

Quality by design-based method development for the determination of related substances of ezetimibe by high performance liquid chromatography

Elek Ferencz^{1,3}, Emese Sipos², Éva-Katalin Kelemen³, Mona Obreja⁴, Melinda Urkon⁵, Gergő Tóth⁶, Zoltán-István Szabó^{2,7}

¹George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Targu Mures, Department of Physical Chemistry, Targu Mures; ²George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Targu Mures, Department of Pharmaceutical Industry and Management, Targu Mures; ³Gedeon Richter Romania, Product Development Department, Targu Mures; ⁴Gedeon Richter Romania, Analytical Development Department, Targu Mures; ⁵George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Targu Mures, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Targu Mures; ⁶Semmelweis University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Budapest; ⁷Sz-imfidum Ltd., Lunga

Abstract • The pharmaceutical industry is one of the fastest developing industries, and therefore, the chromatographic methods used to ensure the quality of products are constantly evolving, based on current regulatory requirements. Relevant guidelines state that a good understanding of the effects of all parameters on method performance should be predicted and controlled to ensure that test methods are safe and reliable. This quality by design-based approach is increasingly applied in chromatography. One of the pillars of this method development is the design space that results from pre-designed and systematically realized experiments, which contributes to a better understanding of the separation processes and provides flexibility and robustness to the final method. Modeling softwarewares can be used to experimental design and data evaluation, providing possibilities that empirical development does not allow, such as predicting optimal operating conditions or *in silico* robustness testing, to understand the separation process. This paper describes the steps of chromatographic method development according to the ICH Q14 guideline, keeping in mind the quality by design principles and taking advantage of the possibilities offered by the DryLab chromatographic modeling software. As an example, the development of an analytical method for the determination of the related substances of ezetimibe is presented, including the design of experiments, method optimization, robustness testing, validation, method specification and lifecycle management, and finally testing of the method applicability. We have demonstrated that experimental design-based retention modeling is an effective way of method development, and the *in silico* robustness testing is a reliable approach to identifying critical method parameters and setting up control strategies. In chromatographic method development, instead of using a rigid system based on strict and fixed rules, the understanding of separation processes offers higher flexibility. This paper aims to present and promote this new approach to those involved in chromatographic method development.

Keywords • quality by design, chromatography, DryLab, ezetimibe, ICH Q14

DOI: 10.2478/orvtudert-2022-0003

Bulletin of Medical Sciences 2022, 95(1): 31–63

Corresponding author

Ferencz Elek

George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Targu Mures, Department of Physical Chemistry

540142, Targu Mures, Romania

Gheorghe Marinescu street, no. 38

Email: elek.ferencz@umfst.ro

Csaba Horváth's name is familiar to all chromatography professionals. He was the Hungarian-born chemical engineer who designed and created the first high pressure liquid chromatography system at Yale University in the late 1960s. The now household name HPLC entered the scientific community shortly afterwards, firstly as high

pressure liquid chromatography, after that as high performance liquid chromatography. [1]. Since then, this separation technique has become one of the most widely used tools in quality assurance systems in various industries, but especially in the pharmaceutical industry. Within this, one of the most commonly used fields is the identification and quantification of related compounds of drug molecules, where it is considered as a “gold standard” method [2,3]. In order to meet the increasingly stringent regulatory requirements, chromatographic technology and the equipment used are constantly evolving, with many new developments being introduced every year to improve efficiency [4-6]. Understanding the separation process is the cornerstone of effective method development, and the solvophobic theory, also by Csaba Horváth, is a major contribution to this, explaining the interactions that are characteristic of reversed-phase chromatography, thus practically mapping the fundamental laws of the separation process. A three-part series of papers describing the solvophobic theory [7-9] is still the theoretical basis of high performance liquid chromatography and has more than 1800 citations in total, demonstrating its extreme importance [1].

Chromatography methods used in the pharmaceutical industry have to comply with several regulatory directives, occasionally causing difficulties for method developers. Traditional method development uses the *One Factor At a Time (OFAT)* principle and method parameters are tested individually and independently with the aim of determining the optimum value. This approach is also called empirical, as it relies heavily on the analytical experience of the developer. In contrast, there is a science-based approach, *Quality by Design (QbD)*, which is based on the principle that quality should be built into the method during development, as opposed to the empirical approach where the performance of the chromatographic method is tested only after the development process is complete (*QbT-Quality by Testing*). This approach was first articulated by the pharmaceutical authorities in ICH Q8(R2) as “A systematic approach to development that begins with predefined objectives and emphasizes product and process understanding and process control, based on sound science and quality risk management.” [10]. It was first used to optimize manufacturing processes [11], and later several studies have been published where it has been successfully used in analytical applications (*AQbD - Analytical Quality by Design*) also, mainly for the development of chromatographic meth-

ods [12]. As there was no consensus on the part of the authorities regarding the application of this approach in the case of analytical methods, different research groups and organizations formulated their own views on the most important elements and mandatory steps of the AQbD process [13-18]. This period of confusion is to be ended by the ICH Q14 guideline, the first (non-final) version of which was published in March 2022. It illustrates in detail, through practical examples, the steps and elements of the application of the intended quality concept for analytical method development [19]. The guideline mentions a simplified development approach (*minimal approach*), which is practically the same as the empirical method development mentioned above, and an *enhanced approach*, which fulfils the requirements of the AQbD. The latter is obviously supported by the authorities, for the time being only at the level of recommendation and is likely to become mandatory for analytical methods used in the pharmaceutical industry. The first step of the improved approach is to analyze the sample and to identify the analytically relevant quantitative and qualitative properties, such as solubility, acid-base properties, stability, specificity of the pharmaceutical form used, etc. The second step is to define the *Analytical Target Profile (ATP)*, which summarizes the objective for which the method is being developed and expresses this in terms of measurable parameters that can be monitored during the method development. The third step is the risk analysis, which is used to distinguish between those factors that have a critical impact on the performance of the method, the *Critical Method Parameters (CMP)*, and those whose impact is negligible from a practical point of view. The fourth step is to design the experiments and, depending on the number and type of critical method parameters, to design and implement an experimental plan. This step also requires the selection of *Critical Analytical Attributes (CAA)*, which are quantifiable parameters (e.g., peak resolution or analysis time) that allow an objective evaluation of the method performance and the achievement of the target profile. The fifth step involves the selection of the final method and the development of a control strategy. The description of the method should include all the information essential for reproducibility: quality attributes and their limits to monitor the performance of the method and, for critical method parameters, ranges to ensure the method performs well in routine application. The final step is to establish a management plan for the life cycle of the method. This should include, for

example, a description of the *Method Operational Design Region (MODR)*, which will provide flexibility and a scientific basis for subsequent changes, thus facilitating the work of both competent authorities and method developers [19].

Since interpreting the data obtained as a function of the experimental design and evaluating the impact of the method parameters on performance is a complex task, it is often necessary to use statistical or special modelling software. The use of such software offers several advantages, such as: determination of optimal operating conditions, evaluation of the individual or combined effects of method parameters, or characterization of the robustness of the method in the light of experimental data. One such specific modelling program is DryLab (Molnár Institute, Berlin, Germany) [20], which can predict the chromatographic behavior of sample components based on data obtained from experimental chromatographic runs, thus contributing to the understanding and optimization of the separation process. The software is primarily applicable to reversed-phase (RP) chromatography methods and calculations are based on the solvophobic theory described by Csaba Horváth and the linear solvent strength model, both of which describe the effect of changes in method parameters on the separation process [21,22]. The DryLab software has a history of more than thirty years, initially starting from one-dimensional retention time-critical resolution calculations visualizing chromatograms, and now reaching three measured and eight calculated dimensions [23]. Several recent studies illustrate the advantages and potential of DryLab in the development of high performance liquid chromatography methods [4,6,24-30].

The primary aim of this paper is to illustrate the steps of chromatographic method development through a practical example, using the possibilities provided by the AQbD and meeting the requirements of the ICH Q14 guideline. A secondary objective is to demonstrate the applicability and benefits of the DryLab modelling software for method development for the separation of ezetimibe and its related substances.

Starting point and analytical target profile

Ezetimibe is a cholesterol absorption inhibitor with an azetidinone chemical structure. Its pharmacological

action is based on its physical interaction with cholesterol transporters in the wall of the small intestine, thus inhibiting their function and the entry of cholesterol into the bloodstream. To enhance the effect, it is often used in combination with “statins” [31-33]. Because of its complex chemical structure, several different synthetic routes are possible [34,35]. Consequently, several molecules with related structures are known, such as the synthesis intermediate or a compound with a similar structure resulting from the decomposition of ezetimibe. The amount of these related substances in the active substance [36] and in the final product [37] is strictly controlled. In the case of ezetimibe, the two most important degradation products are the THP (*tetrahydropyran*) compound and the ezetimibe ketone mentioned in the USP (*United States Pharmacopeia*) monography of ezetimibe tablets. [38,39].

In a recent review, L. P. Rocha et al. collected the methods reported in the literature for the quantification of ezetimibe values and the determination of its impurity content, but no mention is made of about quality by design principles for any of the methods. There are significant differences between the methods in terms of the stationary and mobile phases used, reflecting the shortcomings of empirical method development [40]. Furthermore, the official impurity testing methods in the USP Ezetimibe and Ezetimibe Tablets monographies are time consuming and use complex solvent mixtures as mobile phases [38,41].

The aim of our study was to perform *in silico* robustness testing, method validation and applicability testing on real samples, in case of a science-based impurity profiling method described in our previous study [30]. Furthermore, a secondary objective was to demonstrate the reliability of the *in silico* robustness test with experimental runs and to define a control strategy and life cycle management of the method based on the obtained data.

Material and method

Chemicals and reagents

Chromatography grade purity methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) and 85 % phosphoric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The aqueous part of the mobile phase was a solution of 0.1 % phosphoric acid in ultrapure water. The water for this solution was freshly prepared each day by using a MilliQ Integral 10 water purifier (Merck Millipore, USA). The ezetimibe reference

standard and the related substances used in this study (ezetimibe diol, desfluoro ezetimibe, meta-fluoroaniline analog, THP (tetrahydropyran) compound, ezetimibe ketone, benzylated ezetimibe and TBDMS (terc-butyl

dimethylsilyl) ketone were obtained from LGC Standards (Teddington, London, UK).

The chemical structure of the substances and their abbreviated names used in the study are illustrated in **Figure 1**.

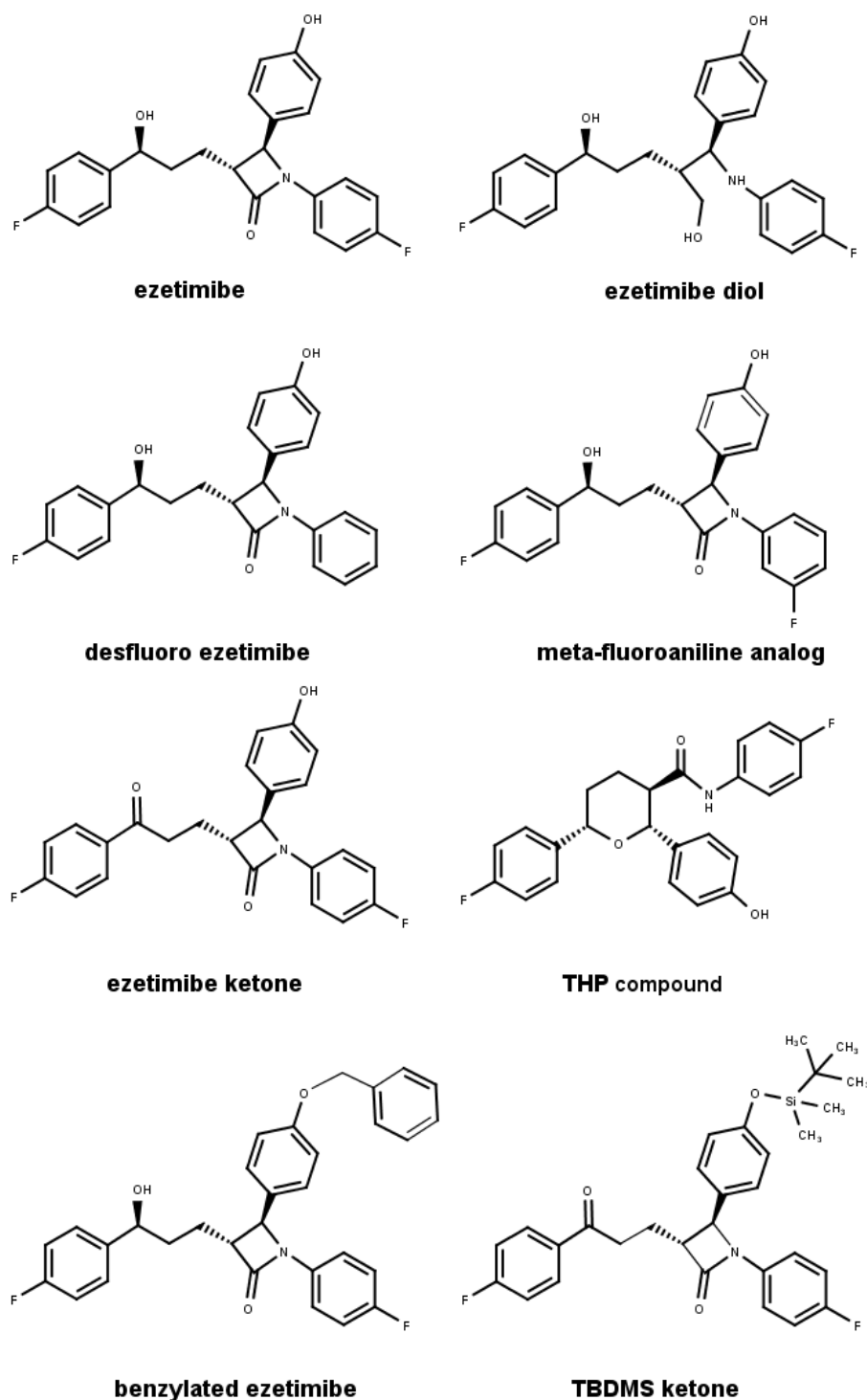


Figure 1. Chemical structure of the ezetimibe active substance and its related compounds, represented by the MarvinSketch software.

Solutions and samples

Since literature data suggest that ezetimibe is poorly soluble in water (solubility: approximately 4.4 mg/liter) [42], the samples prepared in this study were dissolved in an ACN:water mixture of 80:20 (vol%) ratio in an ultrasonic water bath. Prior to injection into the chromatography system, all samples were filtered through a Whatman Puradisc PTFE type syringe filter with a pore size of 0.45 μm (Merck, Darmstadt, Germany) and 10 μl were injected per sample.

Solution used for modelling

To confirm the reliability of the *in silico* robustness test, an artificial mixture was prepared containing the ezetimibe active substance at a concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$ and all the impurities tested, with the following composition: ezetimibe diol 8 $\mu\text{g/ml}$, desfluoro ezetimibe 4 $\mu\text{g/ml}$, meta-fluoroaniline analog 8 $\mu\text{g/ml}$, ezetimibe ketone 2 $\mu\text{g/ml}$, THP compound 4 $\mu\text{g/ml}$, benzylated ezetimibe 4 $\mu\text{g/ml}$ and TBDMS ketone 6 $\mu\text{g/ml}$. The different amounts play an important role as the identification of the substances on the chromatogram is based on the area under curve (AUC) during retention modelling. In our previous study, we used an artificial mixture with a similar composition for the method development [30].

Samples used for method validation

The optimized method has been validated in accordance with the current ICH Q2(R1) guideline [42]. Linearity, accuracy and precision were investigated and for all related compounds were determined the limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), relative retention time (RRT) and relative response factor (RRF) were defined.

To demonstrate the linear variation of the peak area as a function of concentration, a stock solution was prepared containing the ezetimibe active substance and all tested related compounds at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. This solution was diluted to 11 levels, covering the range 0.1-10 $\mu\text{g/ml}$ (0.01-1.00 % relative to 1000 $\mu\text{g/ml}$ ezetimibe content of real samples) and the analytical signal-concentration relationship was investigated from the resulting samples.

Accuracy was similarly examined at 11 levels in the linearity range. Fixed amounts of ezetimibe active substance and impurities were added to the placebo powder mixture and recoveries were determined from the resulting samples.

To demonstrate the precision of the system and the method, six real samples were prepared, to which a fixed amount (approximately 0.1%) of related substance stock solution was added and the resulting artificial samples were injected. The addition of impurities was necessary because the real samples did not contain all the compounds studied. To demonstrate intermediate precision, six more artificial samples were prepared the following day, as described above, and the results obtained on two different days were compared.

System suitability solutions

This solution is suitable for evaluating the performance of the chromatography system, provided that the baseline separation between the critical ezetimibe and meta-fluoroaniline peak pair is met, the selectivity of the system is adequate, and it is suitable for real sample analysis. As a first step, a meta-fluoroaniline stock solution is prepared and added at 2 $\mu\text{g/ml}$ to a solution containing 1000 $\mu\text{g/ml}$ ezetimibe. In the resulting solution, the concentration of ezetimibe is equal to the amount found in the real samples, while meta-fluoroaniline is present at 0.2 %, which is the maximum amount allowed according to the USP monography.

To quantify the impurity content of real samples, a reference solution of 2 $\mu\text{g/ml}$ ezetimibe was prepared by dissolving reference standard with known purity in an 80:20 (vol%) mixture of ACN-water used as solvent. The solution to be used to test the sensitivity of the system is a dilution of the reference solution at 0.1 $\mu\text{g/ml}$ containing ezetimibe at the limit of quantification. It is also referred to as a sensitivity solution and, if it provides a signal-to-noise ratio above 10 for the ezetimibe peak, the method can be used reliably for the quantification of contaminants in the validated concentration range (0.1-10 $\mu\text{g/ml}$).

Real samples used to test the applicability of the method

Following validation, the method was tested on real samples (commercially available ezetimibe tablets) to demonstrate its applicability. In a first step, the average weight of the tablets was determined and then they were powdered in a mortar. From the resulting fine powder mixture, a quantity corresponding to 10 mg of ezetimibe active ingredient was measured, 10 ml of solvent was added and then ultrasonicated for 10 minutes in an ultrasonic water bath. The amount of related substances

was expressed in the function of the resulting theoretical ezetimibe concentration (1000 µg/ml).

Applied equipment and computer programs

A Mettler-Toledo MT XPE 205 (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) analytical balance and an Elmasonic P180 H (Elma Schmidbauer, Singen, Germany) ultrasonic water bath were used for sample preparation in this study.

The chemical structure of the examined substances was presented using the MarvinSketch (ChemAxon, Budapest, Hungary [43]) software (see **Figure 1**).

The chromatographic measurements were performed on an Agilent Infinity 1260 (Santa Clara, California, USA), which consisted of the following units: a quaternary pump (G1311B), a column thermostat (G1316A), autosampler (G1367E) with thermostatted sample holder (G1330B) and a high dynamic range diode array detector (HDR-DAD) type detector (G4212B), which has a higher sensitivity than its conventional diode array counterpart due to the two series-coupled diode array detection systems. The first photocell has a volume of 4 µl and an optical path length of 60 mm, while in the second case these values are 0.9 µl and 3.7 mm. The system has a measured dead volume of 1000 µl. The chromatographic data were recorded and evaluated using OpenLab EZChromEdition software (Santa Clara, California, USA). After correct integration of the peaks, the chromatograms obtained from experimental runs for modelling were saved in AIA/ANDI format (*.cdf) and used as input data in the chromatographic retention modelling software.

The choice of the chromatographic column was based on the results of our previous study, which showed that for ezetimibe and its related substances, the gradient used has a much greater effect on the selectivity of the separation process than the chemical structure of the stationary phase. In the above study, using chromatographic retention modelling software, method parameters were identified that ensured baseline separation of ezetimibe related substances on stationary phases with nine different chemical structures [30]. On this basis, for the present study we chose a standard C18 type column, which is most likely to be found in any chromatography laboratory, in our case the Inertsil ODS-3, 150x4.6 mm, 3 µm particle loaded chromatography column.

During the method development process [30], and to perform the *in silico* robustness test and assess its reliability, the DryLab 4 (Molnár Institute, Berlin, Germany

[20]) chromatographic retention modelling software was used.

Results and discussion

Risk analysis, design of experiments and method development

In our previous study [30] we have described in detail the criteria for the selection of critical method parameters and, depending on these criteria, the one-, two- or three-dimensional experiments that can be performed with the DryLab software. The selection of the critical method parameters was based on a preliminary risk analysis, considering the specificities of reversed-phase liquid chromatography, and a three-dimensional *tG-T-tC* experiment was run in practice to develop a virtual separation model for nine different stationary phases. The other commonly used three-dimensional model is the *tG-T-pH* type, which has its justification when the effect of dissociation has a significant influence on the retention time of the peaks and thus indirectly on the selectivity of the method. This is not the case for ezetimibe related substances, as they have almost identical dissociation coefficients ($pK_a \sim 9.5$) and are almost entirely undissociated in the pH range applicable for reverse phase chromatography ($pH=2-8$), so that the pH of the mobile phase is not considered as a possible critical method parameter, and the *tG-T-tC* experimental design was chosen. The reliability of the *tG-T-tC* models was confirmed by several experimental runs and comparison of the models identified a common working point that allowed the separation of ezetimibe related substances independent of the chemical structure of the stationary phases. We also found good selectivity for the Inertsil ODS-3 C18 column, which was confirmed by several experimental runs [30]. Based on these favorable results and as type C18 is one of the most commonly used stationary phases, a virtual model of the Inertsil ODS-3 chromatography column was used to select the final method conditions, and the validation, robustness testing, the method applicability on real samples, control strategy and life cycle management are discussed in this paper.

Analytical target profile and final method selection

According to the ICH Q14 guideline, after the execution of the experimental design, the data are interpreted, keeping in mind the target analytical profile and critical analytical attributes. For the final method selection, we used

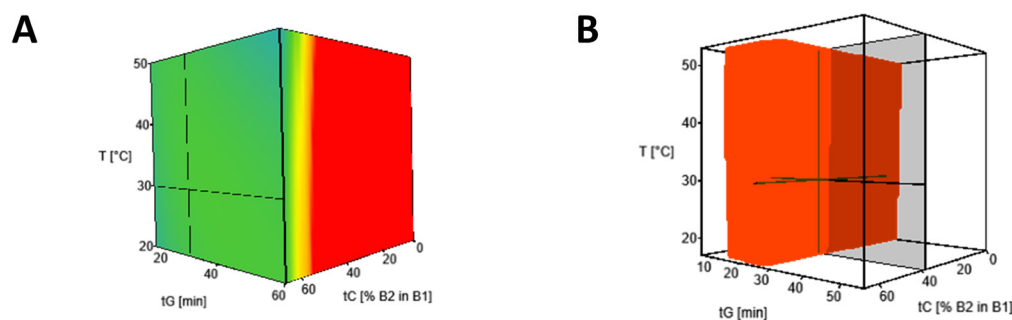


Figure 2. A: 3D virtual partitioning model, also known as knowledge space (or “cube”), and **B:** comparison of the design space.

the tG - T - tC virtual separation model detailed in our previous study [30], taking into account the analytical target profile set, according to which the method provides baseline separation of all examined related substances in less than 30 min, meeting the critical resolution $R_{s, \text{crit.}} \geq 2.0$. Critical resolution is the resolution calculated between the two closest peaks on the chromatogram. Based on the corner runs, the software plots the aforementioned 3D separation model, which contains all existing combinations of method parameters in the given range and is able to display the corresponding virtual chromatograms. According to the nomenclature used in the literature, the complete 3D space is the “cube” or knowledge space (KS), which provides information on the effect of the different factors on the separation process (Figure 2, A). In this case, the red color indicates the completion of the baseline separation ($R_{s, \text{crit.}} \geq 2.0$), the blue color indicates co-elution ($R_{s, \text{crit.}} = 0$), and the other colors (green, yellow, orange) illustrate the transition between the two states ($0 < R_{s, \text{crit.}} \leq 2.0$) as a function of the resolution. The design space (DS) is the narrowed part of the knowledge space where the method fits the target profile. In the multi-parameter optimization employed, it is possible to define a design space in which several critical characteristics are satisfied simultaneously, in this case the critical resolution and the analysis time, which can be quantified as the retention time of the last eluting peak. In this case, the design space shown in part B of Figure 2 satisfies both the analysis time (less than 30 minutes) and the critical resolution (greater than 2.0), so that the working point chosen here corresponds to the target profile defined in the first step of the development process. As Figure 2 illustrates, the design space corresponding to the analytical target profile usually represents only a small fraction of the total knowl-

edge space.

A major advantage of the DryLab program is its ability to display a virtual chromatogram for each point in the knowledge space, thus contributing to a better understanding of the separation process and the individual and combined effects of method parameters on critical resolution.

The results of the final method obtained in the experimental run and predicted by DryLab are summarized in Table 1. A very good matching can be observed in terms of retention times (only 0.37% difference) and critical resolution ($R_{s, \text{crit.}}$).

For optimal separation, a two-step gradient should be used. The first is a gentle upward slope of 15 minutes, followed by a steeper slope up to 98% organic composition, to ensure that components that are difficult to elute leave the column in a useful time. Regarding the ternary composition, the use of MeOH reduced the critical resolution and therefore it was decided to use 100% ACN, while 30 °C was considered ideal for the column temperature.

***In silico* robustness testing and its reliability**

When the final method was developed following the steps described above, an *in silico* robustness test was performed using DryLab to estimate the influence of small changes in method parameters on the method selectivity (critical resolution). Robustness refers to the tolerance of the method to parameter changes, which is of great importance for practical applications. In addition to the three method parameters (tG , T and tC) changed during corner runs, the program can predict the effect of changes in other method parameters such as flow rate, initial, intermediate, and final gradient composition, duration of different stages in the case of a multi-stage

Table 1. Parameters of the final method selected based on the *tG-T-tC* virtual separation model and comparison between the values predicted by DryLab and the practical values (retention time and critical resolution)

Chromatographic parameters	tG: 25 min, tC: 100% ACN T: 30 °C, flow rate: 1.50 ml/min		Gradient	
	DryLab	Experimental	Time (Minutes)	Organic mobile phase (%)
Retention time (minutes)				
Ezetimibe diol	8.68	8.70	0	38
Desfluoro ezetimibe	13.72	13.70	15	45
Ezetimibe	15.23	15.31	25	98
Meta-fluoroaniline analog	16.55	16.68		
THP compound	19.17	19.13		
Ezetimibe ketone	19.72	19.70		
Benzylated ezetimibe	23.23	23.35		
TBDMS ketone	26.62	26.49		
Average of retention time errors, %		0.37		
R _{s, crit.}	3.67	3.86		

tG: gradient time; tC: ternary composition; T: column temperature; **DryLab**: retention time calculated by the DryLab program; **Experimental**: retention time obtained in experimental run; **retention time error** (difference between experimental and theoretical retention times) = (DryLab-Experimental)/Experimental x 100 (%); R_{s, crit.}: resolution between the peak pair of ezetimibe and the meta-fluoroaniline derivative

gradient, or dead volume of the system. In the present case, seven variable parameters (flow rate (ml/min), total gradient time (min), duration of the first step of the gradient (min), column temperature (°C), initial gradient composition (%), gradient composition at 15 min (%), final gradient composition (%)) were calculated at three levels (-1, 0, +1) using full factorial simulation, giving a total of 2178 possible combinations ($7^3 = 2178$). The effect of the change in tC was not taken into account, as the final method uses 100% ACN as the organic mobile phase, so the ACN:MeOH ratio in the mobile phase is not practically relevant for routine applications. We have chosen influencing factors that can be practically varied or that may change slightly during routine application of the method. For this reason, the change in the dead volume

of the system was not taken into account, as this can only occur if the method is used on other chromatographic equipment. If necessary, calculations can be made for this parameter and the method can be optimized for another equipment, but this is not part of the present study. In the calculations, the optimum values of the final working point selected from the model were taken as the mean value and the parameters were varied in the same magnitude in the positive and negative directions, to the extent that they might occur in practice. **Table 2** summarizes the parameters chosen, their optimal values and the lower and upper limits used in the calculations.

The method can be considered robust over the calculated parameter ranges, i.e., it meets the minimum critical resolution of 2.0 for all 2178 possible combina-

Table 2. The method parameters selected for the *in silico* robustness test, their optimal values and the lower and upper limits used in the calculations.

Chromatographic parameter tested	Optimal value based on the tG-T-tC model	Limit values selected for <i>in silico</i> testing
Flow rate	1.5 ml/min	± 0.1 ml/min
Gradient time (full)	25 min	± 2 minutes
Duration of the first step of the gradient	15 min	± 1 minute
Stationary phase temperature	30 °C	± 2 °C
Initial gradient composition	38% ACN	± 3%
Gradient composition at 15 minutes	45% ACN	± 3%
Final gradient composition	98% ACN	± 1%

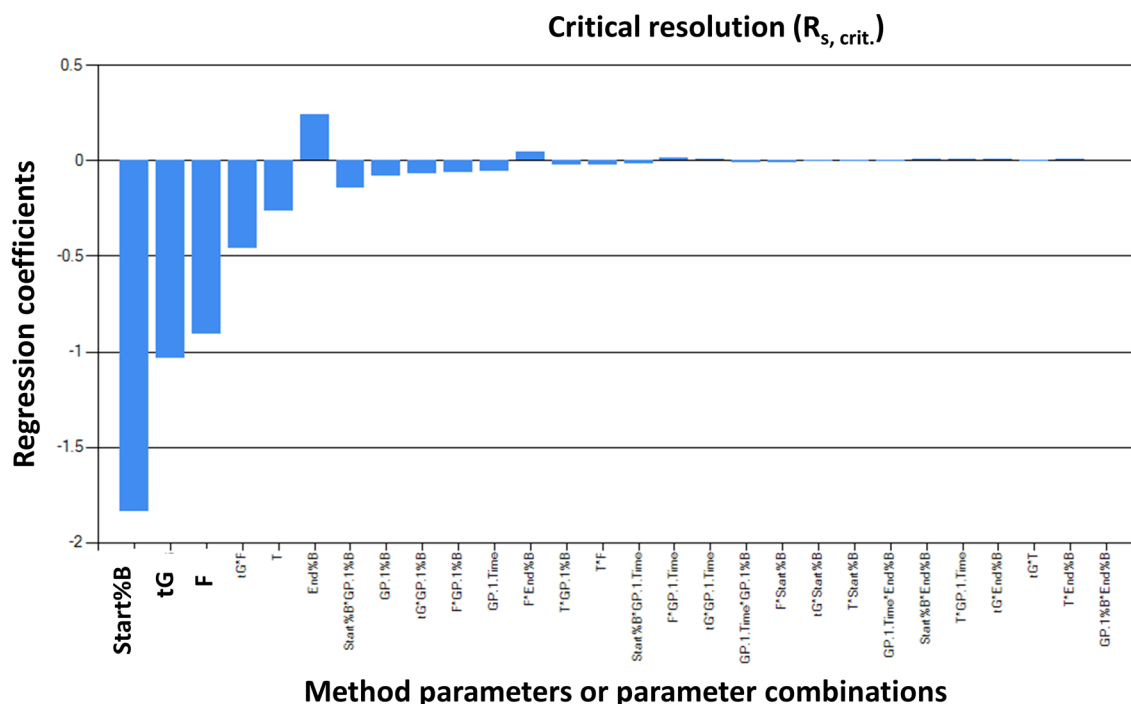


Figure 3. Individual and combined effects of method parameters on critical resolution ($R_{s, \text{crit.}}$). Regression coefficient as a function of method parameters or parameter combinations, highlighting the three most critical factors: initial gradient composition (*start%B*), total gradient time (*tG*), and mobile phase flow rate (*F*).

tions. In practice, this means that, if the parameters are varied within the specified limits during the application of the method, a good baseline separation is guaranteed. The parameter ranges thus defined are important for the accurate method description and for the definition of control strategies for routine use. Another useful feature of *in silico* robustness testing is that it provides information on the effect of parameters, individually or in combination, on the performance of the method. The results obtained are illustrated in **Figure 3**, where the most critical factors are the initial gradient composition (*start%B*), the total gradient time (*tG*) and the flow rate (*F*) and should therefore be given special attention when setting up the treatment strategy. To confirm the reliability of the *in silico* calculations, we selected 14 parameter combinations out of a possible 2178, among those that resulted in the lowest critical resolution values and performed them experimentally. After loading the resulting data, DryLab automatically compares the theoretical and experimental retention times and fits a linear mathematical model to the data to plot the values, as shown in **Figure 4**. It can be observed that there is excellent agreement ($R^2 = 0.9989$) in all 15 cases (14 least advantageous parameter combinations and the final method itself), confirm-

ing that DryLab is able to reliably predict the impact of method parameters on retention time and thus indirectly on selectivity. The results obtained suggest that the final method (**Table 1**) is robust and therefore suitable for routine application. Furthermore, it can be stated that the *in silico* robustness test predicted by DryLab provides reliable results and does not need to be confirmed by practical runs, saving time and effort during method development. However, it is important to emphasize that we can only rely on *in silico* calculations if we have previously verified the reliability of the virtual separation model by experimental runs.

Validation of the method

The final method was validated in accordance with ICH Q2(R1). Selectivity, linearity, accuracy, system precision, method precision (repeatability), intermediate precision were tested, and limit of detection, limit of quantification, relative retention times and relative response factors were determined. The results obtained are summarized in **Table 3**. Since the UV absorbance of the contaminant ezetimibe diol is low at 247 nm, all chromatograms were also recorded at the more favorable wavelength of 210 nm for ezetimibe diol during validation and calculations for this contaminant

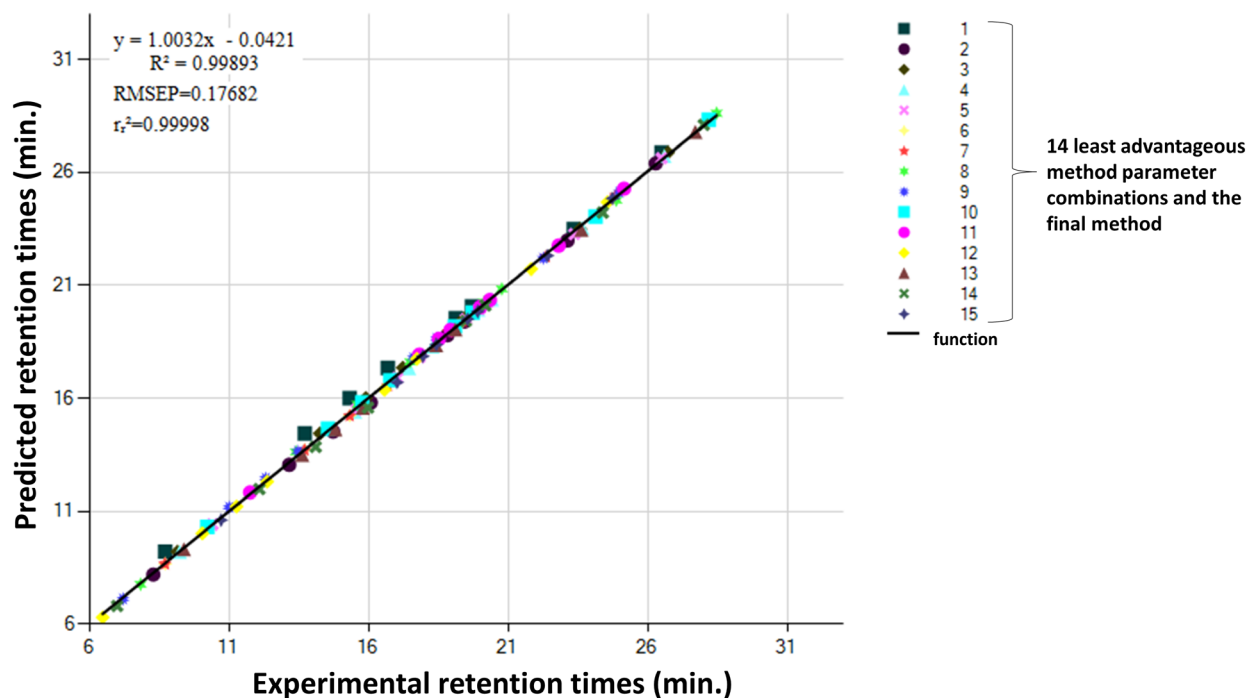


Figure 4. Comparison of the theoretical and experimental retention times obtained in the *in silico* robustness test for the 14 least advantageous parameter combinations and the final method.

were performed based on the resulting chromatograms. The concentration of ezetimibe in the real samples is 1000 µg/

ml and the amount of impurities was compared to this concentration during validation.

Table 3. Results of the validation of the method

Parameter	Ezetimibe diol	Desfluoro ezetimibe	Meta-fluoroaniline analog	THP compound	Ezetimibe ketone	Benzylated ezetimibe	TBDMS ketone	Ezetimibe
Retention time (minutes)	8.6	13.4	16.3	19.0	19.6	23.3	26.4	15.0
Relative retention time (RRT)	0.60	0.90	1.10	1.25	1.30	1.55	1.75	1.00
Linearity range (µg/ml)	0.1-10.0							
Linearity range (%)	0.01-1.00							
Determination coefficient (R^2)	0.99995	0.99997	0.99996	0.99996	0.99995	0.99997	0.99996	0.99996
Limit of detection (µg/ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Signal to noise ratio at the limit of quantification	13.5	21.2	18.1	15.9	69.5	25.2	19.0	18.2
Detection limit (µg/ml)	0.02	0.01	0.02	0.02	0.005	0.01	0.02	0.02
Relative response factor (RRF)	1.32	1.08	1.08	0.84	1.92	0.98	1.46	1.00
Average recovery (%)	97.96	99.85	100.07	99.76	99.14	102.92	96.08	100.48
System precision (RSD, %)	0.71	0.62	1.11	1.82	0.77	0.23	0.63	-
Method precision (RSD, %)	1.65	0.59	0.61	4.16	0.38	0.18	0.96	-
Intermediate precision (between days)	Anova analysis of variance							
	$F_{crit.}$	4.964						
	F_{calc}	0.544	0.157	3.289	0.404	0.279	0.493	3.972
								-

RSD - relative standard deviation

We prepared a placebo powder mixture containing all known excipients based on the product description of the ezetimibe tablets purchased from the pharmacy. A sample solution of the placebo was prepared in a similar way to real samples and injected into the chromatography system to ensure that the presence of excipients did not affect the qualitative and quantitative determination of ezetimibe impurities. In this respect, no interfering chromatographic peaks were found during the placebo solution analysis. For the real samples, the peak purity calculated from the UV spectra of the chromatographic peaks was followed to avoid co-elution of impurities and the resulting inaccurate quantification. The results obtained show that the method is selective, suitable for determination of known and unknown impurities and that the presence of excipients does not interfere with the determination of related substances.

The sensitivity of the method was characterized by the detection and quantification limits, which were defined as a function of the signal-to-noise ratio of the peaks. According to ICH Q2(R1), the signal-to-noise ratio for the limit of quantification should be greater than ten, while for the limit of detection a value greater than three should be achieved to obtain reliable identification and quantification. The limit of quantification was fixed uniformly at 0.1 µg/ml (0.01%) for all related substances, which was considered to be the lowest value of the linearity range. The signal/noise values obtained from the solution thus prepared were in all cases higher than 10, so that it can be stated that 0.1 µg/ml impurities is already quantifiable. Based on the signal/noise values obtained, the detection limits were calculated considering the signal/noise ≥ 3 criterion. The values are in the range 0.005-0.02 µg/ml and the results indicate that the method is considered to be sufficiently sensitive. The linearity was tested with solutions containing all impurities and the ezetimibe active substance in the range 0.1-10 µg/ml (0.01-1.00%) at 11 levels. For each compound, a calibration curve was constructed plotting the area under the curve as a function of solution concentration (expressed in µg/ml). The coefficient of determination (R^2 , square of the regression coefficient) was determined by the least squares method and was found to be greater than 0.99995 in all cases. The calibration line crossed the zero point (95% confidence interval) for all compounds tested and the scatter plot of the residuals showed a random distribution. As a ratio of the slopes of the calibration curves, the relative response factor of the impurities was determined by dividing the

slope of the calibration curve of the impurity by the slope of the calibration curve of the ezetimibe active substance. The relative retention time of the impurities was calculated in a similar way by dividing the retention time of the impurity by that of the ezetimibe active substance. Relative retention times play an important role in practice in the identification of related substances from real samples, since it is sufficient to know the retention time of the ezetimibe peak and then to calculate the expected retention time of the impurities. The same is true for the relative response factor, which can be used to determine the exact amount of impurities in relation to a reference solution containing ezetimibe alone.

Accuracy was also tested at 11 levels covering the range of linearity, with a fixed amount of impurities and ezetimibe added to the placebo powder mixture. Recovery values were calculated using the calibration equations defined at linearity and expressed as percentages. The values obtained were in the range 96.08-102.92%, supporting the reliability of the quantification of the related substances.

To assess precision, real sample was used, to which a stock solution of 1 µg/ml (0.1%) of each impurity was added. Six solutions were prepared on the first day and six on the second day to test the intermediate precision. To evaluate system precision, the same solution was injected seven times in succession and relative standard deviations were calculated for area under curve values for each impurity. The values obtained were in the range 0.23-1.82%, demonstrating the precision of the system. The repeatability of the method was evaluated based on six samples by calculating the relative standard deviations for each impurity. The precision of the method is supported by values ranging from 0.18 to 4.16%. The intermediate precision was evaluated based on six samples taken identically on the first and second days using single factor Anova analysis of variance. The condition $F_{\text{calc.}} > F_{\text{crit.}}$ was met for all related substances and consequently no significant differences were found between the tests performed on different days, thus demonstrating intermediate precision of the method.

The stability of the samples was assessed by using seven consecutive injections (approximately 5 hours between the first and the seventh injection) as a basis for the precision of the system, and by re-injecting the solution after 24 hours. Based on the literature data, THP compound and ezetimibe ketone are the main degradation products and therefore we focused on these two related substances.

The amount of the ezetimibe ketone impurity did not increase after 24 h, but the amount of the THP compound increased by 0.005% after five hours and by 0.02% after 24 hours, which is significant. This partly explains the relatively high relative standard deviation values for the THP compound, for system precision (1.82%) and method accuracy (4.16%). Based on the results obtained, it is recommended to inject the solutions fresh, at the latest five hours after preparation, to ensure accurate quantification of the impurities.

The results summarized in **Table 3** show that the method meets the requirements of the ICH Q2(R1) guideline, is selective, sensitive, linear, and accurate, and is therefore suitable for the impurity analysis of ezetimibe tablets.

Testing the method on real samples

Three commercially available tablets containing ezetimibe from different manufacturers were purchased from a pharmacy in Târgu Mures and analyzed using our validated method. We sampled three different batches from the first manufacturer to investigate the differences in the quantitative and qualitative composition of impurities between the different batches. The results obtained are summarized in **Table 4**, highlighting separately the amount of known degradation products (THP compound and ezetimibe ketone). **Figure 5** shows the chromatograms of two real samples from different manufacturers and, for comparison, a sample used for the accuracy study, including the known impurities and the ezetimibe active substance. In **Figure 5**, we also plot the unknown impurities (labels 9 a-d) and the signals from the solvent (blank solution) (10 a-c).

Based on the results obtained, it can be observed that the content of impurities in products from different manufacturers differs both quantitatively and qualitatively. This difference is also present for different batches from the same manufacturer, probably due to qualitative differences between the batches of ezetimibe active ingredient used. All five samples tested complied with the USP monography on ezetimibe tablets, which requires that the value of ezetimibe ketone, THP compound and individual unknown impurities should be less than 0.20% and the total impurity content should be less than 0.60%. [38]. Based on the results obtained, it can be stated that the tested ezetimibe-containing tablets comply with the United States Pharmacopoeia (USP) requirements for impurity content and the method developed and validated by us is suitable for the quantitative and qualitative determination of known and unknown related substances from real samples.

Description of the final method, control strategy and life cycle management

The detailed description of the final method is summarized in the first part of **Table 5**, giving the optimal values of the method parameters and the parameter intervals determined during the *in silico* robustness test, which ensure the proper performance of the method in routine use. A detailed and clear description, the so-called specification, is important to ensure that the method can be reproduced independently of the laboratory and its personnel. The second half of **Table 5** also contains the system suitability criteria that the method must meet without exception to provide reliable results on the impurity con-

Table 4. Impurity content of real samples used to test the method

Manufacturer		1			2	3
Batch		1	2	3	1	1
Known impurities	Highest individual value (%)	0.07 (ezetimibe ketone)	0.05 (desfluoro ezetimibe)	0.03 (THP compound)	0.08 (THP compound)	0.09 (desfluoro ezetimibe)
	THP derivative (%)	0.03	0.02	0.03	0.08	0.03
	Ezetimibe ketone (%)	0.07	0.03	0.03	0.01	0.01
	Total quantity (%)	0.14	0.10	0.07	0.14	0.16
Unknown impurities	Highest individual value (%)	0.04 (RRT=1.45)	0.04 (RRT=1.45)	0.02 (RRT=1.43)	0.01 (RRT=1.20)	0.02 (RRT=1.41)
	Total quantity (%)	0.10	0.10	0.03	0.03	0.02
Total impurity content (%)		0.24	0.20	0.10	0.17	0.17

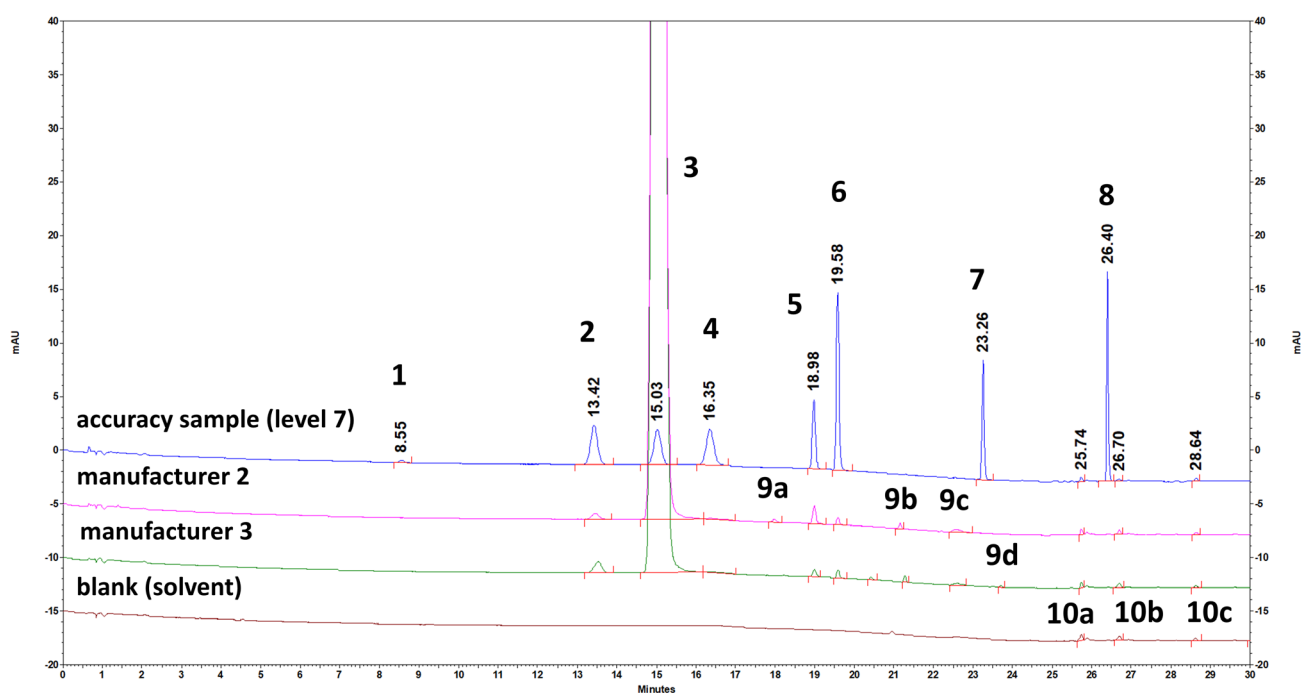


Figure 5. Comparison of the chromatograms of real samples from two different manufacturers (manufacturer 2 and 3), the sample used for the accuracy study (level 7) and the blank solution (solvent) (**1.** ezetimibe diol, **2.** defluoro-ezetimibe, **3.** ezetimibe, **4.** meta-fluoroaniline analog, **5.** THP compound, **6.** ezetimibe ketone, **7.** benzylated ezetimibe and **8.** TBDMS ketone, **9 a-d.** unknown impurities, **10 a-c.** signals from solvent)

tent of samples.

Detection at two wavelengths may complicate the applicability of the method, but based on tests on real samples, it is concluded that the ezetimibe diol impurity is not present in any of the samples tested, so from a practical point of view, this is negligible. The validation also showed that 0.05% of ezetimibe diol can be detected at 247 nm, so it is sufficient to record chromatograms of sample solutions at this wavelength only.

The control strategy includes a precise description of the method with robust parameter intervals and system suitability criteria. They are closely interrelated and essential for the proper implementation of the control strategy. If the method is applied as described, the system suitability criteria will be met and hence the results obtained will be reliable. The reverse is also true, if the system suitability criteria are met, the method will operate correctly. The more the robustness interval is known for a given number of method parameters, within which a given parameter can vary without negatively affecting the system suitability criteria, the more robust the method is considered to be. The more robust a method is, the easier it is to reproduce and the less likely it is to produce erro-

neous results. Three solutions are generally used to assess the suitability of a system. The first step is to inject a system suitability solution containing the ezetimibe active substance at the concentration corresponding to the real samples (1000 µg/ml) and the critical related compound at the maximum allowable concentration (2 µg/ml, 0.20%), in this case meta-fluoroaniline, which elutes closest to the active substance. The resulting chromatogram can be used to check the retention times and subsequently to identify other impurities based on the relative retention times. The critical resolution can also be used to assess selectivity. If the critical resolution is adequate, it is very likely that all substances will be separated with adequate selectivity. Secondly, it is recommended to inject a reference solution containing only ezetimibe at the maximum level allowed for related compounds, in this case 2 µg/ml (0.20%). From this solution, several parallel injections are recommended, and the averages obtained are used to characterize the suitability of the chromatographic system itself in terms of peak symmetry, theoretical plate count and standard deviation of the area under the curve values. These so-called performance criteria carry different information, e.g., low plate num-

Table 5. Optimal values of the method parameters, parameter ranges determined in the *in silico* robustness test and system suitability criteria.

Method description		
Parameter	Optimum value and robustness interval	
Chromatography column	Inertsil ODS-3, 150x4.6 mm, 3 μ m	
Flow rate	1.5 $\pm$ 0.1 ml/min	
Column temperature	30 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C	
Detection wavelength	247 nm (known and unknown impurities except ezetimibe diol) 210 nm (ezetimibe diol)	
Mobile phase	A: 0.1% phosphoric acid aqueous solution B: ACN	
Analysis time	30 minutes (+ 10 minutes equilibration time after each injection)	
Injected volume	10 μ l	
Solvent for sample preparation	ACN-water 80:20 (V/V %)	
Gradient	Time (minutes)	Mobile phase A (%)
	0	62
	15 $\pm$ 1	55
	25 $\pm$ 2	2
	30	2
Column equilibration after injection	Time (minutes)	Mobile phase B (%)
	0	38 $\pm$ 3
	5	45 $\pm$ 3
	10	98 $\pm$ 1
	30	98 $\pm$ 1
System suitability criteria		
Applied solution	Parameter	Appropriate value
System suitability solution (1000 μ g/ml ezetimibe and 2 μ g/ml meta-fluoroaniline, 0.02%) (1 injection)	R _t ezetimibe	15 $\pm$ 1 min
	R _t meta-fluoroaniline	16.3 $\pm$ 1 min
	R _{s, crit} (between ezetimibe and meta-fluoroaniline)	$\geq$ 2.0
Reference solution (2 μ g/ml ezetimibe, 0.20%) (averages based on 3-5 injections)	N ezetimibe	$\geq$ 1000
	A ezetimibe	0.8 $\leq$ A $\leq$ 2.0
	RSD	$\leq$ 5.0%
Sensitivity solution (0,1 μ g/ml ezetimibe, 0,01%) (1 injection)	S/N ezetimibe	$\geq$ 10

R_t - retention time; R_{s, crit.} - critical resolution between ezetimibe and meta-fluoroaniline; S/N - signal to noise ratio; A - peak symmetry; N - theoretical plate number; RSD - relative standard deviation

ber or inadequate symmetry indicates the state of the stationary phase, whereas the standard deviation of the area under the curve values characterizes the precision of the injection of the chromatographic system. The peak area under the curve obtained during the injection of the reference solution is used as a reference for the quantification. The third solution used is the system sensitivity

solution containing the ezetimibe active substance at the limit of quantification (0.1 μ g/ml, 0.01 %), the value of the peak signal/noise ratio of ezetimibe obtained characterizing the sensitivity of the system. If the value obtained is greater than 10, the system can be used reliably for the quantification of contaminants in the validated concentration range.

Life cycle management means the follow-up and optimization of the method, if necessary, in case of routine application by method transfer or other chromatography equipment. During the life cycle, the performance of the method can be monitored and evaluated by using solutions (system suitability solution, reference solution and system sensitivity solution) to test the suitability of the system. If values are obtained that differ from the system suitability criteria given in the method specification (especially for retention times and resolution), but the separation model is known, i.e., the effect of each parameter on separation is known, it is possible to optimize the method parameters based on the design space. This is often necessary to apply the same method to different chromatographic systems (different mobile phase mixing systems, different dead volume). According to the ICH Q8 guideline, if the parameter modification is justified and within a known design space, it is not necessary to revalidate the method [10]. This is a significant advantage over traditional method development where any method parameter change requires approval by the authorities and method revalidation. In such a case, the impact of the method parameter change on performance is not known and thus the design space cannot be defined. In summary, in the case of empirical development, the scientific basis for the change is missing, whereas in the case of method development based on quality by design, it is present, consciously building quality into the final method.

Conclusions

In conclusion, we have succeeded in developing a chromatographic method that fulfils the steps of the ICH Q14 enhanced approach, with emphasis on sample characterization, defining the analytical target profile, carrying out a risk analysis based experimental design, and then a detailed method description including critical method parameter limits, system suitability criteria, and management strategy information. Furthermore, it was demonstrated that the use of modelling programs such as DryLab greatly facilitates the understanding of the separation process and that *in silico* robustness testing provides reliable information on the impact of method parameters on selectivity. By designing experiments and then using the data to select optimal method parameters and predict robustness, it provides a scientific basis for method development and puts tools in the hands of

development practitioners that empirical approaches cannot provide. Finally, a method has been developed which, based on validation, is selective, linear, accurate, sensitive, robust and, last but not least, applicable to the qualitative and quantitative analysis of the impurity content of real samples containing ezetimibe. The method described in this study may be suitable to replace even the impurity profiling methods described in the drug and tablet USP monographies for ezetimibe, as it surpasses them in both efficiency and flexibility.

Acknowledgements

The present work was supported by the Collegium Talentum programme of Hungary and a research grant (contract number 136/2021) from the Medicine and Pharmacy Department of Transylvanian Museum Association and the Faculty of Pharmacy of Semmelweis University. The authors would like to thank the Molnár Institute for their continued assistance with issues arising during the use of Drylab.

List of abbreviations

3D - three-dimensional
ACN - acetonitrile
USA - United States of America
AQbD - Analytical Quality by Design
AUC - area under curve
CAA - Critical Analytical Attributes
CMP - Critical Method Parameters
DAD - diode array detector
DS - design space
F - flow
HDR-DAD - high dynamic range diode array detector
HPLC - high pressure liquid chromatography
HPLC - high performance liquid chromatography
ICH - International Conference on Harmonization
ICH Q2 - International Conference on Harmonisation - 2nd Guideline on Quality Assurance, on the validation of analytical methods
ICH Q14 - International Conference on Harmonisation - 14th Guideline on Quality Assurance, on the improvement of analytical methods
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

KS - knowledge space
LOD - limit of detection
LOQ - limit of quantification
MeOH - methanol
MODR - Method Operational Design Region
N - theoretical plate number
OFAT - One Factor At a Time
PTFE - polytetrafluoroethylene
QbD - Quality by Design
QbT - Quality by Testing
R - regression coefficient
R² - coefficient of determination
RP - reversed-phase
RRF - relative response factor
RRT - relative retention time
R_{s, crit.} - critical resolution
RSD - relative standard deviation
Rt - retention time
S/N signal to noise ratio
startB% - initial composition of gradient
T - column temperature
A - tailing factor (peak symmetry)
TBDMS - terc-butyl-dimethylsilyl
tC - ternary composition
tG - gradient time
THP - tetrahydropyran
USP - United States Pharmacopeia
UV - ultraviolet

References

1. Molnár I. - *Searching for robust HPLC methods - Csaba Horváth and the Solvophobic Theory*, Chromatographia, 2005,62:s7-17.
2. Olsen BA, Castle BC, Myers DP. - *Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities*, TrAC Trends Anal Chem, 2006,25:796-805.
3. Görög S. - *Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade*, TrAC Trends Anal Chem, 2018,101:2-16.
4. Ferencz E, Kelemen ÉK, Obreja M, Sipos E, Vida S, Urkon M, et al. - *Computer-assisted UHPLC method development and optimization for the determination of albendazole and its related substances*, J Pharm Biomed Anal, 2021,203:114203.
5. Kormány R, Molnár I, Fekete J. - *Renewal of an old European Pharmacopoeia method for Terazosin using modeling with mass spectrometric peak tracking*, J Pharm Biomed Anal, 2017,135:8-15.
6. Enesei D, Kapui I, Fekete S, Kormány R. - *Updating the European Pharmacopoeia impurity profiling method for terazosin and suggesting alternative columns*, J Pharm Biomed Anal, 2020,187:113371.
7. Horvath C, Melander W, Molnar I. - *Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases*, J Chromatogr, 1976,125:129-56.
8. Horváth C, Melander W, Molnár I. - *Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases*, Anal Chem, 1977,49:142-54.
9. Horvath C, Melander W, Molnar I, Molnar P. - *Enhancement of Retention by Ion-Pair Formation in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases*, Anal Chem, 1977,49:2295-305.
10. International Council for Harmonisation. ICH Q8 (R2) - Pharmaceutical Development. 2009.
11. Grangeia HB, Silva C, Simões SP, Reis MS. - *Quality by design in pharmaceutical manufacturing: a systematic review of current status, challenges and future perspectives*, Eur J Pharm Biopharm, 2020,147:19-37.
12. Tome T, Žigart N, Časar Z, Obreza A. - *Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances*, Org Process Res Dev, 2019,23:1784-802.
13. Peraman R, Bhadrara K, Padmanabha Reddy Y. - *Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics*, Int J Anal Chem, 2015,2015:868727.
14. Parr MK, Schmidt AH. - *Life cycle management of analytical methods*, J Pharm Biomed Anal, 2018,147:506-17.
15. Reid G, Margado J, Barnett K, Harrington B, Wang J, Harwood J, et al. - *Analytical Quality by Design (AQbD) in Pharmaceutical Development | American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology*, Am Pharm Rev, 2013,. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/144191-Analytical-Quality-by-Design-AQbD-in-Pharmaceutical-Development/> (accessed July 26, 2022).
16. Kochling J, Wu W, Hua Y, Guan Q, Castaneda-Merced J. - *A platform analytical quality by design (AQbD) approach for multiple UHPLC-UV and UHPLC-MS methods development for protein analysis*, J Pharm Biomed Anal, 2016,125:130-9.
17. Wechsler J. - *Quality by Design for Analytical Methods: Implications for Method Validation and Transfer*, Pharm Technol, 2012,. <https://www.pharmtech.com/view/quality-design-analytical-methods-implications-method-validation-and-transfer> (accessed July 27, 2022).
18. Tome T, Casar Z, Obreza A. - *Development of a Unified Reversed-Phase HPLC Method for Efficient Determination of EP and USP Process-Related Impurities in Celecoxib Using Analytical Quality by Design Principles*, Molecules, 2020,25:809.
19. International Council for Harmonisation. ICH Q14 - Analytical Procedure Development - draft. 2022.
20. DryLab, n.d. <https://molnar-institute.com/drylab/> (accessed September 16, 2020).
21. Lewis JA, Lommen DC, Raddatz WD, Dolan JW, Snyder LR, Molnar I. - *Computer simulation for the prediction of separation as a function of pH for reversed-phase high-performance liquid chromatography: I. Accuracy of a theory-based model*, J Chromatogr A, 1992,592:183-95.
22. Molnar I. - *Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software*, J Chromatogr A, 2002,965:175-94.
23. Molnár I, Monks KE. - *From Csaba Horváth to Quality by Design: Visualizing Design Space in Selectivity Exploration of HPLC Separations*, Chromatographia, 2011,1:5-14.
24. Kormány R, Rác N, Fekete S, Horváth K. - *Development of*

- a Fast and Robust UHPLC Method for Apixaban In-Process Control Analysis, *Molecules*, 2021,26:3505.
25. Guichard N, Fekete S, Guillaume D, Bonnabry P, Fleury-Souverain S. - Computer-assisted UHPLC-MS method development and optimization for the determination of 24 antineoplastic drugs used in hospital pharmacy, *J Pharm Biomed Anal*, 2019,164:395-401.
26. Rác N, Molnár I, Zöldhegyi A, Rieger HJ, Kormány R. - Simultaneous optimization of mobile phase composition and pH using retention modeling and experimental design, *J Pharm Biomed Anal*, 2018,160:336-43.
27. Zöldhegyi A, Rieger HJ, Molnár I, Fekhetdinova L. - Automated UHPLC separation of 10 pharmaceutical compounds using software-modeling, *J Pharm Biomed Anal*, 2018,156:379-88.
28. Fekete S, Molnár I. Software-Assisted Method Development in High Performance Liquid Chromatography. World Scientific (Europe); 2018,.
29. Jayaraman K, Rajendran AK, Kumar GS, Bhutani H. - A methodology employing retention modeling for achieving control space in liquid chromatography method development using quality by design approach, *J Chromatogr A*, 2021,1635:461658.
30. Ferencz E, Zöldhegyi A, Kelemen ÉK, Obreja M, Urkon M, Sipos E, et al. - Analytical quality by design-compliant retention modeling for exploring column interchangeabilities in separating ezetimibe and its related substances, *J Chromatogr A*, 2022,1682:463494.
31. Bays H. - Ezetimibe, *Expert Opin Investig Drugs*, 2005,11:1587-604.
32. Kang MK. - Ezetimibe, *Stroke Revisit Dyslipidemia Stroke*, 2021,8:91-101.
33. Shaya FT, Sing K, Milam R, Husain F, del Aguila MA, Patel MY. - Lipid-Lowering Efficacy of Ezetimibe in Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analyses, *Am J Cardiovasc Drugs*, 2020,20:239-48.
34. Sasikala CHVA, Padi PR, Sunkara V, Ramayya P, Dubey PK, Uppala VBR, et al. - An Improved and Scalable Process for the Synthesis of Ezetimibe: An Antihypercholesterolemia Drug†, *Org Process Res Dev*, 2009,13:907-10.
35. Śnieżek M, Stecko S, Panfil I, Furman B, Chmielewski M. - Total Synthesis of Ezetimibe, a Cholesterol Absorption Inhibitor, *J Org Chem*, 2013,78:7048-57.
36. International Council for Harmonisation.ICH Q3A - Impurities in new drug substances. 2006,.
37. International Council for Harmonisation - ICH Q3B - Impurities in new drug products. 2006,.
38. Ezetimibe Tablets monograph. United States Pharmacop. - Natl. Formul., vol. Issue 1, 2022,.
39. Desai PR, Mehta PJ, Ojha SK, Chokshi AB. - Simultaneous quantification of related substances of ezetimibe and simvastatin in combined dosage form using a novel stability-indicating liquid chromatographic method, *Acta Chromatogr*, 2018,30:85-94.
40. Rocha LP, Cabral LM, Pinto EC, de Sousa VP. - Ezetimibe: A Review of Analytical Methods for the Drug Substance, *Pharmaceutical Formulations and Biological Matrices*, *Crit Rev Anal Chem*, 2020,:1-16.
41. Ezetimibe monograph. United States Pharmacop. - Natl. Formul., vol. Issue 1, 2022,.
42. International Council for Harmonisation.ICH Q2 (R1) - Validation of analytical procedures.1995,.
43. Marvin | ChemAxon, n.d. <https://chemaxon.com/products/marvin> (accessed September 17, 2020).

Minőségtervezésen alapuló módszerfejlesztés az ezetimib rokonvegyületeinek meghatározására nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

Ferencz Elek^{1,3} Sipos Emese², Kelemen Éva-Katalin³, Obreja Mona⁴, Urkon Melinda⁵, Tóth Gergő⁶, Szabó Zoltán-István⁷

¹Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Fizikai Kémia Tanszék, Marosvásárhely; ²Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Ipari Gyógyszerészet és Gyógyszerészeti Menedzsment Tanszék, Marosvásárhely; ³Gedeon Richter Románia, Fejlesztési Analitikai Osztály, Marosvásárhely; ⁴Gedeon Richter Románia, Termékfejlesztési Főosztály, Marosvásárhely; ⁵Marosvásárhelyi „George Emil Palade” Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány és Technológiai Egyetem, Farmakológia és Klinikai Gyógyszerészet Tanszék, Marosvásárhely; ⁶Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészeti Kémia Intézet, Budapest; ⁷Sz-imfidum Kft., Nyujtód

Összefoglaló • A gyógyszeripar az egyik leggyorsabban változó és fejlődő iparágak közé tartozik, ennek következményeként a gyógyszerek minőségének biztosítására használt kromatográfiás módszerek is folyamatos fejlődésben vannak, szem előtt tartva az aktuális hatósági szabályozásokat. A minőségbiztosítási irányelvek kimondják, hogy minden olyan paraméter hatását, amely a minőséget és az eredményeket befolyásolhatja, szükséges előre jelezni és szabályozni, annak érdekében, hogy a vizsgálati módszerek biztonságosak és megbízhatóak legyenek. Ezt a megközelítést nevezik minőségtervezésen alapuló módszerfejlesztésnek, és egyre gyakrabban alkalmazzák sikeresen a kromatográfiában is. Ebben az esetben a módszerfejlesztés egyik alappillére az előre megtervezett kísérletek eredményeként létrejövő tervezési tér, mely hozzájárul az elválasztási folyamatok jobb megértéséhez, valamint rugalmasságot és robusztusságot biztosít a végső módszernek. A kísérlettervek felépítéséhez, valamint az adatok kiértékeléséhez alkalmazható számítógépes statisztikai vagy modellező szoftverek számos lehetőséget biztosítanak, amit az empirikus fejlesztés nem tesz lehetővé. Ilyen például az optimális működési körülmények előrejelzése, vagy az *in silico* robusztusságvizsgálat, amelyek által érthetővé válnak a módszer paramétereinek az elválasztásra gyakorolt egyéni és kombinált hatásai. Jelen tanulmány a kromatográfiás módszerfejlesztés lépéseit mutatja be az ICH Q14 irányelv szerint, szem előtt tartva a minőségtervezés alapelveit és kihasználva a DryLab kromatográfiás modellező szoftver nyújtotta lehetőségeket. Gyakorlati példaként az ezetimib szennyeződések vizsgálati módszerének fejlesztését mutatjuk be, kitérve a kísérlettervezésre, módszer optimalizációra, robusztusság vizsgálatra, validálásra, módszer specifikációra és életciklus menedzsmentre, továbbá a módszer alkalmazhatóságának vizsgálatára valós mintákon. Munkánk során bebizonyítottuk, hogy a kísérlettervezésen alapuló retenció modellezés a minőségtervezés hatékony eszköze, továbbá az *in silico* robusztusság vizsgálat alkalmas a kritikus módszerparaméterek azonosítására, illetve szabályozó stratégiák felállítására, időt és energiát takarítva meg a fejlesztő analitikusok és az illetékes hatóságok számára egyaránt. A kromatográfiás módszerfejlesztésben, egy szigorú és rögzített szabályokon nyugvó, merev rendszer helyett, kulcsfontosságú szerepet kap az elválasztási folyamatok megértése, a rugalmasság és a hatékonyság. Jelen tanulmány célja az új szemléletmód bemutatása és népszerűsítése a kromatográfiával foglalkozó szakemberek körében.

Kulcsszavak • minőségtervezés, kromatográfia, DryLab, ezetimib, ICH Q14

DOI: 10.2478/orvtudert-2022-0003

Bulletin of Medical Sciences 2022, 95(1): 31–63

Horváth Csaba neve minden kromatográfiában jártas szakember számára ismerős. Ő volt az a magyar származású vegyészmérnök, aki az 1960-as évek végén a Yale Egyetemen megtervezte és megalkotta az első nagy-nyomású folyadékkromatográfiás rendszert. A ma már

közismert HPLC megnevezés kevéssel ezután került be a tudományos köztudatba [1], először mint nagy-nyomású folyadékkromatográfia (*high pressure liquid chromatography*), majd később mint nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (*high performance liquid chroma-*

tography). Azóta ez az elválasztástechnikai módszer az egyik leggyakrabban alkalmazott eszközzé vált a különböző iparágak, de főleg a gyógyszeripari minősbiztosítási rendszerben. Ezen belül is az egyik leggyakrabban alkalmazott terület a gyógyszermolekulák rokonvegyületeinek azonosítása és mennyiségi meghatározása, ahol amolyan „*aranystandard*” módszerként tartják számon [2,3]. Ahhoz, hogy az évről évre szigorodó hatósági előírásoknak eleget lehessen tenni, maga a kromatográfiás technológia és az alkalmazott berendezések is folyamatos fejlődésben vannak, aminek következtében évről évre számos új fejlesztés lát napvilágot a hatékonyság növelésének érdekében [4–6]. A hatékony módszerfejlesztés alapköve az elválasztási folyamat megértése, amelyhez nagymértékben hozzájárul a szintén Horváth Csaba nevéhez fűződő szolvofób elmélet, amely magyarázza a fordított fázisú kromatográfiára jellemző kölcsönhatásokat, így gyakorlatilag feltérképezve az elválasztási folyamat alapvető törvényszerűségeit. A szolvofób elméletet leíró, három részből álló tanulmány sorozat [7–9] a mai napig a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia elméleti alapját képezi és összességében több mint 1800 idézettséggel rendelkezik, alátámasztva rendkívüli jelentőségét [1].

A gyógyszeriparban alkalmazott kromatográfiás módszereknek számos hatósági irányelvnek kell megfelelniük, alkalomadtán fejtörést okozva a módszerfejlesztő szakemberek számára. A hagyományos módszerfejlesztés során az egyszerre egy faktor változtatása (*OFAT – One Factor At a Time*) elvet alkalmazzák és a módszerparamétereket egyénileg, egymástól függetlenül vizsgálják azzal a céllal, hogy meghatározzák az optimális értéket. Ezt a megközelítést empirikusnak is nevezik, mivel nagymértékben alapoz a fejlesztő analitikus tapasztalatára. Ezzel szemben létezik egy tudományos alapokon nyugvó szemlélet, a tervezett minőség (*QbD – Quality by Design*), melynek alapelve, hogy a minőséget bele kell építeni a módszerbe már a fejlesztés során, ellentétben az empirikus megközelítéssel, ahol a kromatográfiás módszer teljesítménye a csak a fejlesztési folyamat befejezte után kerül tesztelésre (*QbT – quality by testing*). Ezt a megközelítést először az ICH Q8(R2) irányelvben fogalmazták meg a gyógyszeripari hatóságok, mint: „*a fejlesztési folyamat tudományos alapokon nyugvó és tervszerű megközelítése, amely előre meghatározott célokkal indul és hangsúlyt fektet a folyamatok (és termékek) megértésére, irányítására felhasználva a kockázatkezelés eszközeit*” [10]. Első körben a gyártási folyamatok optimalizálására használták [11], majd később számos tanulmány látott

napvilágot, melyekben sikeresen alkalmazták analitikában (*AQbD – Analytical Quality by Design*) is, főként kromatográfiás módszerek fejlesztése esetén [12]. Mivel nem volt egységes álláspont a hatóságok részéről az analitikai módszereket illetően, a különböző kutatócsoportok és szervezetek megfogalmazták saját nézőpontjukat arról, hogy melyek az AQbD folyamat legfontosabb elemei és kötelező lépései [13–18]. Ennek a zűrzavaros időszaknak hivatott véget vetni az ICH Q14 irányelv, amelynek első (nem végleges) változata 2022 márciusában jelent meg. Az analitikai módszerek fejlesztése esetén részletesen, gyakorlati példákon keresztül szemlélteti a tervezett minőség koncepció alkalmazásának lépéseit és elemeit [19]. Az irányelv említést tesz egy egyszerűsített fejlesztési megközelítésről (*minimal approach*) ami gyakorlatilag ugyanaz, mint a fent említett empirikus módszerfejlesztés, valamint egy továbbfejlesztett vagy javított módszertanról (*enhanced approach*), amely eleget tesz az AQbD követelményeinek. A hatóságok nyilvánvalóan az utóbbit támogatják, egyelőre csak ajánlás szinten, később valószínű, hogy kötelezővé válik a gyógyszeriparban alkalmazott analitikai módszerek esetén. A továbbfejlesztett megközelítés első lépése a vizsgálni kívánt minta megismerése és az analitikai szempontból jelentős mennyiségi és minőségi jellemzőinek feltérképezése, mint például oldhatóság, sav-bázis tulajdonságok, stabilitás, alkalmazott gyógyszerforma sajátosságai stb. Második lépésben következik az analitikai célprofil meghatározása (*ATP – Analytical Target Profile*), melyben összefoglaljuk azt, hogy milyen céllal fejlesztjük az adott módszert és ezt olyan mérhető paraméterekkel is kifejezzük, melyeknek a teljesülése nyomon követhető a módszerfejlesztés során. A harmadik lépés a kockázatelemzés, melynek segítségével elkülöníthetők a módszer teljesítményét kritikus befolyásoló tényezők, a kritikus módszerparaméterek (*CMP – Critical Method Parameters*), illetve azok, amelyeknek hatása gyakorlati szempontból elhanyagolható. A negyedik lépés a kísérletek megtervezése és a kritikus módszerparaméterek számának és típusának függvényében, egy kísérletterv megalkotása és végrehajtása. Ehhez a lépéshez az is hozzátartozik, hogy az eredmények kiértékeléséhez szükség van a kritikus analitikai jellemzők (*CAA – Critical Analytical Attributes*) kiválasztására, melyek olyan számszerűsíthető paraméterek (például csúcspontidő vagy analízisidő), melyeknek segítségével a módszer teljesítménye és a kitűzött célprofil teljesülése objektíven értékelhető. Az ötödik lépés a végső módszer kiválasztását és egy kontroll stratégia (*control strategy*)

kidolgozását foglalja magába. A módszer leírásának tartalmazni kell minden olyan információt, amely nélkülözhetetlen a reprodukálhatóság szempontjából: minőségi jellemzőket és azok határértékeit, melyek segítségével a módszer teljesítménye nyomon követhető, illetve a kritikus módszerparaméterek esetén olyan tartományokat, melyek biztosítják a módszer megfelelő működését a rutinszerű alkalmazás során. Az utolsó lépésben szükséges egy, a módszer életciklusára vonatkozó kezelési terv felállítása. Ez tartalmazza például a módszer alkalmazhatósági határainak (*MODR – Method Operational Design Region*) leírását, mely rugalmasságot és tudományos alapot kölcsönöz a későbbi változtatások esetén, megkönnyítve ezzel úgy az illetékes hatóságok, mint a módszerfejlesztő szakemberek munkáját [19].

Mivel a kísérletterv függvényében kapott adatok értelmezése, valamint a módszerparaméterek teljesítményre gyakorolt hatásának értékelése bonyolult feladat, gyakran szükséges statisztikai vagy speciális modellező szoftverek alkalmazása. Ezeknek a programoknak a használata számos előnnyel jár, ilyen az: optimális működési körülmények meghatározása, a módszerparaméterek egyedi vagy kombinált hatásának értékelése, esetleg a módszer robusztusságának jellemzése a kísérleti adatok fényében. Egy ilyen speciális modellező program a DryLab (Molnár Institute, Berlin, Németország) [20], mely néhány gyakorlati kromatográfias futtatás adatai alapján képes előrejelezni a mintakomponensek kromatográfias viselkedését, ezzel hozzájárulva az elválasztási folyamat megértéséhez és optimalizálásához. A szoftver első sorban fordított fázisú (*RP – reversed-phase*) kromatográfias módszerek esetén alkalmazható és számításainak alapjait a Horváth Csaba által leírt szolvofób elmélet (*solvophobic theory*) és a lineáris oldószer erősségi modell (*linear solvent strength model*) képezik, mindkét elmélet a módszerparaméterek változásainak elválasztási folyamatra gyakorolt hatását írja el [21,22]. A DryLab szoftver több, mint harminc éves múlttal rendelkezik, kezdetben egydimenziós retenció idő-kritikus felbontás számításokból indult, kromatogramokat vizualizálva, mára már eljutottak a három mért és nyolc számított dimenzióig [23]. Számos, a közelmúltban megjelent tanulmány szemlélteti a DryLab nyújtotta előnyöket és lehetőségeket a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias módszerek fejlesztésében [4,6,24–30].

Jelen tanulmány elsődleges célja egy gyakorlati példán keresztül szemléltetni a kromatográfias módszerfejlesztés lépéseit, felhasználva az AQbD nyújtotta lehetőséget és eleget téve az ICH Q14 irányelv követelményeinek. Másodlagos

célként a DryLab modellező szoftver alkalmazhatóságát és előnyeit hivatott bemutatni – az ezetimib rokonvegyületeinek elválasztására irányuló módszerfejlesztés esetén.

Kiindulási pont és analitikai célprofil

Az ezetimib egy koleszterin felszívódását gátló, kémiai szempontból azetidinnel szerkezetű vegyület. Farmakológiai hatásának alapját a vékonybél falában található koleszterin transzporterekkel történő fizikai kölcsönhatás képezi, így gátolva meg azok működését és a koleszterin véráramba való bejutását. A hatás fokozásának érdekében gyakran alkalmazzák együtt „sztatinnokkal” [31–33]. Mivel bonyolult kémiai szerkezettel rendelkezik, előállítására több különböző szintézis út is lehetséges [34,35], következésképpen számos rokon szerkezetű molekula ismert, mint a szintézis során keletkező köztitermék, vagy éppen az ezetimib bomlásából származó hasonló szerkezetű vegyület. Ezen rokon szerkezetű anyagok mennyisége úgy a hatóanyagban [36], mint a végtermékben [37] szigorúan szabályozott. Az ezetimib esetén a két legjelentősebb bomlástermék a USP Ezetimib tabletta cikkelyben (*USP–United States Pharmacopeia*, Egyesült Államok Gyógyszerkönyve) is említett THP (tetrahidropirán) származék és az ezetimib keton [38,39].

Egy nemrégiben megjelent összefoglaló közleményben L. P. Rocha és mtsai. összegyűjtötték azokat a szakirodalomban közölt módszereket, melyek ezetimib értékmérésre és szennyeződéseinek tartalmi meghatározására szolgálnak, viszont egyetlen módszer esetén sem említik a tervezett minőség koncepciót. Jelentős különbségek vannak az egyes módszerek között az alkalmazott álló- és mozgófázisok tekintetében, ezzel a zűrzavarral is tükrözve az empirikus módszerfejlesztés hiányosságait [40]. Továbbá a USP Ezetimib, illetve Ezetimib tabletta cikkelyekben található hivatalos szennyeződés vizsgálati módszerek időigényesek és bonyolult oldószerkeveréket alkalmaznak mozgófázisként [38,41].

Ezért célul tűztük ki egy korábbi tanulmányunkban kidolgozott [30], tudományos alapokon nyugvó szennyeződés vizsgálati módszer *in silico* robusztusság vizsgálatát, validálását, illetve valós mintákon történő alkalmazhatóságának tesztelését. Továbbá másodlagos cél volt az *in silico* robusztusság vizsgálat megbízhatóságának gyakorlati futtatásokkal történő alátámasztása, valamint a kapott adatok alapján meghatározni a módszer kezelési stratégiáját és életciklus menedzsmentjét.

Anyag és módszer

Vegyszerek és reagensek

A kromatográfiás tisztaságú metanol (MeOH), acetonitril (ACN) és 85 %-os foszforsav a Merck-től (Darmstadt, Németország) kerültek beszerzésre. A mozgófázis vizes része 0,1 %-os foszforsav ultraszűrt tisztaságú vízzel készített oldata volt, melyhez a vizet minden nap frissen állítottuk elő MilliQ Integral 10 víztisztító berendezéssel (Merck Millipore, USA). Az ezetimib referenciaanyag és a tanulmány során vizsgált szennyezői (ezetimib diol, dezfluor ezetimib, meta-fluoroanilin származék, THP (tetrahidropirán) származék, ezetimib keton, benzil ezetimib és TBDMS (terc-butil-dimetil-szilil) keton az LGC Standards cégtől származnak (Teddington, London, Egyesült Királyság).

Az anyagok kémiai szerkezetét és a tanulmány során használt rövidített megnevezésüket az **1. ábra** szemlélteti.

Oldatok és minták

Mivel a szakirodalmi adatok alapján az ezetimib vízben gyengén oldódik (oldhatóság: megközelítőleg 4,4 mg/liter) [42] a tanulmány során készített mintákat ACN:víz 80:20 (térfogat%) arányú keverékében oldottuk fel, ultrahangos vízfürdőben. A kromatográfiás rendszerbe történő injektálás előtt minden mintát Whatman Puradisc PTFE típusú 0,45 µm pórusméretű fecskendőszűrőn (Merck, Darmstadt, Németország) szűrtünk át, majd mintánkként 10 µl-t injektáltunk.

Modellezéshez használt oldat

Az *in silico* robusztusság vizsgálat megbízhatóságának alátámasztására egy mesterséges keveréket készítettünk, amely tartalmazta az ezetimib hatóanyagot 1000 µg/ml koncentrációban, illetve minden vizsgált szennyezőt, a következő összetételben: ezetimib diol 8 µg/ml, dezfluor ezetimib 4 µg/ml, meta-fluoroanilin 8 µg/ml, ezetimib keton 2 µg/ml, THP származék 4 µg/ml, benzil ezetimib 4 µg/ml és TBDMS keton 6 µg/ml. Az eltérő mennyiségeknek fontos szerepe van, ugyanis az anyagok kromatogramon történő azonosítása a retenció modellezés közben a csúcsalatti terület (AUC–area under curve) alapján történik. Előző tanulmányunkban is hasonló összetételű mesterséges keveréket használtunk a módszerfejlesztés során [30].

A módszer validálásához használt minták

Az optimalizált módszert a jelenleg érvényben lévő ICH Q2(R1) irányelvvel összhangban validáltuk [42].

Vizsgáltuk a linearitást, visszanyerést, pontosságot, továbbá meghatározásra került minden szennyező esetén a kimutatási határ (LOD – *limit of detection*), meghatározási határ (LOQ – *limit of quantification*), relatív válaszfaktor (RRF – *relative response factor*) és a relatív retenció idő (RRT – *relative retention time*).

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a csúcsalatti terület lineáris változását a koncentráció függvényében, törzsoldatot készítettünk, amely tartalmazta az ezetimib hatóanyagot és az összes vizsgált szennyezőt 10 µg/ml koncentrációban. Ezt az oldatot 11 szinten hígítottuk, lefedve a 0,1-10 µg/ml tartományt (0,01 – 1,00 % a valós minták 1000 µg/ml ezetimib tartalmához viszonyítva) és az így kapott mintákból vizsgáltuk az analitikai jel-koncentráció összefüggést.

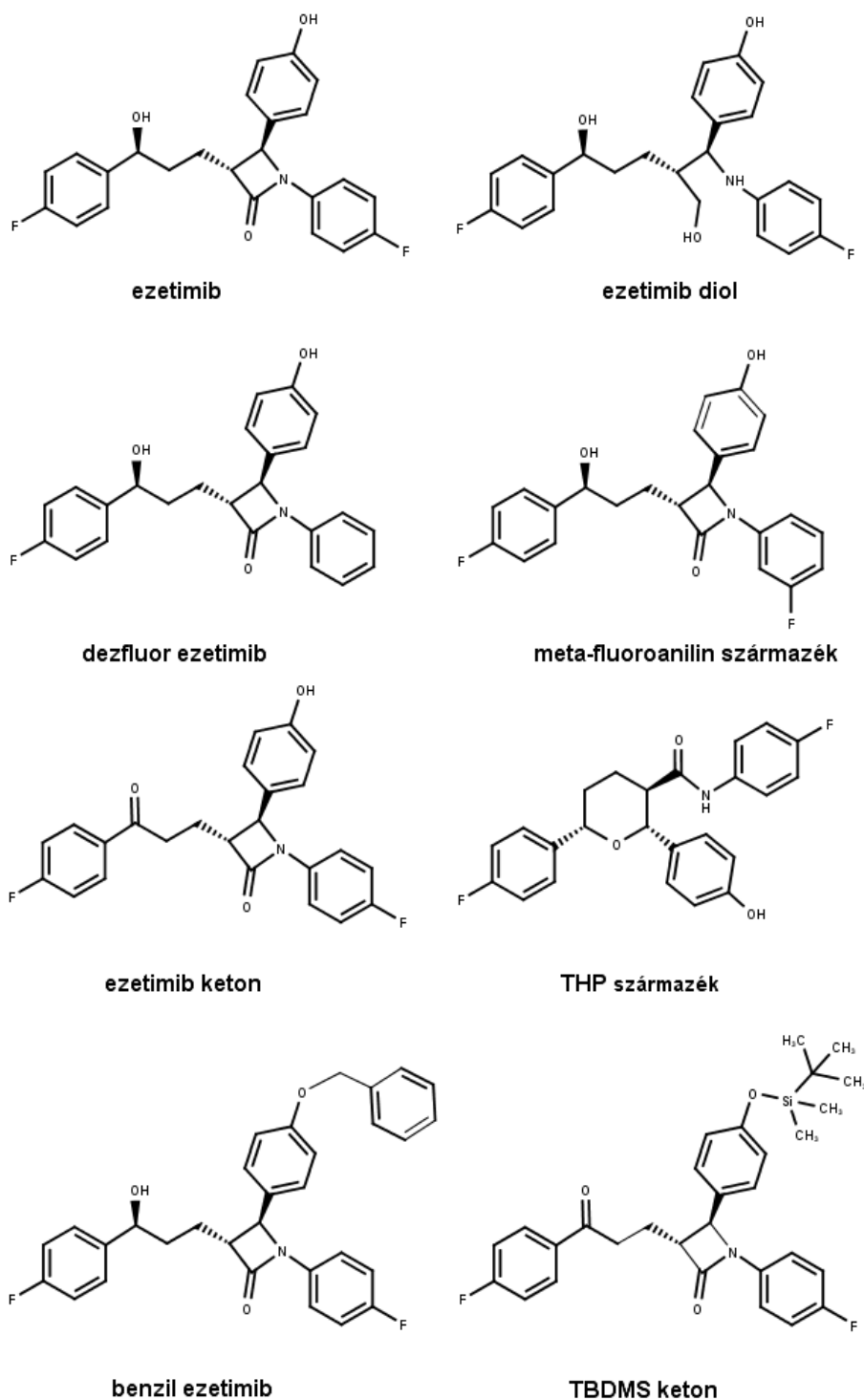
A visszanyerést hasonlóképpen 11 szinten vizsgáltuk a linearitási tartományban. Meghatározott mennyiségű ezetimib hatóanyagot és szennyezőket adtunk a placebo porkeverékhez, majd az így kapott mintákból határoztuk meg a visszanyert mennyiségeket.

A rendszer és a módszer pontosságának bizonyítására hat valós mintát készítettünk, melyekhez meghatározott mennyiségű (megközelítőleg 0,1 %) szennyező törzsoldatot adagoltunk, majd az így kapott mesterséges próbákat injektáltuk. A szennyezők hozzáadására azért volt szükség, mert a valós minták nem tartalmazták az összes tanulmányozott vegyületet. A laboratóriumon belüli pontosság bizonyítására a következő napon újabb hat mesterséges próbát készítettünk, a fent említett módon és a két különböző napon kapott eredményeket összehasonlítottuk.

Rendszeralkalmassági oldatok

Ez az oldat alkalmas a kromatográfiás rendszer teljesítményének értékelésére, amennyiben ebben az esetben teljesül az alapvonal elválás a kritikus ezetimib és a meta-fluoroanilin csúcspár között a rendszer szelektivitása megfelelő és alkalmas valós minták vizsgálatára. Első lépésben meta-fluoroanilin törzsoldat készítése szükséges, melyet 2 µg/ml mennyiségben adagolunk egy olyan oldathoz, amely 1000 µg/ml mennyiségben tartalmaz ezetimibet. Az így kapott oldatban az ezetimib koncentráció a valós mintákban található mennyiséggel egyenlő, míg a meta-fluoroanilin 0,2 %-ban található meg, ami a USP cikely szerint a maximálisan megengedett mennyiség.

A valós minták szennyeződés tartalmának mennyiségi meghatározására 2 µg/ml ezetimib koncentrációjú referencia oldatot készítettünk, feloldva az ismert tisztaságú



1. ábra. Az ezetimib hatóanyag és rokon vegyületeinek kémia szerkezete a MarvinSketch programmal ábrázolva.

ezetimib referenciaanyagot a szolvensként használt ACN-víz 80:20 (térfogat%) arányú keverékében. A rendszer érzékenységének tesztelésére használható oldat a referensoldat 0,1 µg/ml koncentrációjú hígítása, mely a meghatározási határnak megfelelő mennyiségben tartalmaz

ezetimibet. Rendszerérzékenységi oldatnak is nevezik és amennyiben 10 fölötti jel-zaj arányt biztosít az ezetimib csúcsra nézve a módszer megbízhatóan alkalmazható szennyezők mennyiségi meghatározására a validált koncentrációtartományban (0,1-10 µg/ml).

A módszer alkalmazhatóságának tesztelésére használt valós minták

A validálást követően a módszert valós mintákon (kereskedelmi forgalomban megtalálható ezetimib tartalmú tabletták) is teszteltük annak érdekében, hogy bizonyítsuk alkalmazhatóságát. Első lépésben meghatároztuk a tabletták átlagtömegét, majd mozsárban porítottuk őket. Az így kapott finom porkeverékből 10 mg ezetimib hatóanyagnak megfelelő mennyiséget mértünk, 10 ml szolvenst adtunk hozzá, majd egy ultrahangos vízfürdőn 10 percig ultrahangoztuk. Az így kapott elméleti ezetimib koncentrációhoz (1000 µg/ml) viszonyítottuk a szennyezők százalékos mennyiségét.

Alkalmazott berendezések és számítógépes programok

A tanulmány során egy Mettler-Toledo MT XPE 205 (Mettler-Toledo, Greifensee, Svájc) típusú analitikai mérleget és Elmasonic P180 H (Elma Schmidbauer, Singen, Németország) típusú ultrahangos vízfürdőt használtunk a minták előkészítésénél.

A vizsgált anyagok kémiai szerkezetét a MarvinSketch (ChemAxon, Budapest, Magyarország [43]) programmal ábrázoltuk (lásd 1. ábra).

A kromatográfiás méréseket Agilent Infinity 1260 (Santa Clara, Kalifornia, USA) berendezésen végeztük, mely a következő egységekből állt: kvaterner pumpa (G1311B), oszloptermosztát (G1316A), automata mintaadagoló egység (G1367E) termosztatált mintatartóval (G1330B) és HDR-DAD (*high dynamic range diode array detector*) típusú detektor (G4212B), mely a két egymással sorba kapcsolt diódasoros detektálási rendszernek köszönhetően nagyobb érzékenységgel rendelkezik a hagyományos diódasoros társainál. Az első fotocella térfogata 4 µl és az optikai úthossz 60 mm, míg a második esetben ezek az értékek 0,9 µl és 3,7 mm. A rendszer holttérfogata a mérések alapján 1000 µl. A kromatográfiás adatok rögzítése és kiértékelése az OpenLab EZChromEdition szoftver segítségével történt (Santa Clara, Kalifornia, USA). A csúcsok helyes integrálása után a modellezéshez használt futtatások kromatogramjait AIA/ANDI formátumban (*.cdf) mentettük ki, majd ezeket a fájlokat használtuk bemeneti adatként a kromatográfiás retenció modellező szoftverben.

A kromatográfiás oszlop kiválasztásánál figyelembe vettük előző tanulmányunk eredményeit, melynek során bebizonyosodott, hogy az ezetimib és rokonvegyületei esetén sokkal nagyobb hatása van az alkalmazott gradiensnek az elválasztási folyamat szelektivitására, mint az

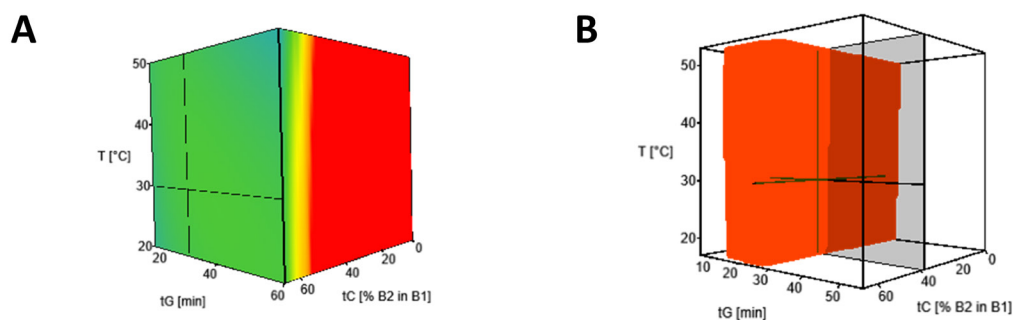
állófázis kémiai szerkezetének. A fent említett tanulmányban a kromatográfiás retenció modellező szoftver segítségével sikerült olyan módszerparamétereket azonosítani, amelyek kilenc különböző kémiai szerkezettel rendelkező állófázison biztosították az ezetimib rokonvegyületeinek alapvonal elválasztását [30]. Ennek alapján jelen tanulmányhoz egy átlagos C18 típusú oszlopot választottunk, amely nagy valószínűséggel fellelhető minden kromatográfiával foglalkozó laborban, esetünkben az Inertsil ODS-3, 150x4,6 mm, 3 µm-es részecskéekkel töltött kromatográfiás oszlopra esett a választás.

A módszerfejlesztés során [30], illetve az *in silico* robusztusság vizsgálat kivitelezésére és megbízhatóságának értékelésére a DryLab 4 (Molnár Institute, Berlin, Németország [20]) kromatográfiás retenció modellező szoftvert használtuk.

Eredmények és megbeszélés

Kockázatelemzés, kísérlettervezés és módszerfejlesztés

Előző tanulmányunkban [30] részletesen kitértünk arra, hogy milyen feltételek alapján ajánlott kiválasztani a kritikus módszerparamétereket és ezek függvényében milyen egy-, két, vagy háromdimenziós kísérlettervek kivitelezését teszi lehetővé a DryLab szoftver. A kritikus módszerparaméterek kiválasztása előzetes kockázatelemzés alapján történt, figyelembe véve a fordított fázisú folyadékkromatográfiára jellemző sajátosságokat, majd egy háromdimenziós *tG-T-tC* típusú kísérletterv 12 gyakorlati futtatása alapján készült el a virtuális elválasztási modell kilenc különböző állófázis esetén. A másik gyakran alkalmazott háromdimenziós modell a *tG-T-pH* típus, melynek abban az esetben van létjogosultsága, ha a disszociáció hatása jelentősen befolyásolja a csúcsok retenció idejét, és ezáltal közvetve a módszer szelektivitását. Ez a helyzet az ezetimib rokonvegyületei esetén nem áll fent, mivel közel azonos disszociációs együtthatóval rendelkeznek ($pK_a \sim 9,5$) és fordított fázisú kromatográfia szempontjából alkalmazható pH tartományban ($pH=2-8$) majdnem teljes egészében nem disszociált állapotban találhatók, így a mobilfázis pH-ja nem tekinthető lehetséges kritikus módszerparaméternek, ezért esett a választás a *tG-T-tC* kísérlettervre. A *tG-T-tC* modellek megbízhatóságát több gyakorlati futtatás is alátámasztotta, majd összehasonlítva őket olyan közös munkapontot azonosítottunk, mely lehetővé tette az ezetimib szennyezők elválasztását függetlenül az állófázis kémiai szerkezetétől.



2. ábra. A: 3D virtuális elválasztási modell, másnéven tudástér (avagy a „kocka”), illetve **B:** a tervezési tér összehasonlítása.

Az Inertsil ODS-3 C18 típusú oszlop esetén is jó szelektivitást tapasztaltunk, melyet több gyakorlati futtatással is alátámasztottunk [30]. A kedvező eredmények alapján és mivel a C18 típusú az egyik leggyakrabban használt állófázis, az Inertsil ODS-3 kromatográfiás oszlopon készült virtuális modell alapján választottuk ki a végső módszert, melynek validálását, robusztusság vizsgálatát, valós min-tákon történő tesztelését, kezelési stratégiáját és életciklus menedzsmentjét jelen tanulmányban tárgyaljuk.

Analitikai célprofil és végső módszer kiválasztása

A ICH Q14 irányelv szerint a kísérletterv végrehajtása után következik az adatok értelmezése, szem előtt tartva az analitikai célprofil és a kritikus analitikai jellemzőket. A végső módszer kiválasztásához ez előző tanulmányunkban részletezett tG - T - tC virtuális elválasztási modellt használtuk [30], figyelembe véve a kitűzött analitikai célprofil, melynek értelmében a módszer kevesebb, mint 30 perc alatt biztosítja az összes vizsgált szennyező alapvonal elválasztását, teljesítve a kritikus felbontásra vonatkozó $R_{s, \text{krit.}} \geq 2,0$ feltételt. Kritikus felbontás alatt a kromatogramon található két egymáshoz legközelebb eső csúcs között számolt felbontást értjük. A sarokfuttatások alapján a szoftver ábrázolja a fent említett 3D elválasztási modellt, amely tartalmazza az összes létező módszerparaméter kombinációját az adott tartományban és képes megjeleníteni a hozzájuk tartozó virtuális kromatogramokat. A szakirodalmi nevezéktan alapján a teljes 3D tér a „kocka” vagy tudástér (KS –*knowledge space*), mely információval szolgál a különböző faktorok elválasztási folyamatra gyakorolt hatásáról (2. ábra, A). Ebben az esetben a piros szín jelzi az alapvonal elválás teljesülését ($R_{s, \text{krit.}} \geq 2,0$), a kék ko-elúcióra utal ($R_{s, \text{krit.}} = 0$), a többi szín pedig (zöld, sárga, narancssárga) a két állapot közti átmenetet

($0 < R_{s, \text{krit.}} \leq 2,0$) szemlélteti a felbontás függvényében. A tervezési tér (DS – *design space*) a tudástér azon leszűkített része, ahol a módszer megfelel a kitűzött célprofilnak. Az alkalmazott többparaméteres optimalizáció során lehetőség nyílik olyan tervezési tér meghatározására, amelyben egyidejűleg több kritikus jellemző is teljesül, jelen esetben a kritikus felbontás és az analízisidő, amely az utolsó eluálódó csúcs retenciós időjeként számszerűsíthető. Ebben az esetben a 2. ábra B részén feltüntetett tervezési térben egyidejűleg teljesül az analízisidőre (kevesebb, mint 30 perc) és a kritikus felbontásra (nagyobb, mint 2,0) szabott feltétel, így az innen választott munkapont megfelel a fejlesztési folyamat első lépésében leszűgezett célprofilnak. A 2. ábra jól szemlélteti, hogy a kitűzött analitikai célprofilnak megfelelő tervezési tér általában csak egy kis részét teszi ki a teljes tudástérnek.

A DryLab program egyik nagy előnye, hogy képes megjeleníteni a tudástér minden pontjához tartozó virtuális kromatogramot, ezzel hozzájárulva az elválasztási folyamat jobb megértéséhez és a módszerparaméterek kritikus felbontásra gyakorolt egyéni és kombinált hatásának vizsgálatához.

A végső módszer gyakorlati futtatás során kapott és DryLab által előrevetített eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze. Megfigyelhető a rendkívül jó egyezés látható a retenciós idők (mindössze 0,37% eltérés), és kritikus felbontás ($R_{s, \text{krit.}}$) tekintetében is.

Az optimális elválasztás érdekében kétlépcsős gradiens alkalmazása indokolt. Az első egy 15 perces enyhén emelkedő szakasz, melyet követ egy meredekebb rész egészen 98% szerves összetételig, annak érdekében, hogy a nehezen eluálódó komponensek is hasznos időn belül elhagyják az oszlopot. Turner összetétel tekintetében a MeOH alkalmazása csökkentette a kritikus felbontást,

1. táblázat. A *tG-T-tC* virtuális elválasztási modell alapján kiválasztott végső módszer paraméterei, illetve a DryLab által előrevetített és gyakorlati értékek (retenciós idő és kritikus felbontás) összehasonlítása

Kromatográfiás paraméterek			tG: 25 perc, tC: 100% ACN T: 30 °C, áramlási sebesség: 1,50 ml/perc	
Retenciós idő (perc)	DryLab	Gyakorlati	Gradiens	
Ezetimib diol	8,68	8,70	Idő (Perc)	Szerves mobilfázis (%)
Dezfluor ezetimib	13,72	13,70	0	38
Ezetimib	15,23	15,31	15	45
Meta-fluoroanilin származék	16,55	16,68	25	98
THP származék	19,17	19,13		
Ezetimib keton	19,72	19,70		
Benzil ezetimib	23,23	23,35		
TBDMS keton	26,62	26,49		
Retenciós idők átlag eltérése, %	0,37			
R _{s, krit.}	3,67	3,86		

tG: gradiens idő; tC: termer összetétel; T: oszlophőmérséklet; **DryLab**: DryLab program által számolt retenciós idő; **Gyakorlati**: gyakorlati futtatás során kapott retenciós idő; **retenciós idők eltérése** (a gyakorlati és elméleti retenciós idők közti eltérés) = (DryLab-Gyakorlati)/Gyakorlati x 100 (%); **R_{s, krit.}**: felbontás az ezetimib és a meta-fluoroanilin származék csúcspár között

ezért döntöttünk a 100% ACN használata mellett, míg az oszlophőmérséklet esetén 30 °C tekinthető ideálisnak.

In silico robusztusságvizsgálat és annak megbízhatósága

Amikor a végső módszer elkészült a fent leírt lépések alapján, *in silico* robusztusságvizsgálatot végeztünk a DryLab segítségével, annak becslésére, hogy a módszer szelektivitását (kritikus felbontás) mennyire befolyásolják a módszerparaméterek kismértékű változtatásai. A robusztusság a módszer paraméterváltoztatásokkal szembeni tűrőképességét jelenti, amely a gyakorlati alkalmazás szempontjából nagy jelentőséggel bír. A sarokfuttatások során változtatott három módszerparaméter mellett (tG, T és tC) a program képes más módszerparaméterek változtatásának hatását is előrevetíteni, mint például az áramlási sebesség, gradiens kezdeti, köztes és végső összetétele, többlépcsős gradiens esetén a különböző szakaszok időtartama vagy a rendszer holtterfogata. Jelen esetben hét változtatható paraméterre (áramlási sebesség (ml/perc), teljes gradiens idő (perc), gradiens első lépcsőjének időtartama (perc), oszlophőmérséklet (°C), gradiens kiindulási összetétele (%), gradiens összetétele 15 percnél (%), gradiens végső összetétele (%)) számoltunk három szinten (-1, 0, +1) teljes faktoros szimulációval, ami összesen 2178 lehetséges kombinációt ($3^3=2178$) jelent. A tC változásának hatását nem vettük figyelembe, mivel a végső módszer 100% ACN-t használ szerves mobilfázisként, ezért a rutinszerű alkalmazás-

ban az ACN:MeOH arány a mozgófázisban gyakorlati szempontból nem releváns. Olyan befolyásoló tényezőt kiválasztottunk, amiket gyakorlatilag is változtatni tudunk, illetve amiknek kismértékű változása előfordulhat a módszer rutinszerű alkalmazása során. Ilyen megfontolásból a rendszer holtterfogatának változását sem vettük figyelembe, mivel az csak abban az esetben történhet meg, ha a módszert más kromatográfiás berendezésen használják. Szükség esetén erre a paraméterre is elvégezhetők a számítások és a módszer optimalizálható egy másik berendezésre is, de ez nem képezi jelen tanulmány részét. A számítások során középértéknek a modell alapján kiválasztott végső munkapont optimális értékeit tekintettük és ugyanolyan nagyságban változtattuk pozitív és negatív irányba a paramétereket, olyan mértékben, ami a gyakorlatban is előfordulhat. A **2. táblázatban** összefoglaltuk a választott paramétereket, azok optimális értékeit, illetve a számítások során alkalmazott alsó és felső határértékeit.

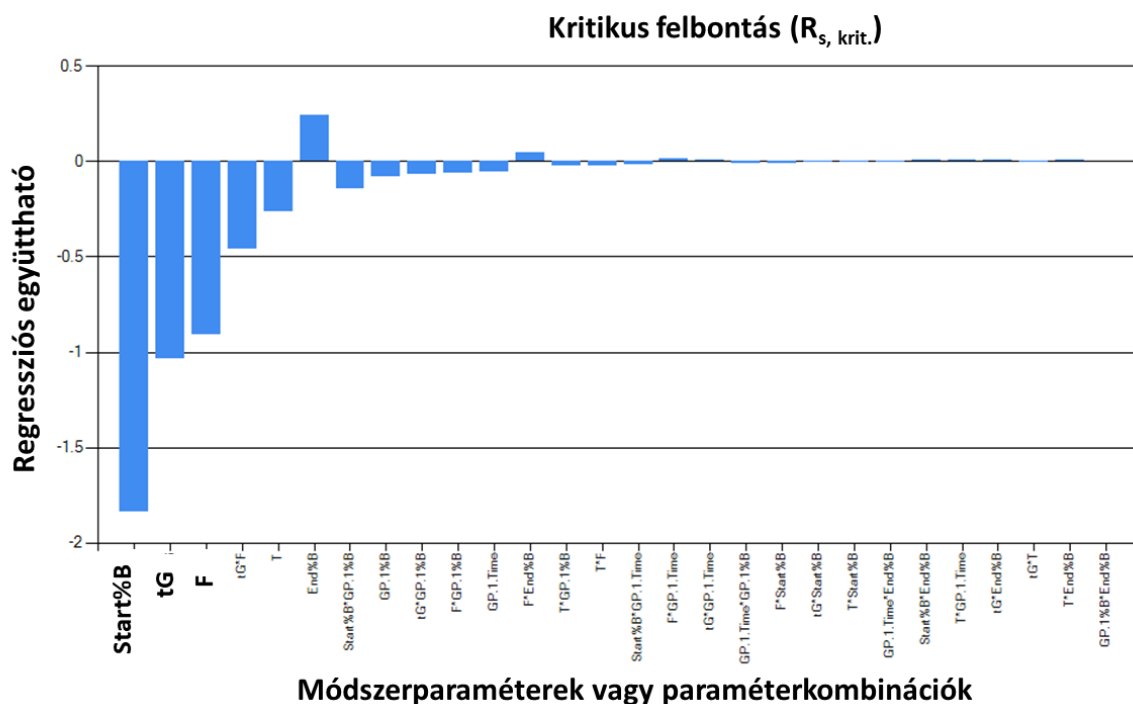
A számítások alapján megadott paramétertartományokban a módszer robusztusnak tekinthető, vagyis mind a 2178 lehetséges kombinációban teljesíti a kritikus felbontásra kitűzött minimum 2,0 értéket. Gyakorlatban azt jelenti, hogy, amennyiben a módszer alkalmazása során a paraméterek a megadott határértékeken belül változnak, garantált a megfelelő alapvonal elválasztás. Az így leszűgezett paramétertartományok fontos szerepet játszanak a pontos módszerleírásnál, illetve a rutinszerű használathoz szükséges kezelési stratégiák meghatározá-

2. táblázat: Az *in silico* robusztusságvizsgálathoz kiválasztott módszerparaméterek, azok optimális értékei, illetve a számítások során alkalmazott alsó és felső határértékei.

Vizsgált kromatográfiás paraméter	Optimális érték a <i>tG-T-tC</i> modell alapján	<i>In silico</i> vizsgálathoz kiválasztott határértékek
Áramlási sebesség	1,5 ml/perc	$\pm 0,1$ ml/perc
Gradiens idő (teljes)	25 perc	± 2 perc
Gradiens első lépcsőjének időtartama	15 perc	± 1 perc
Állófázis hőmérséklete	30 °C	± 2 °C
Gradiens kiindulási összetétele	38% ACN	$\pm 3\%$
Gradiens összetétele 15 percnél	45% ACN	$\pm 3\%$
Gradiens végső összetétele	98% ACN	$\pm 1\%$

sánál. Egy másik hasznos funkció az *in silico* robusztusságvizsgálat során, hogy információval szolgál a paraméterek egyenként vagy kombinációban kifejtett hatásáról a módszer teljesítményére. A kapott eredményeket a **3. ábra** szemlélteti, amelynek értelmében a legkritikusabb tényezők a gradiens kiindulási összetétele (*start%B*), a teljes gradiens idő (*tG*) és a áramlási sebesség (*F*), tehát ezekre érdemes kiemelt figyelmet szentelni a kezelési stratégia felállításánál. Annak érdekében, hogy alátámasszuk az *in silico* számítások megbízhatóságát, kiválasztottunk 14 paraméterkombinációt a lehetséges 2178-ból, azok közül,

amelyek a legalacsonyabb kritikus felbontás értékeket eredményezték és ezeket gyakorlatban is kiviteleztuk. Az így kapott adatokat betöltve, a DryLab automatikusan összehasonlítja az elméleti és gyakorlati retenciós időket és lineáris matematikai modellt illesztve az adatokra ábrázolja az értékeket, ez látható az **4. ábrán**. Megfigyelhető, hogy kiváló az egyezés ($R^2=0.9989$) mind a 15 esetben (14 legelőnytelenebb paraméterkombináció, illetve maga a végső módszer), ezzel alátámasztva azt, hogy a DryLab képes megbízhatóan előre jelezni a módszerparaméterek retenciós időre, és így közvetve a szelektivitásra gyakorolt



3. ábra. A módszerparaméterek egyéni és kombinált hatása a kritikus felbontásra ($R_{s, \text{krit.}}$). Regressziós együttható a módszerparaméterek vagy paraméterkombinációk függvényében, kiemelve a három legkritikusabb tényezőt: a gradiens kezdeti összetételét (*start%B*), a teljes gradiens időt (*tG*), illetve a mobilfázis áramlási sebességét (*F*).

hatását. A kapott eredmények alapján a végső módszer (1. táblázat) robusztusnak tekinthető, így rutinszerű alkalmazásra megfelelő. Továbbá azt is kijelenthetjük, hogy a DryLab által előrevetített *in silico* robusztusságvizsgálat megbízható eredményeket szolgáltat és nem szükséges azt gyakorlati futtatásokkal megerősíteni, időt és energiát megtakarítva a módszerfejlesztés során. Fontos azonban kihangsúlyozni, hogy csak abban az esetben hagyatkozhatunk az *in silico* számításokra, amennyiben előzőleg gyakorlati futtatásokkal igazoltuk a virtuális elválasztási modell megbízhatóságát.

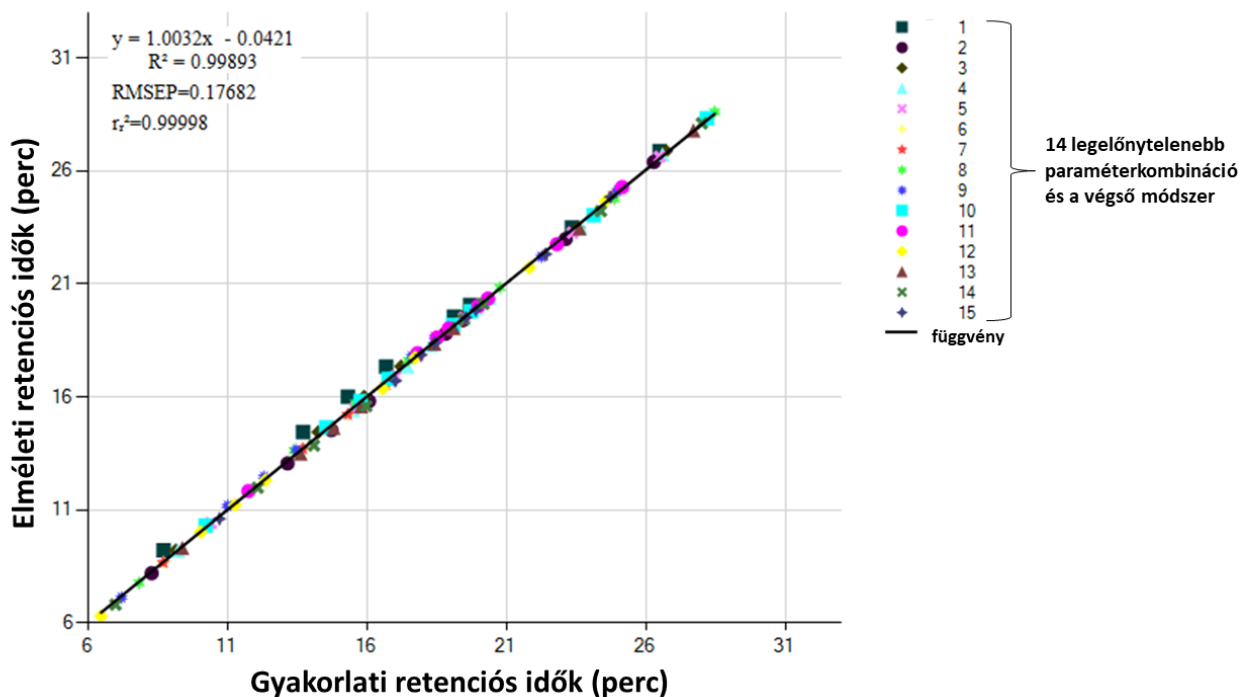
A módszer validálása

A végső módszer validálását az ICH Q2(R1) irányelvvel összhangban végeztük. Vizsgáltuk a szelektivitást, linearitást, visszanyerést, rendszer pontosságot, módszer pontosságát (ismételhetőséget), laboratóriumon belüli pontosságot, illetve meghatároztuk a kimutatási és meghatározási határokat, relatív retenciók időt és relatív válaszfaktorokat. A kapott eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze. Mivel az ezetimib diol szennyező UV elnyelése 247 nm-en alacsony, ezért a validálás során a kromatogramokat minden esetben rögzítettük az ezetimib diol számára kedvezőbb 210 nm hullámhosszon is, és az erre a szennyezőre vonatkozó számításokat az így

kapott kromatogramok alapján végeztük. Az ezetimib koncentráció a valós mintákban 1000 µg/ml, ehhez viszonyítottuk a szennyezők százalékos mennyiségét a validálás során.

A gyógyszerterárban vásárolt ezetimib tabletták termék-leírása alapján készítettünk egy placebo porkeveréket, amely tartalmazta az összes ismert segédanyagot. Valós mintákhoz hasonlóan készítettünk mintaoldatot a placeboból, majd ezt injektáltuk a kromatográfiás rendszerbe, annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy a segédanyagok jelenléte nem befolyásolja az ezetimib szennyezők minőségi és mennyiségi meghatározását. Ilyen tekintetben nem találtunk zavaró kromatográfiás csúcsokat a placebooldat vizsgálata során. A valós minták esetében követtük a kromatográfiás csúcsok UV spektruma alapján számolt csúcstisztaságot, annak érdekében, hogy elkerüljük a szennyezők ko-elúcióját és az ebből adódó pontatlan mennyiségi meghatározást. A kapott eredmények alapján a módszer szelektívnek tekinthető, alkalmas az ismert és ismeretlen szennyezők meghatározására és kijelenthető, hogy a segédanyagok jelenléte nem zavarja a szennyezők meghatározását.

A módszer érzékenységet a kimutatási és meghatározási határokkal jellemeztük, amelyeket a csúcsok jel/zaj aránya függvényében határoztunk meg. Az ICH Q2(R1)



4. ábra. Az *in silico* robusztusságvizsgálat során kapott elméleti és gyakorlati retenciók összehasonlítása a 14 legelőnytelenebb paraméterkombináció és a végső módszer esetén.

3. táblázat. A módszer validálása során kapott eredmények

Paraméter	Ezetimib diol	Dezfluor etetimib	Meta-fluoroanilin származék	THP származék	Ezetimib keton	Benzil etetimib	TBDMS keton	Ezetimib
Retenció idő (perc)	8,6	13,4	16,3	19,0	19,6	23,3	26,4	15,0
Relatív retenció idő (RRT)	0,60	0,90	1,10	1,25	1,30	1,55	1,75	1,00
Linearitási tartomány (µg/ml)	0,1-10,0							
Linearitási tartomány (%)	0,01-1,00							
Determinációs együttható (R^2)	0,99995	0,99997	0,99996	0,99996	0,99995	0,99997	0,99996	0,99996
Meghatározási határ (µg/ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Jel/zaj aránya meghatározási határon	13,5	21,2	18,1	15,9	69,5	25,2	19,0	18,2
Kimutatósi határ (µg/ml)	0,02	0,01	0,02	0,02	0,005	0,01	0,02	0,02
Relatív válaszfaktor (RRF)	1,32	1,08	1,08	0,84	1,92	0,98	1,46	1,00
Átlag visszanyerés (%)	97,96	99,85	100,07	99,76	99,14	102,92	96,08	100,48
Rendszer pontossága (RSD, %)	0,71	0,62	1,11	1,82	0,77	0,23	0,63	-
Módszer pontossága (RSD, %)	1,65	0,59	0,61	4,16	0,38	0,18	0,96	-
Közepes pontosság (napok közti)	Anova varianciaanalízis							
	$F_{crit.}$	4,964						
	F_{calc}	0,544	0,157	3,289	0,404	0,279	0,493	3,972
								-

RSD – relatív standard deviáció

szerint a meghatározási határ esetén a jel/zaj arálynak nagyobbak kell lennie, mint tíz, míg a kimutatósi határ esetén háromnál nagyobb értéket kell elérni, annak érdekében, hogy az azonosítás és a mennyiségi meghatározás megbízható legyen. A meghatározási határt egységesen 0,1 µg/ml (0,01%) értéken rögzítettük minden szennyező esetében, ezt tekintettük a linearitási tartomány legalacsonyabb értékének. Az így elkészített oldatból kapott jel/zaj értékek minden esetben tíznél magasabbak voltak, így kijelenthetjük, hogy a 0,1 µg/ml szennyező már mennyiségileg meghatározható. A kapott jel/zaj értékek alapján számoltuk ki a kimutatósi határértékeket a jel/zaj ≥ 3 feltétel figyelembevételével. Az értékek a 0,005-0,02 µg/ml tartományban helyezkednek el és az eredmények alapján a módszer megfelelően érzékenynek tekinthető. A linearitását olyan oldatokkal vizsgáltuk, amelyek tartalmaztak minden szennyezőt és az etetimib hatóanyagot a 0,1-10 µg/ml (0,01-1,00%) tartományban, 11 szinten. Minden vegyület esetén kalibrációs egyenest készítettünk, ábrázolva a csúcsalatti területet az oldatok koncentrációjának függvényében (µg/ml-ben kifejezve). A determinációs együtthatót (R^2 , regressziós együttható négyzete) a legkisebb négyzet módszerével határoztuk meg és minden esetben nagyobbak bizonyult, mint 0,99995. A kalibrációs egyenes minden vizsgált vegyület esetén áthalad a zero ponton (95 %-os konfidencia intervallummal) és

a maradékok szórásdiagramján véletlenszerű eloszlás volt tapasztalható. A kalibrációs egyenesek meredekségének arányaként meghatároztuk a szennyezők relatív válaszfaktorát, elosztva az adott szennyező kalibrációs egyenesének meredekségét az etetimib hatóanyag kalibrációs egyenesének meredekségével. A szennyezők relatív retenció idejét hasonló módon számoltuk ki, elosztva a szennyező retenció idejét az etetimib hatóanyagéval. A relatív retenció idők fontos szerepet játszanak a gyakorlatban a szennyezők valós mintákból történő azonosítása során, mivel elegendő az etetimib csúcs retenció idejének ismerete, majd ez alapján kiszámítható a szennyezők várható retenció ideje. Hasonló a helyzet a relatív válaszfaktorral is, melynek segítségével meghatározható a szennyezők pontos mennyisége csupán etetimibet tartalmazó referenciaoldathoz viszonyítva.

A visszanyerést ugyancsak 11 szinten vizsgáltuk lefedve a linearitási tartományt, meghatározott mennyiségű szennyezőt és etetimib hatóanyagot adva a placebo porkeverékhez. A visszanyerési értékeket a linearitáshoz meghatározott kalibrációs egyenesek segítségével számoltuk ki és százalékban fejeztük ki. A kapott értékek a 96,08-102,92% tartományban helyezkednek el, alátámasztva a szennyezők mennyiségi meghatározásának megbízhatóságát.

A pontosság értékelésére valós mintát használtunk,

amelyhez minden szennyezőből 1 µg/ml (0.1%) mennyiségű törzsoldatot adagoltunk. Hat oldatot készítettünk az első napon és szintén hatot a második napon a laboratóriumon belüli pontosság (*intermediate precision*) vizsgálatára. A rendszer pontosságának (*system precision*) értékelésére egymás után hétszer injektáltuk ugyanazt az oldatot, és minden szennyező esetében relatív standard deviációt számoltunk a csúcsalatti területekre. A kapott értékek a 0,23-1,82% tartományban helyezkednek el, bizonyítva a rendszer pontosságát. A módszer pontosságát (*repeatability*) hat minta alapján értékeltük, kiszámolva a relatív standard deviációkat minden szennyezőre. A módszer pontosságát a 0,18-4,16% közötti értékek alátámasztják. A laboratóriumon belüli pontosságot az első és második napon, azonos módon készített hat próba alapján értékeltük egyfaktoros Anova varianciaanalízis segítségével. Minden szennyező esetén teljesült a $F_{\text{calc.}} > F_{\text{crit.}}$ feltétel, következésképpen nincs szignifikáns eltérés a különböző napokon készített próbák között, ezzel is bizonyítva a módszer laboratóriumon belüli pontosságát.

A minták stabilitását a rendszer pontosságához használt hét egymást követő injektálás (megközelítőleg 5 óra telt el az első és a hetedik injektálás között) alapján értékeltük, illetve 24 óra elteltével újra injektáltuk az adott oldatot. Az irodalmi adatok alapján a THP származék és az ezetimib keton a fő bomlástermékek, ezért erre a két szennyezőre összpontosítottunk. Az ezetimib keton szennyező mennyisége 24 óra után sem növekedett, viszont a THP származék mennyisége öt óra elteltével 0,005%-kal, míg 24 óra elteltével a 0,02%-kal lett magasabb, ami jelentősnek mondható. Ez megmagyarázza részben a THP származék esetén tapasztalt viszonylag

magas relatív standard deviáció értékeket, a rendszer-pontosság (1,82%) és módszerpontosság (4,16%) esetén. A kapott eredmények alapján a szennyezők pontos mennyiségi meghatározásának érdekében ajánlott az oldatokat frissen, az elkészítést követő legkésőbb öt órán belül injektálni.

A **3. táblázatban** összefoglalt eredmények alapján a módszer megfelel a ICH Q2(R1) irányelv követelményeinek, szelektívnek, érzékenynek, lineárisnak és pontosnak tekinthető, így alkalmas ezetimib tartalmú tabletták szennyeződéseinek tartalmi vizsgálatára.

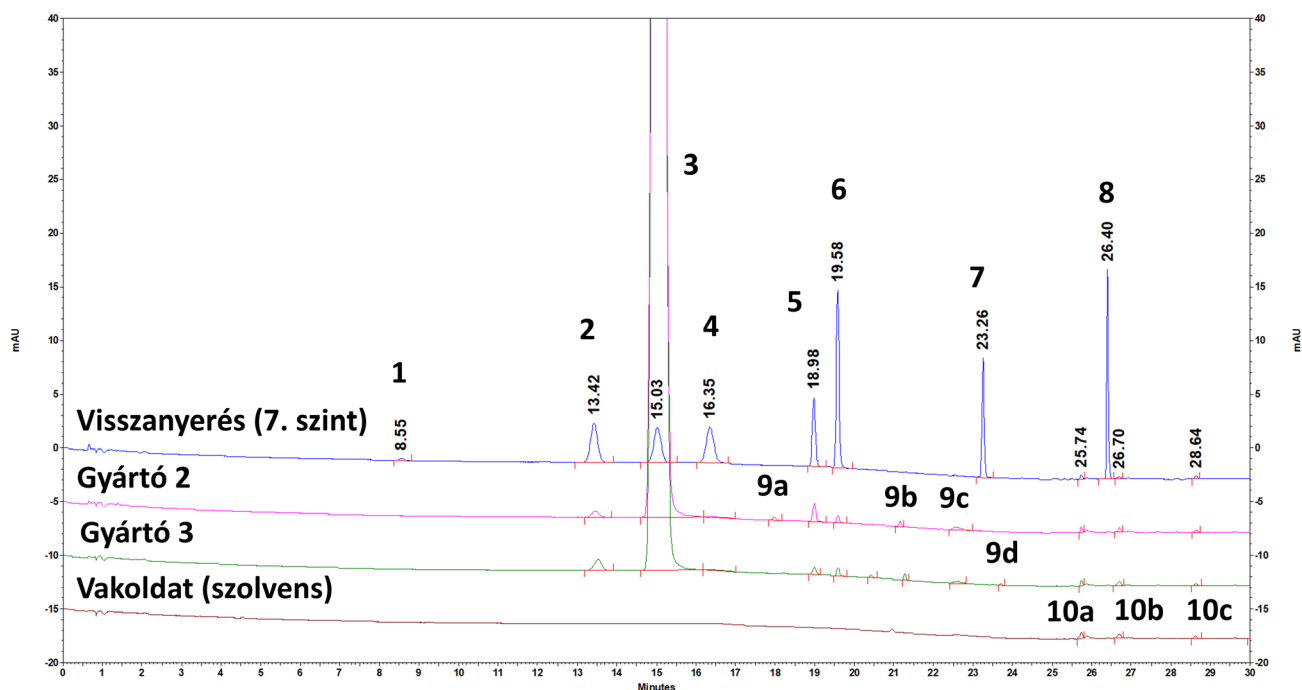
A módszer tesztelése valós mintákon

Három, különböző gyártótól származó, kereskedelmi forgalomban megtalálható ezetimib tartalmú tablettát vásároltunk egy marosvásárhelyi gyógyszerárban, majd meghatároztuk az ezekben található rokon vegyületek mennyiségét az általunk validált módszer segítségével. Az első gyártótól három különböző tételből készítettünk mintát, annak érdekében, hogy vizsgáljuk a különböző gyártási tételek közti különbségeket a szennyezők mennyiségi és minőségi összetételét illetően. A kapott eredményeket a **4. táblázatban** foglaltuk össze, külön kiemelve az ismert bomlástermékek (THP származék és ezetimib keton) mennyiségét. A **5. ábrán** látható két különböző gyártótól származó valós minta kromatogramja, valamint összehasonlításképpen egy a visszanyerés vizsgálatára használt minta, amely tartalmazza az ismert szennyezőket és az ezetimib hatóanyagot is. A **5. ábrán** feltüntetettük az ismeretlen szennyezőket (9 a-d jelzések), illetve a szolvénből (vakoldat) származó jeleket (10 a-c) is.

A kapott eredmények alapján megfigyelhető, hogy a

4. táblázat. A módszer teszteléséhez használt valós minták szennyezőtartalma

Gyártó		1	2	3	1	3
Tétel		1	2	3	1	1
Ismert szennyező	Legnagyobb mennyiségű (%)	0,07 (ezetimib keton)	0,05 (dezfluor ezetimib)	0,03 (THP származék)	0,08 (THP származék)	0,09 (dezfluor ezetimib)
	THP származék (%)	0,03	0,02	0,03	0,08	0,03
	Ezetimib keton (%)	0,07	0,03	0,03	0,01	0,01
	Teljes mennyiség (%)	0,14	0,10	0,07	0,14	0,16
Ismeretlen szennyező	Legnagyobb mennyiségű (%)	0,04 (RRT=1,45)	0,04 (RRT=1,45)	0,02 (RRT=1,43)	0,01 (RRT=1,20)	0,02 (RRT=1,41)
	Teljes mennyiség (%)	0,10	0,10	0,03	0,03	0,02
Teljes szennyező tartalom (%)		0,24	0,20	0,10	0,17	0,17



5. ábra. A két különböző gyártótól (gyártó 2 és 3) származó valós minták, a visszanyerés vizsgálatához használt minta (7. szint) és a vakoldat (szolvens) kromatogramjainak összehasonlítása (1. ezetimib diol, 2. dezfluor-ezetimib, 3. ezetimib, 4. meta-fluoroanilin származék, 5. THP származék, 6. ezetimib keton, 7. benzil ezetimib és 8. TBDMS keton, 9 a-d. ismeretlen szennyezők, 10 a-c. szolvensből származó jelek)

különböző gyártóktól származó termékek szennyeződéseinek tartalma mennyiségileg és minőségileg is eltér. Ez a különbség fennáll az azonos gyártótól származó különböző gyártási tételek esetén is, valószínűleg a felhasznált ezetimib hatóanyag tételek közti, minőségi különbségekből adódóan. Mind az öt vizsgált minta megfelel a USP ezetimib tartalmú tablettákra vonatkozó cikkelyének, melynek értelmében az ezetimib keton, a THP származék és az egyéni ismeretlen szennyezők értéke kevesebb kell legyen mint 0,20%, valamint a teljes szennyező tartalomnak kisebbnek kell lennie mint 0,60% [38]. A kapott eredmények alapján kijelenthető, hogy a vizsgált, ezetimib tartalmú tabletták megfelelnek a gyógyszerkönyvi (USP) előírásoknak a szennyeződések tartalmát illetően és az általunk fejlesztett és validált módszer alkalmas az ismert és ismeretlen szerkezetű ezetimib rokonvegyületek mennyiségi és minőségi meghatározására valós mintákból.

A végső módszer leírása, kezelési stratégia és életciklus menedzsment

A végső módszer részletes leírását a 5. táblázat első felében foglaltuk össze, megadva a módszerparaméterek optimális értékeit, illetve az *in silico* robusztusságvizsgálat

során meghatározott paraméter intervallumokat, melyek biztosítják a módszer megfelelő működését a rutinszerű használat során. A részletes és egyértelmű leírás, az úgynevezett specifikáció, fontos annak érdekében, hogy a laboratóriumtól és a személyzettől függetlenül a módszer reprodukálható legyen. A 5. táblázat második fele tartalmazza továbbá a rendszeralkalmassági kritériumokat, amelyeknek a módszer kivétel nélkül meg kell feleljen, hogy megbízható eredményekkel szolgáljon a minták szennyeződéseinek tartalmát illetően.

A két hullámhosszon való detektálás megnehezítheti a módszer alkalmazhatóságát, viszont a valós mintákon végzett vizsgálatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az ezetimib diol szennyező nem lelhető fel egyik vizsgált mintában sem, így gyakorlati szempontból ez elhanyagolható. A validálás során azt is megállapítottuk, hogy 0,05%-nyi mennyiségben az ezetimib diol már 247 nm-en is detektálható, így elegendő, ha csak ezen a hullámhosszon rögzítjük a mintaoldatok kromatogramjait.

A kezelési stratégia magába foglalja a módszer pontos leírását a robusztus paraméter intervallumokkal, illetve a rendszeralkalmassági kritériumokat. Ezek egymással szoros összefüggésben állnak és nélkülözhetetlenek a

5. táblázat. A módszerparaméterek optimális értékei, az *in silico* robusztuságvizsgálat során meghatározott paraméter tartományok, illetve a rendszeralkalmassági kritériumok.

Módszerleírás			
Paraméter	Optimális érték és robusztusságot biztosító intervallum		
Kromatográfiás oszlop	Inertsil ODS-3, 150x4,6 mm, 3 µm		
Áramlási sebesség	1,5 ± 0,1 ml/perc		
Oszlophőmérséklet	30 ± 2 °C		
Detektálási hullámhossz	247 nm (ismert és ismeretlen szennyezők az ezetimib diol kivételével) 210 nm (ezetimib diol)		
Mozgófázis	A: 0,1% foszforsav vizes oldata B: ACN		
Analízisidő	30 perc (+ 10 perc ekvilibrációs idő minden injektálás után)		
Injektált térfogat	10 µl		
Oldószer mintaelőkészítéshez	ACN-víz 80:20 (V/V %)		
Gradiens	Idő (perc)	A mozgófázis (%)	B mozgófázis (%)
	0	62	38 ± 3
	15 ± 1	55	45 ± 3
	25 ± 2	2	98 ± 1
	30	2	98 ± 1
Oszlop ekvilibráció injektálás után	Idő (perc)	A mozgófázis (%)	B mozgófázis (%)
	0	2	98
	5	62	38
	10	62	38
Rendszeralkalmassági kritériumok			
Alkalmazott oldat	Paraméter	Megfelelő érték	
Rendszeralkalmassági oldat (1000 µg/ml ezetimib és 2 µg/ml meta-fluoroanilin, 0,02%) (1 injektálás)	R _t ezetimib	15 ± 1 perc	
	R _t meta-fluoroanilin	16,3 ± 1 perc	
	R _{s, krit} (ezetimib és meta-fluoroanilin közt)	≥ 2,0	
Referencia oldat (2 µg/ml ezetimib, 0,20%) (3-5 injektálás alapján számolt átlagértékek)	N _{ezetimib}	≥ 1000	
	A _{ezetimib}	0,8 ≤ A ≤ 2,0	
	RSD	≤ 5,0%	
Rendszerérzékenységi oldat (0,1 µg/ml ezetimib, 0,01%) (1 injektálás)	S/N _{ezetimib}	≥ 10	

R_t – retenció idő; R_{s, krit.} – kritikus felbontás az ezetimib és a meta-fluoroanilin között; S/N – jel/zaj arány; A – csúcs szimmetria; N – elméleti tányérszám; RSD – relatív standard deviáció

kezelési stratégia megfelelő kivitelezéséhez. Amennyiben a módszer a leírásnak megfelelően kerül alkalmazásra a rendszeralkalmassági kritériumok megfelelőek lesznek, ebből kifolyólag a kapott eredmények megbízhatóak. Ugyanez fordítva is igaz, ha a rendszeralkalmassági kritériumok megfelelőek, a módszer megfelelően üzemel. Minél több módszerparaméter esetén ismert a robusz-

tussági intervallum, amelyen belül változhat egy adott paraméter anélkül, hogy negatívan változnának a rendszeralkalmassági kritériumok, annál robusztusabbnak tekinthető az adott módszer. Minél robusztusabb egy módszer, annál könnyebben reprodukálható, és annál kisebb az esélye a módszerből származó hibás eredményeknek. Általában három oldatot használnak a rendszer

alkalmasságának értékelésére. Első lépésben indokolt egy rendszeralkalmassági oldat injektálása, mely tartalmazza az etetimib hatóanyagot a valós mintáknak megfelelő koncentrációban (1000 µg/ml), illetve a kritikus szennyezőt a maximum megengedett értékben (2 µg/ml, 0,20%), ebben az esetben a meta-fluoroanilint, amely a legközelebb eluálódik a hatóanyaghoz. Az így kapott kromatogram alapján ellenőrizhetőek a retenciós idők, illetve a későbbiekben azonosíthatóak egyéb szennyezők a relatív retenciós idők alapján. A kritikus felbontás alapján értékelhető a szelektivitás is. Amennyiben a kritikus felbontás megfelelő, nagy valószínűséggel az összes anyag megfelelő szelektivitással elválik. Másodszorban egy referencia oldat injektálása ajánlott, amely kizárólag etetimib hatóanyagot tartalmaz a szennyezők esetén megengedett maximális értékben, ebben az esetben 2 µg/ml (0,20%) mennyiségben. Ebből az oldatból több párhuzamos injektálás javasolt és a kapott átlagértékek alapján szokás jellemezni magának a kromatográfiás rendszernek az alkalmasságát a csúcs szimmetria, elméleti tányérszám és a görbe alatti terület szórása alapján. Ezek az úgynevezett teljesítménykritériumok más-más információt hordoznak, például az alacsony tányérszám vagy a nem megfelelő szimmetria az állófázis állapotáról árulkodik, míg a csúcsalatti területek szórása a kromatográfiás rendszer injektálásának pontosságát jellemzi. A referencia oldat injektálása során kapott csúcsalatti területet használjuk viszonyítási értéknek a mennyiségi meghatározás során. A harmadik alkalmazott oldat a rendszerérzékenységi oldat, amely a meghatározási határnak megfelelő mennyiségben (0,1 µg/ml, 0,01%) tartalmazza az etetimib hatóanyagot, az így kapott etetimib csúcs jel/zaj arány értéke jellemzi a rendszer érzékenységét. Amennyiben a kapott érték nagyobb, mint tíz, a rendszer megbízhatóan alkalmazható a szennyezők mennyiségi meghatározására a validált koncentrációtartományban.

Az életciklus menedzsment a módszer utánkövetését és szükség esetén történő optimalizálását jelenti, rutinszerű alkalmazás módszertranszfer vagy más kromatográfiás készülék alkalmazása esetén. Az életciklus során a rendszer alkalmasságának tesztelésére szolgáló oldatok (rendszeralkalmassági oldat, referencia oldat és rendszerérzékenységi oldat) segítségével követhető és értékelhető a módszer teljesítménye. Amennyiben a módszerleírásban megadott rendszeralkalmassági kritériumoktól (főleg a retenciós idők és felbontás tekintetében) eltérő értékeket kapunk, de ismert az elválasztási modell, vagyis ismerjük az egyes paraméterek elválasztásra gyakorolt

hatását, lehetőség van a tervezési tér alapján a módszerparaméterek optimalizálására. Erre gyakran van szükség, ha különböző kromatográfiás rendszereken (különböző mozgófázis keverési rendszer, különböző holttérfogat) akarjuk alkalmazni ugyanazt a módszert. Az ICH Q8 irányelv értelmében, ha a paraméterek módosítása megalapozott és egy ismert tervezési tér határain belül történik, nem szükséges a módszer újvalidálása [10]. Ez egy jelentős előny a tradicionális módszerfejlesztéssel szemben, ahol bármely módszerparaméter-változtatás esetén a hatóságok jóváhagyása és a módszer újvalidálása szükséges. Ilyen esetben nem ismeretes a módszerparaméterek változtatásának teljesítményre gyakorolt hatása, így a tervezési tér meghatározása sem lehetséges. Összefoglalva, empirikus fejlesztés esetén hiányzik a változtatáshoz szükséges tudományos megalapozottság, míg a minőségtervezésen alapuló módszerfejlesztés során ez jelen van, tudatosan beleépítve a minőséget a végső módszerbe.

Következtetések

Összegzésként elmondhatjuk, hogy sikerült kivitelezni egy olyan kromatográfiás módszerfejlesztést, amely teljesíti az ICH Q14 továbbfejlesztett megközelítésének lépéseit, hangsúlyt fektetve a vizsgált minta feltérképezésére, az analitikai célprofil meghatározására, kockázatelemzéssel alátámasztott kísérletterv kivitelezésére, majd részletes módszerleírásra, amely tartalmazza a kritikus módszerparaméterek határértékeit, rendszeralkalmassági kritériumokat, továbbá kezelési stratégiára vonatkozó információkat. Sikerült továbbá alátámasztani azt, hogy a modellező programok, mint például a DryLab alkalmazása nagymértékben segíti az elválasztási folyamat megértését, és az *in silico* robusztusságvizsgálat megbízható információt szolgáltat a módszerparaméterek szelektivitásra gyakorolt hatásának tekintetében. A kísérletek megtervezésével, majd a kapott adatok alapján az optimális módszerparaméterek kiválasztásának lehetőségével és a robusztusság előrevetítésével tudományos alapot biztosít a módszerfejlesztésnek és olyan eszközöket helyez a fejlesztő szakemberek kezébe, amelyeket az empirikus megközelítés nem biztosíthat. Nem utolsósorban sikerült egy olyan módszert fejleszteni, amely a validálás alapján szelektív, lineáris, pontos, érzékeny, robusztus és nem utolsósorban alkalmazható etetimib tartalmú valós minták szennyeződés tartalmának minőségi és mennyiségi

vizsgálatára. A tanulmány során leírt módszer megfelelő lehet akár a gyógyszerkönyvi (USP) ezetimib hatóanyag és tabletták cikkelyekben leírt szennyeződés vizsgálati módszerek helyettesítésére, mivel mind hatékonyságban mind rugalmasságban felülmúlja azokat.

Köszönetnyilvánítás

A jelen munkát Magyarország Collegium Talentum programja, illetve az Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztálya és a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kara által biztosított kutatási pályázat (szerződés száma: 136/2021) támogatták. A szerzők szeretnék megköszönni a Molnár Institute által nyújtott folyamatos segítséget a Drylab használata során felmerült kérdésekben.

Rövidítések jegyzéke

3D – háromdimenziós
ACN – acetonitril
USA – United States of America (Amerikai Egyesült Államok)
AQbD – Analytical Quality by Design (tervezett minőség az analitikában)
AUC – area under curve (csúcs alatti terület)
CAA – Critical Analytical Attributes (kritikus analitikai jellemzők)
CMP – Critical Method Parameters (kritikus módszerparaméterek)
DAD – diode array detector (diódasoros detektor)
DS – design space (tervezési tér)
F – flow (áramlás)
HDR-DAD – high dynamic range diode array detector
HPLC – high pressure liquid chromatography (nagynyomású folyadékkromatográfia)
HPLC – high performance liquid chromatography (nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia)
ICH – International Conference on Harmonization (Nemzetközi Harmonizációs Konferencia)
ICH Q2 – Nemzetközi Harmonizációs Konferencia-2. Minőségbiztosításról szóló irányelve, melynek témája az analitikai módszerek validálása
ICH Q14 – Nemzetközi Harmonizációs Konferencia-14.

Minőségbiztosításról szóló irányelve, melynek témája az analitikai módszerek fejlesztése

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség)

KS – knowledge space (tudástér)

LOD – limit of detection (kimutatási határ)

LOQ – limit of quantification (meghatározási határ)

MeOH – metanol

MODR – Method Operational Design Region (módszer alkalmazhatóságának határa)

N – theoretical plate number (elméleti tányérszám)

OFAT – One Factor At a Time (egyszerre egy faktor változtatása)

PTFE – polytetrafluoroethylene (poli-tetrafluoroetilén)

QbD – Quality by Design (tervezett minőség)

QbT – Quality by Testing (tesztelt minőség)

R – regressziós együttható

R² – determinációs együttható

RP – reversed-phase (fordított fázis)

RRF – relative response factor (relatív válaszfaktor)

RRT – relative retention time (relatív retenció idő)

R_{s, crit.} – critical resolution (**R_{s, krit.}** – kritikus felbontás)

RSD – relative standard deviation (relatív standard deviáció)

Rt – retention time (retenció idő)

S/N – signal to noise ratio (jel/zaj arány)

startB% – gradients kiindulási összetétele

T – column temperature (oszlophőmérséklet)

A – tailing factor (csúcs szimmetria)

TBDMS – terc-butyl-dimethyl-szilil

tC – ternary composition (terner összetétel)

tG – gradient time (gradiens idő)

THP – tetrahidropirán

USP – United States Pharmacopeia (Egyesült Államok Gyógyszerkönyve)

UV – ultraviolet (ibolyántúli)

Irodalom

(lásd az angol nyelvű cikk végén)