

Conceptul de calitate prin design în cromatografia de lichide de înaltă performanță și dezvoltarea metodelor cromatografice folosind programe computerizate

Student doctorand: Ferencz Elek

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Sipos Emese

Introducere: Conceptul de calitate prin design (*AQbD – Analytical Quality by Design*) este o abordare modernă, bazată pe principii științifice, în dezvoltarea metodelor cromatografice. Această abordare vizează un obiectiv predefinit și pune accent pe înțelegerea și controlul proceselor analitice. În funcție de scopul dezvoltării sunt realizate experimente sistematice pe baza cărora sunt construite modele virtuale, prin folosirea unui program computerizat, care se bazează pe principii statistice sau pe teorii fundamentale ale cromatografiei. Modelul virtual este reprezentarea atributelor de calitate în funcție de parametrii metodei, care asigură identificarea condițiilor optime de operare, stabilirea corelațiilor între atribute și parametri, respectiv furnizează informații suplimentare pentru identificarea parametrilor critici și pentru estimarea robusteții metodei. Recomandările autorităților competente privind aplicarea conceptului AQbD sunt descrise în versiunea preliminară a ghidului ICH Q14.

Obiective: Obiectivul principal al tezei de doctorat a fost demonstrarea aplicabilității conceptului AQbD în dezvoltarea metodelor cromatografice, în conformitate cu versiunea preliminară a ghidului ICH Q14. Obiectivul secundar a fost prezentarea oportunităților și avantajelor oferite de programul de modelare bazat pe principii fundamentale cromatografice (DryLab, Molnár Institute) în dezvoltarea metodelor analitice pentru determinarea substanțelor înrudite chimic.

Material și metodă: Cromatografia de lichide de înaltă performanță și de ultra înaltă performanță în fază inversă (RP-HPLC și RP-UHPLC) au fost folosite pentru determinarea substanțelor înrudite chimic cu albandazolul și cu ezetimibul, folosind coloane tradiționale cu faze inverse, respectiv cu faze staționare chirale. În scopul modelării și optimizării proceselor cromatografice de separare s-a folosit programul de modelare DryLab, care pentru construirea modelelor de separare folosește principiile mecanistice, folosind experimente sistematice, precum și teoria solvofobă. Procesul de dezvoltare a metodelor s-a realizat în conformitate cu abordarea îmbunătățită (*enhanced approach*) propusă în versiunea preliminară a ghidului ICH Q14.

Rezultate: Studiul 1: Dezvoltarea unei metode cromatografice UHPLC pentru determinarea prin aplicarea conceptului AQbD a albandazolului și a substanțelor înrudite chimic.

În cadrul acestui studiu s-a realizat dezvoltarea metodei RP-UHPLC prin optimizarea procesului de separare pornind de la metoda propusă din Ph. Eur. pentru determinarea substanțelor înrudite chimic cu albandazolul. Pe baza experimentelor sistematice și prin aplicarea programului de modelare s-a selectat faza staționară adecvată și s-a optimizat pH-ul fazei mobile, compoziția ternară, temperatura coloanei, precum și structura gradientului. S-au identificat condițiile optime de operare și intervalele de robustețe prin care se poate asigura fiabilitatea metodei. S-a demonstrat aplicabilitatea metodei prin validare, respectiv prin analiza probelor reale. Rezultatul procesului de dezvoltare este o metodă RP-UHPLC selectivă, eficientă și robustă pentru determinarea substanțelor

înrudite chimic cu albendazolul. Totodată, pe baza avantajelor enumerate, este o alternativă adecvată pentru înlocuirea metodei cu performanță și selectivitate reduse din Ph. Eur.

Studiul 2: Dezvoltarea unei metode cromatografice pentru determinarea substanțelor înrudite chimic cu ezetimibul și compararea fazelor staționare, prin aplicarea conceptului AQbD.

În cadrul studiului doi s-a realizat dezvoltarea metodei RP-HPLC pentru determinarea substanțelor înrudite chimic cu ezetimibul. Folosind programul de modelare s-a investigat efectul temperaturii, compoziției ternare, structura gradientului și efectul structurii fazei staționare asupra procesului de separare. S-a pus accent pe compararea coloanelor cromatografice în scopul identificării condițiilor de operare comune și independente de structura chimică a fazelor staționare. Prin compararea modelelor de separare s-au identificat condiții cromatografice care pot furniza aceeași selectivitate și eficiență pe șase coloane diferite, demonstrând astfel echivalența coloanelor și oferind metodei o flexibilitate ridicată. S-a demonstrat aplicabilitatea metodei prin validare și prin analiza probelor reale. Rezultatul procesului de dezvoltare este o metodă RP-HPLC selectivă, eficientă și robustă pentru determinarea substanțelor înrudite chimic cu ezetimibul. Totodată, în cadrul studiului, s-a prezentat o metodologie obiectivă, bazată pe principiile AQbD, în scopul demonstrării echivalenței coloanelor cromatografice. Prin rezultatele obținute s-a dovedit că structura fazei staționare nu este întotdeauna un factor critic, în schimb înțelegerea aprofundată a proceselor de separare are un rol indispensabil în asigurarea eficienței și flexibilității metodelor cromatografice.

Studiul 3: Aplicabilitatea modelării retenției cromatografice în cazul fazelor staționare chirale folosite în fază inversă. Studiu de caz asupra separării substanțelor achirale înrudite chimic cu ezetimibul.

Studiul trei vizează demonstrare aplicabilității modelării mecanistice în cazul fazelor staționare chirale, folosite în fază inversă pentru separarea substanțelor achirale înrudite chimic cu ezetimibul. S-a realizat separarea substanțelor folosind o coloană chirală pe bază de celuloză, respectiv una pe bază de beta-ciclodextrină. S-a demonstrat că modelarea mecanistică funcționează cu o acuratețe adecvată și în cazul coloanelor chirale, folosite în fază inversă. Acuratețea modelelor virtuale este mai ridicată în cazul coloanei pe bază de beta-ciclodextrină, ceea ce este explicabil prin mecanismul similar al formării complexului de incluziune cu cel descris în teoria solvofobă. Deplasarea timpilor de retenție față de valorile calculate de programul de modelare pot fi cauzate de efectele polare secundare între analit și fazele staționare, care sunt excluse din teoria solvofobă. Pe baza rezultatelor obținute, fazele staționare chirale pot oferi comparativ cu coloanele tradiționale de fază inversă o selectivitate ortogonală în separarea substanțelor achirale înrudite chimic.

Concluzii: Prin cele trei studii realizate s-a demonstrat că aplicarea conceptului AQbD prin realizarea experimentelor sistematice și prin folosirea programelor de modelare este o abordare bazată pe principii științifice care asigură înțelegerea aprofundată a proceselor de separare cromatografică, precum eficiența, robustețea și flexibilitatea metodelor. Rezultatele studiilor prezentate împreună cu alte publicații din literatura de specialitate contribuie la schimbarea de paradigmă prin care dezvoltarea empirică, bazată pe principiul de încercare și eroare va fi înlocuit treptat cu abordarea AQbD, bazată pe principii științifice.