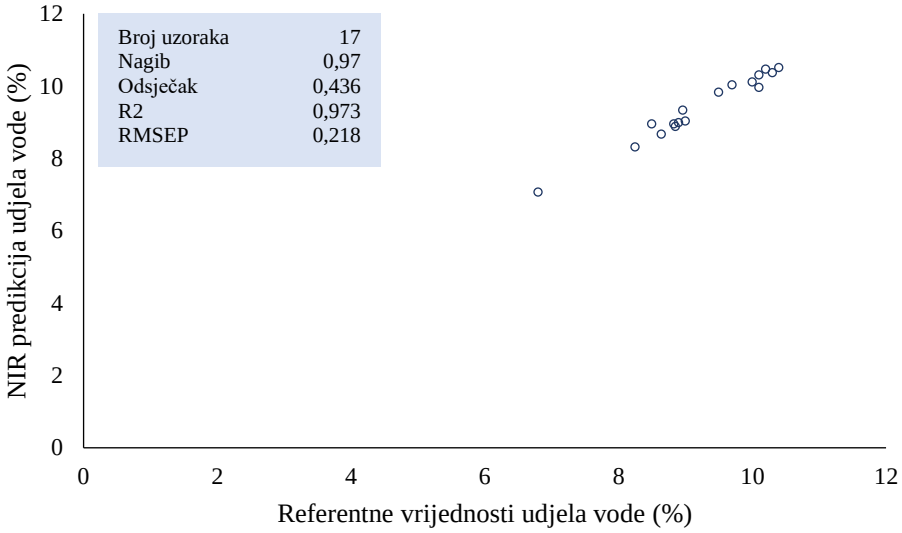
4.4.2.7. Validacija NIR kalibracijskog modela

Validacija NIR kalibracijskog multivarijatnog modela s 3 PLS faktora provedena je na nezavisnim test uzorcima validacijskog test seta (C52-C68), koji nisu sudjelovali niti u formiranju niti u optimizaciji NIR multivarijatnog kalibracijskog modela za određivanje udjela vode (%) u pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C. Validacijski test set reprezentativan je za populaciju budućih proizvodnih serija ove djelatne tvari, te obuhvaća fizikalnu i kemijsku varijabilnost 17 konsekutivnih proizvodnih serija pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C, kako je opisano u poglavlju 4.4.2.1.
Provedena je matematička transformacija ovih spektara, primjenom SNV matematičkog algoritma (Slika 59.).



Slika 59. Matematički obrađeni (SNV) NIR spektri pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C (C52-C68) snimljeni difuznom refleksijom zračenja u području 55000–3800 cm^{-1}.

Referentne vrijednosti udjela vode (%) u testnim uzorcima validacijskog test seta (C52-C68) određene su Karl-Fischer volumetrijskom metodom (Tablica 30.). Referentni udjeli vode (%) u ovim testnim uzorcima kreću se u rasponu od 6,8 % do 10,4 %, te su unutar raspona NIR multivarijatnog kalibracijskog modela.



Slika 60. Korelacija NIR predikcija i referentnih vrijednosti udjela ostatne vode (%) u testnim uzorcima pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C iz validacijskog test seta za NIR multivarijatan kalibracijski model s tri PLS faktora (5500–3800 cm^{-1}).

Izvedbene karakteristike NIR modela s 3 PLS faktora vrednovane su na temelju koeficijenta određivanja (R^2 = 0,97), nagiba pravca (0,97), odsječka na osi ordinate (0,44 %) te RMSEC vrijednosti (0,22 %). Vrijednost RMSEP dobivena za validacijski test set usporediva je s vrijednostima RMSEP (0,21 %) za optimizacijski test set i RMSEC za kalibracijski set (0,18 %).

Podzastupljenost testnih uzorka s nižim udjelom vode (%) pri donjem dijelu raspona NIR modela u validacijskom test setu dovodi do mogućeg izdvajanja uzorka visokog utjecaja (engl. *high leverage*) (C53) koji može utjecati na nagib i odsječak pravca (Slika 60.).

Na temelju rezultata prikazanih u poglavljima 4.4.1 i 4.4.2. može se zaključiti da kompleksnost i varijabilnost pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A (poglavlje 4.4.1.) i pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C (poglavlje 4.4.2.) upućuju na potrebu uzorkovanja većeg broja proizvodnih serija ovih djelatnih tvari u svrhu formiranja kalibracijskog seta, optimizacijskog test seta i validacijskog test seta. Time bi se povećala vjerojatnost da formirani NIR multivarijatni modeli za određivanje udjela vode (%) obuhvate nepoznate interferirajuće varijacije svojstvene ovim djelatnim tvarima te shodno tome poboljšala robusnost ovih NIR modela. Nadalje, za uspostavu robusnijih NIR multivarijatnih modela potrebno je uz primjenu eksperimentalnog dizajna postići uniformnu raspodjelu test uzoraka unutar šireg raspona NIR modela, kako bi se u budućnosti izbjegla ekstrapolacija modela u rutinskoj primjeni.

Iako je uspostava točnih i robusnih NIR modela vrlo zahtjevna, neosporno je da NIR modeli omogućavaju znatnu uštedu u proizvodnji biotehnoloških (među)proizvoda izuzetne ekonomske i drugih poznatih vrijednosti, jer su spektroskopijske NIR metode nedestruktivne. Na temelju ovog istraživanja moguće je egzaktno prikazati ekonomsku prednost primjene formiranih robusnih NIR modela usporedbom s referentnom Karl-Fischer volumetrijskom metodom, obzirom na utrošenu masu djelatne tvari koja je ekvivalentna približno 2000 doza ovog cjepiva i to u samo jednoj titraciji.

Alternativni pristup za visokovrijedne djelatne tvari poput pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe A i pročišćenih meningokoknih polisaharida serogrupe C, koji se proizvode u vrlo malim količinama, zasniva se na ponovnom formiranju i optimizaciji NIR multivarijatnog modela uz uvođenje novih referentnih uzoraka. Zapravo postupci re-formiranja i optimizacije NIR modela u iterativnom smislu predstavljaju kontinuirano unaprjeđivanje ovoga modela realnim proizvodnim sustavima.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Utvrđeno je da standardna Karl-Fischer volumetrijska metoda u uporabi nije pogodna za određivanje udjela ostatne vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C, jer relativna vlažnost zraka ima statistički značajan utjecaj (koeficijent korelacije 0,93) na rezultate određivanja udjela vode ovom standardnom metodom.
2. Osmišljena je nova referentna Karl-Fischer volumetrijska metoda za određivanje udjela ostatne vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C kod koje se liofilizat cjepiva ne izlaže okolišnim čimbenicima. Inovativna Karl-Fischer metoda je u cijelosti prilagođena zahtjevima ove izuzetno osjetljive analize i udovoljava kriterijima prihvatljivosti za točnost referentne metode prema procijenjenim validacijskim parametrima, kako slijedi: preciznost (RSD = 1,8 %), odstupanje od prave vrijednosti (relativno odstupanje od prave vrijednosti = 0,8 %) te linearnost (R^2 = 1,00).
3. U razvoju nove NIR kvantitativne metode za određivanje udjela vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C uspostavljen je optimalni NIR mulitvarijatan model iz SNV transformiranih NIR spektara u spektralnom području 5462-3842 cm^{-1} s dva PLS faktora. Relativno niske i usporedive vrijednosti kemometrijskih parametara - RMSEC (0,18 %) i RMSEP (0,14 %) u fazi formiranja i optimizacije NIR modela ukazuju da je formirani NIR mulitvarijatan model robustan.
4. Osmišljen je novi eksperimentalni dizajn, koji se temelji na metodi standardnog dodavanja vode u jednu bočicu liofiliziranog cjepiva, koji omogućava procjenu prikladnosti za svrhu NIR analitičkog sustava. Ovaj sustav obuhvaća formirani NIR multivarijatan model i referentnu Karl-Fischer volumetrijsku metodu. Novi eksperimentalni dizajn omogućio je jednoznačnu interpretaciju povezanosti selektiranih spektralnih varijabli i spektralnih svojstava ciljnog analita - vode, kao funkciju interakcija s NIR zračenjem uz konstantne sastojke matriksa. Osmišljenim istraživačkim pristupom mogu se interpretirati složeni NIR spektri analita u vrlo kompleksnim matriksima, koji su svojstveni biotehnološkoj proizvodnji.

5. Utvrđena je prikladnost za svrhu NIR analitičkog sustava za određivanje udjela ostatne vode u liofiliziranom cjepivu. Profil točnosti ukazuje da je točnost NIR analitičkog sustava unutar zadanih granica prihvatljivosti i to unutar raspona udjela vode 1,0 - 6,7 %. Razvijena i validirana nova kvantitativna NIR analitička metoda predstavlja brzu, jednostavnu, nedestruktivnu, ekonomski povoljniju alternativu od referentne Karl-Fischer volumetrijske metode te se može koristiti u kontroli kvalitete gotovog proizvoda - liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C. Ova NIR metoda ima sve predispozicije za primjenu u kontinuiranom praćenju kritičnog parametra - udjela ostatne vode u liofiliziranim pripravcima ovog cjepiva u stvarnom vremenu (in-line) kroz intaktnu staklenu ambalažu. Time bi se doprinijelo boljem razumijevanju, kontroli i optimizaciji procesa liofilizacije cjepiva.

6. Iz nagiba regresijskog pravca (1,01) procijenjena je proporcionalna pogreška NIR analitičkog sustava za određivanje udjela ostatne vode u liofiliziranom cjepivu protiv meningokoka serogrupa A i C, koja uključuje i proporcionalnu pogrešku referentne Karl-Fischer volumetrijske metode. Dobivena proporcionalna pogreška nije statistički značajna te bi se stoga primjenom ove NIR analitičke metode u stabilitetnim studijama doprinijelo poboljšanoj sposobnosti predikcije roka valjanosti liofiliziranog cjepiva. U ovom slučaju bi se moglo pratiti povećanje udjela vode u istim stabilitetnim uzorcima liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C i to kroz sve stabilitetne točke. Procijenjene izvedbene karakteristike ove NIR analitičke metode upućuju i na sposobnost točnije procjene varijabilnosti udjela ostatne vode unutar i između proizvodnih serija liofiliziranoga cjepiva u odnosu na referentnu Karl-Fischer volumetrijsku metodu.

7. Razvijene su i validirane nove kvantitativne NIR metode za određivanje udjela vode u, zasebno, pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe A (RMSEC = 0,18 %, RMSEP = 0,20 %) i pročišćenim meningokoknim polisaharidima serogrupe C (RMSEC = 0,18 %, RMSEP = 0,22 %).

8. Validirane NIR analitičke metode omogućavaju praćenje kritičnog parametra kvalitete - udjela vode u svim fazama proizvodnje liofiliziranog cjepiva protiv meningokoka serogrupa A i C prema sustavnom PAT pristupu te značajno doprinose redukciji korištenja reagensa te stvaranja supstancija, koje su opasne po ljudsko zdravlje i okoliš, a u skladu s principima zelene kemije.
9. Rezultati predloženih istraživanja mogu biti nove smjernice za poboljšanje upravljanja rizikom u proizvodnji cjepiva, ali i općenito u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji.

6. LITERATURA

1. ANSI (2012) ASTM E1655-05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. ANSI-American National Standards Institute, New York.
2. Anastas, P.T., Warner, J. C. (1998) *Green Chemistry, Theory and Practice*, Oxford University Press.
3. Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. (1989) Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.* **43**, 772-777.
4. Beyer , J., Steffens, K.J. (2003) Calibration models for determination of water content in pharmaceutical excipients using near-infrared spectroscopy. *Pharm. Ind.* **65**, 186–192.
5. Blanco, M., Alcalá, M., González, J.M., Torras, E. (2006) A process analytical technology approach based on near infrared spectroscopy: tablet hardness, content uniformity, and dissolution test measurements of intact tablets. *J. Pharm. Sci.* **95**, 2137–2144.
6. Blanco, M., Villarroya, I. (2002) NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends Anal. Chem.* **21**, 240–250.
7. Blanco, M., Peguero, A. (2010) Analysis of pharmaceuticals by NIR spectroscopy without a reference method. *Trends Anal. Chem.* **29**, 1127–1136.
8. Blanco, M., Cueva-Mestanza, R., Peguero, A. (2011) NIR analysis of pharmaceutical samples without reference data: improving the calibration. *Talanta* **85**, 2218–2225.
9. Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S., Rovira, E. (1997) Determination of water in ferrous lactate by near infrared reflectance spectroscopy with a fibre-optic probe. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 255–262.
10. Bodson, C., Dewé, W., Hubert, Ph., Delattre, L. (2006) Comparison of FT-NIR Transmission and UV-Vis Spectrophotometry to Follow the Mixing Kinetics and to Assay Low-Dose Tablets Containing Riboflavin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 783-790.
11. Bodson, C., Rozet, E. Ziémons, E., Evrard, B. , Hubert, Ph., Delattre, L. (2007) Validation of manufacturing process of Diltiazem HCl tablets by NIR spectrophotometry (NIRS). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 356-361.
12. Bokobza, L. J. (1998) Near Infrared Spectroscopy. *Near Infared Spectrosc.* **6**, 3-17.
13. Boulanger, B., Chiap, P., Dewe, W., Crommen, J., Hubert, Ph. (2003) An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progress and limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 753–765.

14. Brdička, R. (1969) *Osnove fizikalne kemije*, 5 izd. (preveo Deželić Đ.) Školska knjiga, Zagreb.
15. Bro, R., Smilde, A.K. (2014) Principal component analysis. *Anal. Methods* **6**, 2812-2831.
16. Brülls, M., Folestad, S., Sparén, A., Rasmuson, A., Salomonsson, J. (2007) Applying spectral peak area analysis in near-infrared spectroscopy moisture assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**, 127-136.
17. Büning-Pfaue, H. (2003) Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chem.* **823**, 107-115.
18. Bunsen, R. W. (1853) *Liebigs Ann. Chem*. **86**, 265.
19. Burns, D. A., Ciurczak, E. W. (2008) *Handbook of near infrared analysis*, 3. izd., Taylor & Francis Group, Boca Raton.
20. Cao,W., Mao, C., Chen, W., Lin, H., Krishnan, S., Cauchon, N. (2006) Differentiation and Quantitative Determination of Surface and Hydrate Water in Lyophilized Mannitol Using NIR Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **95**, 2077–2086.
21. Clavaud, M., Roggo, Y., Dégardin, K., Sacré, P.Y., Hubert, P., Ziemons E. (2016) Moisture content determination in an antibody-drug conjugate freeze-dried medicine by near-infrared spectroscopy: A case study for release testing. *J Pharm. Biomed. Anal.* **131**, 380-390.
22. Clavaud, M., Roggo, Y., Degardin, K., Sacré, P.Y., Hubert, P., Ziemons, E. (2017) Global regression model for moisture content determination using near-infrared spectroscopy. *Eur J Pharm Biopharm 119*, 343-352.
23. Clua-Palau, G., Jo, E., Nikolic, S., Coello, J., Maspoch, S. (2020) Finding a reliable limit of detection in the NIR determination of residual moisture in a freeze-dried drug product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **183**, 113163.
24. Chen, Q., Wang, Y. (2009) Challenges in the determination of water content by Karl Fischer titration during in-process control. *Am. Pharm. Rev.* **12**, 48–54.
25. De Bleye, C., Chavez, P.F., Mantanus, J., Marini, R., Hubert, Ph., Rozet, E., Ziemons, E. (2012) Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**, 125–132.
26. Derksen, M.W.J., Van De Oetelaar, P.J.M., Maris, F.A. (1998) The use of near-infrared spectroscopy in the efficient prediction of a specification for the residual moisture content of a freeze-dried product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 473–480.
27. Dorić, H., Bolf, N. (2018) Procesna analitička tehnologija. Mjerna i regulacijska tehnika, *Kem. Ind.* **67**, 466-469.

28. Dunko, A. Dovletoglou, A. (2002) Moisture assay of an antifungal by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 145–154.
29. EDQM (2015) Technical guide for the Elaboration of monographs, 7. izd., Pharmeuropa, EDQM- The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, <https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/European_Pharmacopoeia/Find_information_on/Technical_Guides/technical_guide_for_the_elaboration_of_monographs_7th_edition_2015.pdf>. Pristupljeno 17. ožujka 2020.
30. Ellison, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A. (2012) Eurachem/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Eurachem, <http://www.Eurachem.bam.de>. Pristupljeno 16. ožujka 2020.
31. EMA (2009) Use of Near Infrared Spectroscopy by the Pharmaceutical Industry and the Data Requirements for News Submissions and Variations. EMA-European Medicines Agency, Amsterdam, <https://www.ema.europa.eu/en/use-near-infrared-spectroscopy-nirs-pharmaceutical-industry-data-requirements-new-submissions>. Pristupljeno 15. travnja 2019.
32. Ermer, J. and Miller, J.H.M. (2005) *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
33. Faber, N.M. (1999) Estimating the uncertainty in estimates of root mean square error of prediction: application to determining the size of an adequate test set in multivariate calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst*. **49**, 79.
34. Faber, N.M., Rajkó, R. (2007) How to avoid over-fitting in multivariate calibration—The conventional validation approach and an alternative. *Anal. Chim. Acta* **595**, 98–106.
35. FDA (2004) Guidance for Industry PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance. FDA- The Food and Drug Administration, Silver Spring, <https://www.fda.gov/media/71012/download>. Pristupljeno 05. studenoga 2020.
36. Feinberg, M. (2007) Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J. Chromatogr. A* **1158**, 174-183.
37. Feinberg, M., Boulanger, B., Dewe, W., Hubert, Ph. (2004) New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical dana. *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 502–514.
38. Fischer, K. (1935) Neues Verfahren zur massanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern. *Angew. Chem.* **48**, 394-396.

39. Fleming, J., Albus, H., Neidhart, B., Wegschieder, W. (1996) Glossary of analytical terms (IV). *Accred. Qual. Assur.* **1**, 190-191.
40. Freitas, M.P., Sabadin, A. L., Silva, M., Giannotti, F.M., do Couto, D.A., Tonhi, E., Medeiros, R.S., Coco, G.L., Russo, V.F.T. et al. (2005) Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: A rapid and nondestructive method. *J. Pharm.Biomed. Anal.* **39**, 17–21.
41. Geladi, P., MacDougal, D., Martens, H. (1985) Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Appl. Spectrosc.* **39**, 491-500.
42. Gómez-Carracedo, M.P., Andrade, J.M., Rutledge, D.N., Faber, N.M. (2007) Selecting the optimum number of partial least squares components for the calibration of attenuated total reflectance-mid-infrared spectra of undesigned kerosene samples. *Anal. Chim. Acta* **585**, 253-265.
43. González, A.G, Ángeles Herrador, M. (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal.Chem.* **26**, 227–238.
44. González, A.G., Ángeles Herrador, M., Asuero, A.G. (1999) Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta* **48**, 729–736.
45. González, A. G., Ángeles Herrador, M. (2006) Accuracy profiles from uncertainty measurements. *Talanta* **70**, 896–901.
46. González, A. G., Ángeles Herrador, M., Asuero, A.G. (2005) Practical digest for evaluating the uncertainty of analytical assays from validation data according to the LGC/VAM protocol. *Talanta* **65**, 1022–1030.
47. Grohganz, H., Fonteyne, M., Skibsted, E., Falck, T., Palmqvist, B., Rantanen, J. (2009) Role of excipients in the quantification of water in lyophilised mixtures using NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**, 901–907.
48. Grohganz, H., Gildemyn, D., Skibsted, E., Flink, J.M., Rantanen, J. (2010) Towards a robust water content determination of freeze-dried samples by near-infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.* **676**, 34–40.
49. Harris, D.C., Bertolucci, M.D. (1989) *Symmetry and spectroscopy*, Dover Publications, New York.
50. Helland, I.S., Naes, T., Isaksson, T. (1995) Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic dana. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **29**, 233-241.
51. Hopke, P. K. (2003) The evolution of chemometrics. *Anal. Chim. Acta*. **500**, 365-377.

52. Hoteling, H. (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* **24**, 417-441, 498-520.
53. Howarth, R.J. (2003, 12. ožujak) The J-chart: a simple plot that combines the capabilities of Shewhart and susum charts, for use in analytical quality control. AMC technical brief 12, The Royal Society of Chemistry, <https://www.rsc.org/images/shewhart-cusum-charts-technical-briefs-12_tcm18-214864.pdf>. Pristupljeno 15. siječnja 2020.
54. Hubert, Ph., Chiap, P., Crommen, J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Mercier, N., Bervoas-Martin, S., Chevalier, P., Grandjean, D., Lagorce, P., Lallier, M., Laparra, M.C., Laurentie, M., Nivet, J.C. (1999) The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Anal. Chim. Acta* **391**, 135–148.
55. Hund, E., Massart, D.L., Smeyers-Verbeke, J. (2001) Operational definitions of uncertainty.*Trends Anal. Chem.* **20**, 394-406.
56. ICH (2005) Topic Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH-International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>. Pristupljeno 21.veljače 2020.
57. Jančić Stojanović, B.S., Vemić, A.M., Rakić, T.M., Kostić, N.M., Malenović, A.M. (2012) Razvoj metode titracije po Karl Fišeru primenom tzv. Quality by Design koncepta. *Hem. Ind.* **66**, 659–665.
58. Jerome, J., Workman, J.R. (1996) Interpretive spectroscopy for near infrared. *Appl. Spectrosc. Rev*. **31**, 251-320.
59. Jones, J.A., Last, I.R., MacDonald, B.F., Prebble, K.A. (1993) Development and transferability of near-infrared methods for determination of moisture in a freeze-dried injection product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 1227–1231.
60. Kamat, L., Lodder, R.A., DeLuca, P.P. (1989) Near-infrared spectroscopic determination of residual moisture in lyophilized sucrose through intact glass vials. *Pharm. Res*. **6**, 961–965.
61. Kennard, R.W., Stone, L.A. (1969) Computer-aided Design of Experiments. *Technometrics* **11**, 137-148.
62. Kubelka, P., Munk, F. (1931) Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. *Zeit. Tech. Physik*. **12**, 593-601.

63. Lakeh, M.A., Karimvand, S.K., Khoshayand, M.R., Abdollahi, H. (2020) Analysis of residual moisture in a freeze-dried sample drug using a multivariate fitting regression model. *Microchem. J.* **154**, 104516.
64. Larkin, P.J. (2018) *Infrared and Raman spectroscopy: Principles and spectral interpretation*, 2. izd., Elsevier, Amsterdam.
65. Last, I.R., Prebble, K.A. (1993) Suitability of near-infrared methods for the determination of moisture in a freeze-dried injection product containing different amounts of the active ingredient. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 1071–1076.
66. Lin, T.P., Hsu, C.C. (2002) Determination of residual moisture in lyophilized protein using a rapid and non invasive method: near infrared spectroscopy. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **56**, 196–205.
67. Lopes, J.A., Costa, P.F., Alves, T.P., Menezes, J.C. (2004) Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **74**, 269-275.
68. Luck, W.A.P. (1974) *Structure of Water and Aqueous Solution*, Verlag Chemie-Physik, Weinheim, Germany.
69. Mandac Zubak, A., Horvat, A., Čavužić, D., Fabijanić, I. (2020) Freeze-dried meningococcal vaccine: Total error assessment of a near-infrared method for water content detrmination. *Talanta* **211**, 1-7.
70. Mandel, J. (1964) *The Statistical Analysis of Experimental Data*, Dover, New York, SAD.
71. Mantanus, J., Ziémons, E., Lebrun, P., Rozet, E., Klinkenberg, R., Streel, B., Evrard, B., Hubert, P. (2009) Moisture content determination of pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: Method development and validation. *Anal. Chim. Acta* **642**, 186–192.
72. Marini, F., Magrì, A.L., Bucci, R., Magrì, A.D. (2007) Use of different artificial neural networks to resolve binary blends of monocultivar Italian olive oils. *Anal. Chim. Acta* **599**, 232-240.
73. Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., Rius, F. X. (2001) Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples. *Anal. Chim. Acta* **446**, 133–145.
74. Maroto, A., Riu, J., Boqué, R., Xavier Rius, F. (1999) Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Anal. Chim. Acta* **391**, 173–185.
75. Martens, H.A., Dardenne, P. (1998) Validation and verification of regression in small data sets. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44**, 99-121.

76. Martens, H., Jensen, S.A., Geladi, P. (1983) Multivariate linearity transformations for near infrared reflectance spectroscopy. *Proc. Nordic Syrup. on Applied Statistics* **12**, 205-234.
77. Martens, H., Stark, E. (1991) Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: new preprocessing methods for near infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **9**, 625-635.
78. Martens, H., Nielsen, J.P., Engelsen, S.B. (2003) Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. Application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures. *Anal. Chem.* **75**, 394-404.
79. Martens, H., Næs, T. (1989) *Multivariate Calibration*, Wiley, New York.
80. Metrohm AG (2013) NIR Spectroscopy-A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufaturing processes. Herisau, <https://www.metrohm.com/en/documents/81085026>. Pristupljeno 10. ožujka 2020.
81. Mettler Toledo (2003) Fundamentals of the Volumetric Karl Fischer Titration. Mettler Toledo, Greifensee.
82. Moes, J.J., Ruijken, M.M., Gout, E., Frijlink, H.W., Ugwoke, M.I. (2008) Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: Blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements. *Int. J. Pharm.* **357**, 108-118.
83. Naes, T., Isaksson, T. Fearn, T., Davies, A.M.C. (2002) *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, Chichester, UK.
84. Norris, K.H., Williams, P.C. (1984) Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particle size. *Cereal Chem.* **61**, 158-165.
85. Oliveri, P., Malegori, C., Simonetti, R., Casale, M. (2019) The Impact of Signal Pre-Processing on the Final Interpretation of Analytical Outcomes – A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **1058**, 9-17.
86. Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H. (1993) *Practical NIR Spectroscopy*, 2. izd., Longman Scientific & Technical, Essex.
87. Ozaki, Y. (2012) Near-Infrared Spectroscopy—Its Versatility in Analytical Chemistry. *Anal. Sci.* **28**, 545-563.
88. Pasquini, C. (2018) Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives - A review. *Anal. Chim. Acta* **1026**, 8–36.

89. Pasquini, C. (2003) Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *J. Braz. Soc.* **14**, 198-219.
90. Pearson, K. (1901) On lines and planes of closest fit to system of points in space. *Philosophical Magazine* **2**, 559-572.
91. Pedersen, D.K., Martens, H., Nielsen, J.P., Engelsen, S.B. (2002) Near-infrared absorption and scattering separated by extended inverted signal correction (EISC): Analysis of near-infrared transmittance spectra of single wheat seeds. *Appl. Spectrosc.* **56**, 1206–1214.
92. Petz, B. (2007) *Osnovne statističke metode za nematematičare*. 6. izd., Naklada Slap, Zagreb.
93. Ph. Eur. (2019) 2.5.12. Water: semi-micro determination, Ph. Eur.-European Pharmacopoeia, European Council of Europe, Strasbourg.
94. Plugge, W., Van Der Vlies, C. (1993) Near-infrared spectroscopy as an alternative to assess compliance of ampicillin trihydrate with compendial specifications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 435–442.
95. Rajer-Kanduč, K., Zupan, J., Majcen, N. (2003) Separation of data on the training and test set for modeling: a case study for modeling of five colours properties of a white pigment. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **65**, 221–229.
96. Rinnan, Á., van den Berg, F., Balling Engelsen, S. (2009) Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends Anal. Chem.* **28**, 1201-1222.
97. Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A., Jent, N. (2007) A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**, 683–700.
98. Rozet, E., Ceccato, A., Hubert, C., Ziemons, E., Oprean, R., Rudaz, S. Boulanger, B., Hubert, Ph. (2007a) Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J. Chromatogr. A* **1158**, 111–125.
99. Rozet, E., Rudaz, S., Marini, R.D., Ziémons, E., Boulanger, B, Hubert, Ph. (2011a) Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications. *Anal. Chim. Acta* **702**, 160-171.
100. Rozet, E., Marini, R.D., Ziemons, E., Dewé, W., Rudaz, S., Boulanger, B., Hubert, Ph. (2011b) Total error and uncertainty: friends or foes? *Trends Anal. Chem.* **30**, 797–806.
101. Rozet, E., Hubert, C., Ceccato, A., Dewé, W., Ziemons, E., Moonen, F., Michail, K., Wintersteiger, R., Streel, B., Boulanger, B., Hubert, P. (2007b) Using tolerance intervals

in prestudy validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-futurepurpose concept. *J. Chromatogr. A* **1158**, 126–137.

102. Savage, M., Torres, J., Franks, L., Masecar, B., Hotta, J. (1998) Determination of adequate moisture content for efficient dry-heat viral inactivation in lyophilized factor VIII by loss on drying and by near infrared spectroscopy. *Biologicals* **26**, 119–124.
103. Savitzky, A., Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639.
104. Scholz, E. (1982) Karl-Fischer Reagenzien ohne Pyridin; Zweikomponeneten-Reagenzien mit Imidazol; Fresenius Z. *Anal. Chem.* **312**, 460-464.
105. Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (2002) *Near-Infrared Spectroscopy Principles Instruments Applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
106. Snee, R.D. (1977) Validation of Regression Models: Methods and Examples. *Technometrics* **19**, 415-428.
107. Stokvold, A., Dyrstad, K., Libnau, F.O. (2002) Sensitive NIRS measurement of increased moisture in stored hygroscopic freeze dried product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 867–873.
108. Taverniers, I., Van Bockstaele, E., De Loose, M. (2004a) Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainity of analytical results. *Trends Anal.Chem.* **23**, 480–490.
109. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004b) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal.Chem.* **23**, 535–552.
110. Westad, F., Marini, F. (2015) Validation of chemometric models – a tutorial. *Anal. Chim. Acta* **893**, 14–24.
111. Wiklund, S., Nilsson, D., Eriksson., L., Sjöström, M., Wold, S. Faber, K. (2007) A randomization test for PLS component. *J. Chemom.* 21, 427-439.
112. Williams, P., Norris, K. (2001) *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2. izd., American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN, SAD.
113. Wilson, E.B., Decius, J. C., Cross, P. C. (1980) *Molecular vibrations*, Dover Publications, New York.
114. Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. (1987) Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2**, 37-52.

115. Wold, S., Martens, H., Wold, H. (1982) The multivariate calibration problem in chemistry solved by the PLS, in: Matrix Pencils. *Proceedings of a Conference Held at Pite Havsbad*, Sweden, Springer, Heidelberg, 286-293.
116. Woodcock, J. (2004) The concept of pharmaceutical quality. *Am Pharm Rev* 7, 1–3.
117. Woodward, R.H., Goldsmith, P.L. (1964) *Cumulative Sum Techniques*, Oliver & Boyd for Imperial Chemical Industries Limited, Edinburgh.
118. Wu, W., Walczak, B., Massart, D. L., Heuerding, S., Erni, F., Last, I.R., Prebble, K.A. (1996) Artificial neural networks in classification of NIR spectral data : design of the training set. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **33**, 35-46.
119. Yoshioka, S., Stella, V.J. (2000) *Stability of drugs and dosage forms*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
120. Youden, W.J. (1947) Technique for Testing Accuracy of Analytical Dana. *Anal. Chem.* **19**, 946–950.
121. Zhou, X., Hines, P., Borer, M.W. (1998) Moisture determination in hygroscopic drug substances by near infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 219–225.
122. Zhou, L., Socha, J.M., Vogt, F.G., Chen, S., Kord, A.S. (2010) A systematic method development strategy for water determinations in drug substance using Karl Fischer titrations. *Am. Pharm. Rev.* **13**, 74–84.
123. Zheng, Y., Lai, X., Wrang Bruun, S., Ipsen, H., Nedergaard Larsen, J., Løwenstein, H., Søndergaard, Ib., Jacobsen, S. (2008) Determination of moisture content of lyophilized allergen vaccines by NIR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46**, 592–596.

PRILOG 1

Tablica P1. Kritične vrijednosti za CuSum test prema zadanom rasponu (Ermer i Miller, 2005)

Raspon	Kritične vrijednosti 95 %	Kritične vrijednosti 99 %
2	1,6	2,1
3	2,0	2,5
4	2,3	2,9
5	2,7	3,3
6	3,0	3,6
7	3,2	4,0
8	3,5	4,3
9	3,7	4,6
10	3,9	4,9
11	4,1	5,1
12	4,3	5,3
13	4,5	5,5
14	4,6	5,6
15	4,8	5,8
20	5,6	6,8
25	6,0	7,3
30	6,7	8,0
40	7,8	9,3
50	8,6	10,4
60	9,5	11,3
70	10,3	12,2
80	10,8	12,9
90	11,3	13,6
100	11,8	14,3

PRILOG 2- POPIS KRATICA I SIMBOLA

- ANOVA – analize varijance (engl. *Analysis of Variance*)
- CI – interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*)
- CuSum – kumulativna suma (engl. *Cumulative Sum*)
- CRT – kontrolirana sobna temperature (engl. *Controlled Room Temperature*)
- DoE – dizajn eksperimenata (engl. *Design of Experiments*)
- EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)
- FDA – Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)
- MSC – višestruka korekcija raspršenog zračenja (engl. *Multiplicative Scatter Correction*)
- INC – interna kontrola kvalitete (engl. *Internal Quality Control*)
- IR – infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared spectroscopy*)
- LOD – granica detekcije (engl. *Limit of Detection*)
- LOQ – granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantification*)
- NIR – spektroskopija u bliskom infracrvenom području (engl. *Near-Infrared spectroscopy*)
- MIR – spektroskopija u srednjem infracrvenom području (engl. *Mid-Infrared spectroscopy)*
- MLR – metoda višestruke linearne regresije (engl. *Multiple Linear Regression*)
- OOT – rezultat izvan trenda (engl. *Out of Trend*)
- OOE – rezultat izvan očekivanja (engl. *out of Expectation*)
- OOS – rezultat izvan specifikacije (engl. *Out of Specification*)
- PAT – procesna analitička tehnologija (engl. *Process Analytical Technology*)
- PC – glavna komponenta (engl. *Principal Component*)
- PCA – analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*)
- PCR – metoda regresije glavnih komponenata (engl. *Principal Component Regression*)
- Ph.Eur. – Europska Farmakopeja (engl. *European Pharmacopoeia*)
- PLS – parcijalni postupak najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*)
- QbD – kvaliteta ugrađena u dizajn (engl. *Quality by Design*)
- RMSEC – korijen srednje kvadratne pogreške kalibracije (engl. *Root Mean Square Error of Calibration*)
- RMSECV – korijen srednje kvadratne pogreške unakrsne validacije (engl. *Root Mean Square Error of Cross validation*, RMSECV)
- RMSEP – korijen srednje kvadratne pogreške predikcije (engl. *Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP).
- RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

- SD – standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)
- SIM – stabilitetno - indikativna metoda (engl. *Stability-indicating Method*)
- SNV– standardna normalna variata (engl. *Standard Normal Variate*)
- SPC – statistička kontrola procesa (engl. *Statistical Process Control*)
- $\tilde{\nu}$ – valni broj (engl. *wavenumber*)
- ν_{op} – asimetrično istezanje (engl. *out-of-phase or asymmetric stretch*)
- ν_{ip} – simetrično istezanje (engl. *in-phase or symmetric stretch*)
- ν_{def} – deformacija ili svijanje (engl. *deformation or bending*)
- λ – valna duljina (engl. *wavelength*)

Životopis

Ines Fabijanić rođena je 1969. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila je u Zagrebu, a srednjoškolsko obrazovanje prirodoslovno-matematičkog usmjerenja u V. gimnaziji Zagreb. Školovanje je nastavila na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na studiju Biotehnologija, smjer Biokemijsko inženjerstvo. Diplomski rad pod naslovom „Priprava derivata 4-alkiloksibademove kiseline s potencijalnim mezogenim svojstvima“ izradila je u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, pod mentorstvom prof. dr. sc. Vitomira Šunjića i prof. dr. sc. Vladimira Rapića. Diplomirala je 2001. godine i stekla zvanje diplomiranog inženjera biotehnologije. Po završetku studija zaposlila se u Imunološkom zavodu Zagreb i to kao stručna suradnica u Odjelu za istraživanje i razvoj (rujan 2002. - ožujak 2003.) i zatim u Odsjeku za kemijsku kontrolu kvalitete (ožujak 2003. - rujan 2008.) te kao voditeljica Odsjeka za kemijsku kontrolu kvalitete. (rujan 2008. - prosinac 2016.). Paralelno je obavljala i poslove statističara specijalista Poslovne jedinice kvalitete, Imunološki zavod Zagreb (travanj 2012. - studeni 2013.). Od prosinca 2016. do travnja 2018. radi kao suradnik u Laboratoriju za polazne materijale, Hospira Zagreb d.o.o. Pfizer grupa, a u razdoblju od ožujka 2020. do lipnja 2020. radila je kao suradnik u farmakovigilanciji, PrimeVigilance Zagreb d.o.o. Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2010. Kontinuirano se dodatno usavršava u inozemstvu i to u intrepretaciji i obradi podataka analitičkih metoda kao i u području dobre proizvođačke prakse. Rezultati njenih istraživanja objavljeni su u dva rada iz skupine A1 u časopisima vrlo visokoga faktora odjeka (IF), koji pripadaju prvom kvartilu (Q1). Dio svojih znanstveno-istraživačkih rezultata prezentirala je na domaćem skupu, a u tijeku je izrada još jednog izvornog znanstvenog rada.

Znanstveni radovi iz skupine A1

Fabijanić, I., Čavužić, D., Mandac Zubak, A. (2019) Meningococcal polysaccharides identification by NIR spectroscopy and chemometrics. Carbohydrate polymers 216, 36-44. IF= 7,182 (Q1).

Mandac Zubak, A., Horvat, A., Čavužić, D., **Fabijanić, I.** (2020) Freeze-dried meningococcal vaccine: Total error assessment of a near-infrared method for water content determination. Talanta 211, 1-7. IF= 5,339 (Q1).

Sudjelovanje na nacionalnom znanstvenom skupu

Gotovac, K., Bendelja; K., Vdović; V., Lupret-Goleš, L.; A., Vidović, **Fabijanić; I.**, Cepika A. M., Svoboda-Beusan, I. et al. (2008) Alternative to animal testing: new approaches in the development and control of biologicals // Alternatives to animal testing: new approaches in the development and control of biologicals. Conference Document / European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM), / Council of Europe (ur.). Dubrovnik, Croatia: European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM), 2008. str. 189-190 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Mandac Zubak, A., Horvat, A., Čavužić, D., **Fabijanić, I.** (2020) Freeze-dried meningococcal vaccine: Total error assessment of a near-infrared method for water content determination. Talanta 211, 1-7. IF= 5,339 (Q1)