

Razvoj analitičkih metoda za određivanje pimavanserina i onečišćenja primjenom strategije analitičke kvalitete osigurane dizajnom temeljene na procjeni rizika

Radić, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:580626>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE

Irena Radić

**RAZVOJ ANALITIČKIH METODA ZA
ODREĐIVANJE PIMAVANSERINA I
ONEČIŠĆENJA PRIMJENOM STRATEGIJE
ANALITIČKE KVALITETE OSIGURANE
DIZAJNOM TEMELJENE NA PROCJENI RIZIKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Irena Radić

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS
FOR DETERMINATION OF PIMAVANSERIN AND
ITS IMPURITIES BY APPLYING AN ANALYTICAL
QUALITY-BY-DESIGN PRINCIPLES AS A
RISK-BASED STRATEGY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE

Irena Radić

**RAZVOJ ANALITIČKIH METODA ZA
ODREĐIVANJE PIMAVANSERINA I
ONEČIŠĆENJA PRIMJENOM STRATEGIJE
ANALITIČKE KVALITETE OSIGURANE
DIZAJNOM TEMELJENE NA PROCJENI RIZIKA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Sandra Babić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Irena Radić

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS
FOR DETERMINATION OF PIMAVANSERIN AND
ITS IMPURITIES BY APPLYING AN ANALYTICAL
QUALITY-BY-DESIGN PRINCIPLES AS A
RISK-BASED STRATEGY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. Sandra Babić, PhD

Zagreb, 2022

- ❖ Bibliografski podaci:
- ❖ UDK: 543.5:615.214:006.015.5(043.3)
- ❖ Znanstveno područje: prirodne znanosti
- ❖ Znanstveno polje: kemija
- ❖ Znanstvena grana: analitička kemija
- ❖ Institucija: Pliva Hrvatska d.o.o., Teva API, Analitika Istraživanja i razvoja
- ❖ Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić
- ❖ Broj stranica: 172 (broj stranica s priložima)
- ❖ Broj slika: 42
- ❖ Broj tablica: 30
- ❖ Broj priloga: 10
- ❖ Broj literaturnih referenci: 111
- ❖ Datum obrane: 8. travnja 2022.
- ❖ Sastav povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Irena Škorić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
2. Izv. prof. dr. sc. Šime Ukić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
3. Dr. sc. Ivana Šagud, znan. sur, Pliva Hrvatska d.o.o.

Zamjena: Prof. dr. sc. Sanda Rončević, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

- ❖ Rad je pohranjen u:
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb;
Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu,
Marulićev trg 20.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 13. srpnja 2020., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 13. listopada 2020.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Sandri Babić na svesrdnoj podršci i stručnim savjetima tijekom doktorskog studija i izrade doktorske disertacije.

Posebno hvala dr. sc. Mislavu Runji koji mi je omogućio eksperimentalni rad u laboratoriju odjela Analitike istraživanja i razvoja ljekovitih djelatnih tvari, Pliva Hrvatska d.o.o.

Hvala i na svim korisnim savjetima tijekom pregleda doktorske disertacije.

Zahvaljujem svome suprugu, svojim roditeljima i sestri na potpori koju su mi pružili, na strpljenju i odricanju na koje su bili spremni.

SAŽETAK

Pimavanserin je atipični antipsihotik koji se koristi za liječenje halucinacija i deluzija povezanih s Parkinsonovom bolesti. Budući da se radi o relativno novom lijeku na tržištu, dostupan je ograničeni broj farmakokinetičkih podataka i analitičkih metoda. Doktorski rad opisuje razvoj kromatografske metode ultravisoke djelotvornosti za istovremeno određivanje pimavanserina i njegova četiri procesna onečišćenja. Metoda je razvijena primjenom načela „analitičke kvalitete osigurane dizajnom“. Kao kritične značajke metode odabrani su: faktor kapaciteta onečišćenja A, vrijeme trajanja analize koje je definirano vremenom zadržavanja onečišćenja D kao posljednje eluirajuće komponente, kritično razlučivanje između onečišćenja B i C, faktor simetrije i broj teorijskih odsječaka. Procjena rizika u ranoj fazi razvoja metode ukazala je na kritične parametre metode: temperaturu kolone, vrijeme trajanja gradijenta i pH-vrijednost pokretne faze (vodena komponenta, A). Procjena utjecaja odabranih kritičnih parametara metode na definirane kritične značajke metode te određivanje radnog područja analitičke metode provedeno je primjenom dizajna eksperimenata pomoću softvera DryLab. Na temelju procjene rizika te rezultata ispitivanja robusnosti i preciznosti predložena je strategija kontrole metode s definiranim kriterijima prikladnosti sustava. Razvijena metoda je validirana prema ICH Q2 (R1) smjernicama ispitivanjem sljedećih izvedbenih karakteristika: specifičnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, preciznost, točnost, robusnost i stabilnost.

Studija prisilne razgradnje provedena je sa svrhom utvrđivanja stabilitetno-indikativnih svojstava razvijene analitičke metode. Produkti prisilne razgradnje pimavanserina identificirani su pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti (UHPLC-QTOF). Dodatno, provedena je *in silico* evaluacija potencijalnih produkata razgradnje upotrebom komercijalnog softvera Zeneth® pri čemu je postignuto dobro podudaranje s eksperimentalno identificiranim razgradnim produktima. Glavni razgradni produkti nastali su kao rezultat kisele i bazne hidrolize (m/z 223,16 $[M+H]^+$ na RRT 0,37) i u uvjetima oksidativnog stresa (m/z 444,26 $[M+H]^+$ na RRT 0,57). Rezultati su pokazali da se pimavanserin razgrađuje hidrolizom uree u kiselim i bazičnim uvjetima i *N*-oksidacijom alifatskog tercijarnog amina.

Ispitane su i validirane visokoosjetljive analitičke metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i plinske kromatografije vezane sa spektrometrijom masa koje omogućavaju kvantitativno određivanje niskih koncentracija potencijalno genotoksičnih onečišćenja pimavanserina pri razinama specifičnim za svaki spoj (temeljem praga

toksikološke zabrinutosti). Validacijom metoda potvrđena je njihova prikladnost, potvrđivanjem specifičnosti, linearnosti, ponovljivosti, točnosti i robusnosti.

Dodatno je ispitana i validirana metoda za kvantifikaciju elementnih onečišćenja pimavanserin lijekovite djelatne tvari primjenom vezanog sustava spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Jaki oksidacijski uvjeti tijekom pripreme uzorka uzrokovali su probleme pri određivanju tragova osmija. Osmij u prisutnosti dušične kiseline stvara jako hlapljiv i iznimno otrovan plin osmijev tetraoksid. Kako bi se to izbjeglo i osiguralo da je primijenjena metoda sigurna za analitičara, razvijena je prikladna metoda pripreme uzorka dodatkom tiouree za stabilizaciju osmija koja je uspješno validirana prema USP <233> smjernicama.

Ključne riječi: analitička kvaliteta osigurana dizajnom, dizajn eksperimenta, prisilna razgradnja, onečišćenja, genotoksična onečišćenja, pimavanserin, spektrometrija masa, UHPLC, GC, ICP-MS

ABSTRACT

Pimavanserin is an atypical antipsychotic indicated for the treatment of hallucinations and delusions associated with Parkinson's disease psychosis. As it is a relatively new drug on the market, limited number of pharmacokinetic information and analytical methods are available. The doctoral thesis describes development of an ultra-high performance chromatography for the simultaneous determination of pimavanserin and its four process impurities. The method was developed applying „analytical quality by design” (AQbD) principles as a risk-based approach. The following critical method attributes (CMAs) were selected: resolution between the worst separated compounds (impurity B and impurity C), a duration of analysis defined by the retention time of the last eluting peak (impurity D), a capacity factor of the first eluted impurity (impurity A), a tailing factor and a theoretical plate numbers. Risk assessment in the early stage of method development pointed out critical method parameters (CMPs): column temperature, gradient time and pH value of the mobile phase (water phase, A). Design of experiments (DoE), using DryLab software, was applied to evaluate the influence of CMPs on CMAs and to determine method operable design region (MODR). Based on the risk assessment and the results of robustness and precision tests, a control strategy with system suitability criteria was proposed. Developed method was validated according to ICH Q2 (R1) guideline with respect to the specificity, limit of detection, limit of quantification, linearity, precision, accuracy, robustness and stability.

A forced degradation study was performed to provide evidence of the stability-indicating property of the method. Degradation products of pimavanserin were identified using ultra high-performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UHPLC-QTOF). Additionally, potential degradation products were assessed *in silico* with the help of Zeneth® software and good agreement with experimentally identified degradation products was achieved. Main degradation products were formed during acid and base hydrolysis (m/z 223.16 $[M+H]^+$ at RRT 0.37) and under oxidative stress conditions (m/z 444.26 $[M+H]^+$ at RRT 0.57). The results revealed that the pimavanserin undergoes degradation through acid and base hydrolysis of urea and *N*-oxidation of aliphatic tertiary amine.

The analytical methods: ultra-high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled with mass detection, were developed for quantitation of potentially genotoxic impurities at compound-specific acceptable limit (based on Threshold of Toxicological Concern (TTC) concept). Validation of the methods confirmed that methods are specific, accurate, and linear with adequate repeatability and robustness.

Additionally, a method for elemental impurities determination in pimavanserin was developed using ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) technique. Due to presence of oxidizing agents in sample preparation, problem has occurred with determination of osmium. Osmium in the presence of oxidizing nitric acid gives a highly volatile and toxic osmium tetraoxide. Adequate method with addition of thiourea for osmium stabilization was developed and successfully validated according to USP <233>.

Keywords: analytical quality by design, design of experiments, forced degradation, impurities, genotoxic impurities, pimavanserin, mass spectrometry, UHPLC, GC, MS, ICP-MS

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	4
2.1.	Ljekovita djelatna tvar pimavanserin	4
2.2.	Onečišćenja u lijekovima i ljekovitim djelatnim tvarima	6
2.3.	Kontrola onečišćenja u ljekovitim djelatnim tvarima	9
2.4.	Analitička kvaliteta osigurana dizajnom	14
2.4.1.	Definiranje namjene i cilja analitičke metode	15
2.4.2.	Procjena rizika i definiranje kritičnih značajki i parametara metode	16
2.4.3.	Dizajn eksperimenta	17
2.4.3.1.	Metodologija probirnog dizajna i dizajna odgovora površine	17
2.4.3.2.	Primjena statističkih programskih paketa u razvoju metoda prema AQbD načelima	21
2.4.4.	Validacija analitičke metode i strategija kontrole	23
2.4.5.	Kontinuirano poboljšanje i upravljanje životnim ciklusom analitičke metode	24
2.5.	Prisilna razgradnja	25
2.5.1.	Uvjeti prisilne razgradnje	26
2.5.1.1.	Hidrolitička razgradnja	26
2.5.1.2.	Oksidacijska razgradnja	27
2.5.1.3.	Razgradnja pod utjecajem povišene temperature (termička razgradnja)	28
2.5.1.4.	Fotolitička razgradnja	28
2.5.1.5.	<i>In silico</i> predviđanje puteva razgradnje ljekovite djelatne tvari	29
2.6.	Instrumentalne analitičke tehnike u analizi ljekovitih djelatnih tvari	30
2.6.1.	Kromatografija	30
2.6.1.1.	Kromatografski parametri	31
2.6.1.2.	Tekućinska kromatografija	37
2.6.1.3.	Plinska kromatografija	38
2.6.2.	Spektrometrija	40
2.6.2.1.	Induktivno spregnuta plazma	40
2.6.3.	Spektrometrija masa	42
2.6.3.1.	Tehnike ionizacije	43
2.6.3.2.	Analizatori masa u vezanim sustavima	46
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	52
3.1.	Kemikalije i standardi	52
3.2.	Instrumenti	57

3.2.1.	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom s nizom dioda (UHPLC-DAD)	57
3.2.2.	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (UHPLC-QTOF).....	57
3.2.3.	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana s detektorom s nizom diode i spektrometrom masa (UHPLC-DAD/SQD)	58
3.2.4.	Plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa (GC-MS)	58
3.2.5.	Induktivno spregnuta plazma vezana sa spektrometrom masa (ICP-MS)	58
3.2.6.	Uređaj za mikrovalnu digestiju	59
3.2.7.	Uređaj za osvjetljavanje umjetnim Sunčevim zračenjem	59
3.2.8.	Analitički uređaji za pripremu otopina i uzoraka.....	59
3.2.9.	Računalni programski paketi	59
3.3.	Metode rada.....	60
3.3.1.	Razvoj UHPLC-DAD metode za određivanje pimavanserina i onečišćenja.....	60
3.3.2.	Validacija razvijene UHPLC-DAD metode za određivanje pimavanserina i onečišćenja	61
3.3.3.	Studija prisilne razgradnje	63
3.3.4.	Ispitivanje i validacija GC-MS metode za određivanje potencijalno genotoksičnog onečišćenja izobutil-bromida (IMP-1)	64
3.3.5.	Ispitivanje i validacija LC-MS metode za određivanje potencijalno genotoksičnog onečišćenja <i>N</i> -hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamida (IMP-2).....	65
3.3.6.	Ispitivanje i validacija ICP-MS metode za određivanje elementnih onečišćenja .	66
4.	REZULTATI I RASPRAVA	68
4.1.	Razvoj i validacija UHPLC metode za određivanje pimavanserina i onečišćenja primjenom strategije analitičke kvalitete osigurane dizajnom temeljene na procjeni rizika	68
4.1.1.	Definiranje namjene analitičke metode (ATP)	68
4.1.2.	Preliminarna ispitivanja, procjena rizika i definiranje kritičnih značajki i kritičnih parametara UHPLC metode	69
4.1.3.	Dizajn eksperimenta (DoE) – vizualizacija područja robusnosti i odabir radnog područja metode (MODR)	72
4.1.4.	Validacija UHPLC-DAD metode za kvantitativno određivanje pimavanserina i onečišćenja	82
4.1.4.1.	Specifičnost.....	82
4.1.4.2.	Linearnost.....	82
4.1.4.3.	Granice kvantifikacije i detekcije	83
4.1.4.4.	Točnost i iskorištenje	84
4.1.4.5.	Preciznost	85

4.1.4.6.	Stabilnost otopina.....	85
4.1.5.	Procjena robusnosti metode i uspostava strategije kontrole analitičke metode	85
4.1.5.1.	Studija robusnosti metode unutar definiranog radnog područja metode (MODR)	85
4.1.5.2.	Strategija kontrole analitičke metode.....	89
4.2.	Studije prisilne razgradnje ljekovite djelatne tvari pimavanserina	91
4.2.1.	Kinetika oksidativne razgradnje pimavanserin ljekovite djelatne tvari	94
4.2.2.	Identifikacija i strukturna karakterizacija razgradnih produkata	96
4.3.	Metode za kvantifikaciju potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u pimavanserin ljekovitoj djelatnoj tvari	101
4.3.1.	Ispitivanje metode za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnog onečišćenja izobutil-bromida (IMP-1).....	103
4.3.2.	Ispitivanje metode za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnog onečišćenja <i>N</i> -hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamid (IMP-2)	105
4.3.3.	Validacija GC-MS i LC-MS metoda za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnih onečišćenja	107
4.4.	Metoda za kvantifikaciju teških metala i elementnih onečišćenja	110
4.4.1.	Validacija ICP-MS metode za kvantifikaciju teških metala i elementnih onečišćenja	112
5.	ZAKLJUČCI.....	117
6.	LITERATURA.....	119
7.	PRILOZI	131

1. UVOD

Analitičke metode su kritičan parametar u životnom ciklusu farmaceutskog proizvoda upravo zbog njihove uloge u razvoju novog kao i kontroli kvalitete gotovog proizvoda. Potpuno razumijevanje namjene analitičke metode podrazumijeva poznavanje strukture i fizikalno-kemijskih svojstava ispitivanog spoja, njegovih onečišćenja i puteva razgradnje, osjetljivosti spoja na utjecaje različitih okolišnih čimbenika, uvjete skladištenja i rok valjanosti te poznavanje kritičnih značajki kvalitete proizvoda.

Neadekvatno razvijene analitičke metode mogu dovesti do nepouzdanih rezultata koji mogu biti ključni za daljnji razvoj proizvoda. Tradicionalni pristup razvoju analitičkih metoda, sa stajališta industrije, dugotrajan je i samim time iznimno skup proces. Stoga se posljednjih godina razvoju analitičkih metoda sve češće pristupa prema načelima „analitičke kvalitete osigurane dizajnom“ (engl. *analytical quality by design*, AQbD) u sklopu strategije potpune procjene rizika.

Svrha istraživanja provedenih u ovom radu bila je razviti kromatografske metode za određivanje procesnih i razgradnih organskih onečišćenja u ljekovitoj djelatnoj tvari pimavanserin, te pokazati kako se primjenom AQbD načela može dizajnirati robusna metoda a preliminarnom procjenom rizika uključiti načela kvalitete izravno u sam razvoj analitičke metode. Aktivnosti razvoja metode slijedila su znanstveno utemeljen postupak identificiranja kritičnih parametra (eng. *critical method parameters*, CMP) i kritičnih značajki metode (eng. *critical method attribute*, CMA), uključujući iteracije između procjene rizika i provedenih eksperimenata s ciljem stvaranja baze znanja koja jasno utvrđuje utjecaj kromatografskih parametara na učinkovitost analitičkog postupka i identificira područje sa stabilnim uvjetima.

Istraživanje se sastojalo od nekoliko cjelina. Prvi dio istraživanja bio je usmjeren na razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC). Razvoj analitičke metode temeljio se na jasnom definiranju analitičkog cilja (engl. *analytical target profile*, ATP), odnosno jasnom definiranju namjene analitičke metode, a zatim CMA značajki koje mogu utjecati na kvalitetu konačnog rezultata analize.

Provedena je i procjena rizika s ciljem identifikacije, analize i evaluacije potencijalnih rizika, te su identificirani CMP parametri koji mogu utjecati na definirane kritične značajke metode.

Međusobni utjecaj kritičnih parametara metode na kritične značajke metode proveden je u drugoj cjelini istraživanja kroz aktivnosti analize i evaluacije rizika. U ovu su svrhu korištene statističke metode planiranja eksperimenta (engl. *design of experiments*, DoE) te je primijenjen komercijalni računalni program DryLab. Plan eksperimenta obuhvatio je fazu razvoja i fazu optimizacije. U fazi razvoja ispitane su kromatografske kolone s obzirom na sastav nepokretne faze, vrsta organske komponente pokretne faze, pH vodene komponente pokretne faze, sastav pokretne faze te vrijeme gradijentnog eluiranja. Nakon toga slijedila je faza optimizacije odabranih kromatografskih uvjeta: optimizacija vrste nepokretne faze, temperature nepokretne faze, pH-vrijednosti pufera, te program gradijentnog eluiranja. Na temelju dobivenih podataka definirano je radno područje metode (engl. *method operable design region*, MODR), a odabrani optimalni uvjeti potvrđeni su eksperimentalno. Razvijena analitička metoda je validirana s naglaskom na provjeru robusnosti metode. Tijekom validacije analitičke metode ispitana je točnost, preciznost, specifičnost, linearnost, radno područje, granice detekcije i kvantifikacije kao i prikladnost sustava (broj teorijskih odsječaka (N), faktor kapaciteta (k'), ponovljivost (RSD %)). Na temelju dobivenih podataka definirana je strategija kontrole metode tijekom njezine rutinske primjene.

Stabilnost farmaceutskog proizvoda i ljekovite djelatne tvari kritični je parametar koji može utjecati na čistoću, potentnost i sigurnost lijeka. Budući da promjene u stabilnosti lijeka, kao što su formiranje toksičnih razgradnih produkata ili primjena manje doze lijeka nego što je očekivano, mogu dovesti u rizik pacijentovu sigurnost, nužno je poznavati utjecaj različitih okolišnih čimbenika na farmaceutsku djelatnu tvar. Kao pomoć u određivanju stabilnosti djelatne tvari pimavanserina, u trećoj je cjelini istraživanja provedena studija prisilne razgradnje koja je uključivala razgradnju djelatne tvari u uvjetima koji su agresivniji od relevantnih uvjeta skladištenja gotovog proizvoda, no od velike su važnosti prilikom razvoja stabilitetno-indikativne metode. Glavna razgradna onečišćenja identificirana su primjenom kromatografije ultra visoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti (UHPLC-QTOF). Za *in silico* predviđanje puteva prisilne razgradnje upotrijebljen je komercijalni računalni program Zeneth®.

Na temelju dobivenih MS i MS/MS spektara, kao i na temelju predviđanja puteva prisilne razgradnje dobivenih pomoću računalnog programa Zeneth[®], predložene su strukture nastalih produkata razgradnje. Poznavanje puteva razgradnje izuzetno je važno jer omogućuje predviđanje potencijalne toksičnosti onečišćenja koja mogu biti prisutna u ljekovitoj djelatnoj tvari pimavanserina. Obzirom na nepostojanje podataka u literaturi o stabilnosti djelatne tvari pimavanserina, ovim radom objašnjen je utjecaj svjetlosti, temperature, pH-vrijednosti i prisutnosti oksidansa na razgradnju pimavanserina, te su predloženi putevi razgradnje.

U četvrtoj cjelini istraživanja su bila usmjerena na ispitivanje i validaciju visokoosjetljivih analitičkih metoda za praćenje potencijalno genotoksičnih procesnih onečišćenja. Evaluacija potencijalne genotoksičnosti procesnih i razgradnih onečišćenja provedena je primjenom podatkovnog modeliranja kao *in silico* strategije u procjeni sigurnosti primjene ljekovite djelatne tvari, a koje se temelji na kvantitativnom odnosu strukture i biološke aktivnosti tvari (engl. *quantitative structure-activity relationship*, QSAR).

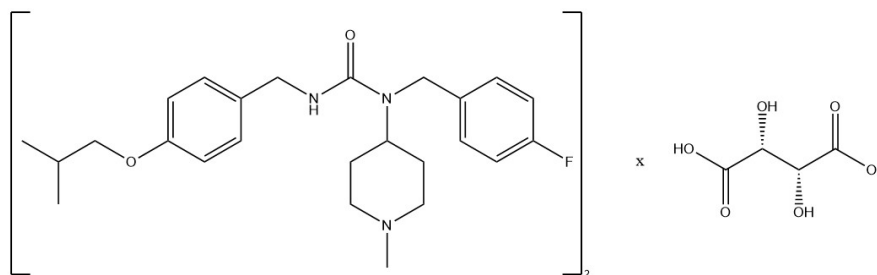
Zbog poznate sposobnosti metala da kataliziraju razgradnju, ali i zbog njihove potencijalne toksičnosti, praćenje i kontrola sadržaja takvih onečišćenja u intermedijerima, sirovinama i gotovim lijekovima također je važna aktivnost. Stoga je u petoj cjelini istraživanja ispitana i validirana analitička metoda za kvantifikaciju metalnih onečišćenja na osnovi spektrometrije masa vezane s induktivno spregnutom plazmom (eng. *inductively coupled plasma - mass spectrometry*, ICP-MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ljekovita djelatna tvar pimavanserin

Pimavanserin (PMV) je atipični antipsihotik koji je odobren za liječenje Parkinsonove bolesti, a također se istražuje njegova primjena za liječenje Alzheimerove bolesti, psihoze, shizofrenije i velikog depresivnog poremećaja. Ljekovita djelatna tvar pimavanserin blokira serotoninske receptore 5-HT_{2A} koji su povezani s vizualnim halucinacijama i deluzijama, te predstavlja prvi atipični antipsihotik koji ne uzrokuje klinički značajan antagonizam dopaminergičkih, adrenergičnih, histaminergičkih ili muskarinskih receptora. Iako je točan mehanizam djelovanja pimavanserina nepoznat, literaturno se spominje kombinacija inverznog djelovanja agonista i antagonista na serotoninske 5-HT_{2A} receptore (5-hidroksitriptamin, 5-HT) i, u manjoj mjeri, na 5-HT_{2C} receptore [1].

Nuplazid[®] (pimavanserin tartarat) je 29. travnja 2016. odobrila američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) i od tog se dana nalazi na tržištu Sjeverne Amerike [1]. Pimavanserin (**Slika 1**) je u Nuplazidu[®] prisutan kao sol pimavanserin tartarat IUPAC naziva (2*R*,3*R*)-2,3-dihidroksibutandionska kiselina; 1-[(4-fluorfenil)metil]-1-(1-metilpiperidin-4-il)-3-[[4-(2-metilpropoksi)fenil]metil]urea. Pimavanserin tartarat je dobro topljiv u vodi, a njegova molekulska formula je (C₂₅H₃₄FN₃O₂)₂·C₄H₆O₆, dok mu molekulska masa iznosi 1005,20 g/mol (sol tartarata) [1].



Slika 1. Kemijska struktura ljekovite djelatne tvari pimavanserina

Nuplazid® je okrugla, bijela, filmom obložena tableta, koja sadrži 20 mg pimavanserin tartarata što je ekvivalentno 17 mg pimavanserina. Preporučena doza pimavanserina je 34 mg, uzima se oralno u obliku dvije tablete od 17 mg jednom dnevno [2].

Iako se čini da je pimavanserin siguran i dobro se podnosi kod pacijenata s Parkinsonovom bolešću, također je potrebno naglasiti postojanje mogućih štetnih učinaka, uključujući produljenje QT intervala i moguće paradoksalno pogoršanje psihoze. Produljeni QT interval povezan je s povećanim rizikom od nastanka polimornog oblika ventrikulske tahikardije (*torsade de pointes*) koja može dovesti do iznenadne smrti. Kod propisivanja lijekova, koji kao nuspojavu imaju produljenje QT intervala, potrebno je procijeniti odnos između koristi i štetnosti tog lijeka te identificirati ostale rizične čimbenike i stanja koji bi u interakciji s tim lijekovima doveli do aritmije. Stoga su potrebna dodatna klinička ispitivanja kako bi se utvrdila dugoročna sigurnost i djelotvornost pimavanserina te kako bi se utvrdila učinkovitost u liječenju psihoza povezanih s neurološkim poremećajima koji nisu Parkinsonova bolest [1].

Budući da se radi o relativno novom lijeku na tržištu, dostupan je ograničen broj farmakokinetičkih informacija i analitičkih metoda. Jedna od metoda opisanih u literaturi odnosi se na razvoj UPLC-MS/MS metode za određivanje pimavanserin tartarata u plazmi štakora u sklopu provođenja farmakokinetičkih studija [3], dok Koduri i sur. [4] opisuju stabilitetno-indikativnu HPLC metodu za kvantifikaciju ljekovite djelatne tvari pimavanserina u gotovim oblicima i tabletama. Pregledom dosadašnjih publikacija ne nailazi se na metodu koja opisuje određivanje onečišćenja u ljekovitoj djelatnoj tvari pimavanserinu niti na opis potencijalnih mehanizama i kinetike razgradnje pimavanserina. Također, nedostaju podaci o toksičnosti razgradnih produkata.

2.2. Onečišćenja u lijekovima i ljekovitim djelatnim tvarima

Onečišćenja u lijekovima i ljekovitim djelatnim tvarima, sa stajališta farmaceutske industrije, definiraju se kao neželjene tvari ili spojevi koji mogu zaostati i/ili nastati kao međuprodukti složenog proizvodnog postupka, ili nastati skladištenjem farmaceutskog proizvoda [5]. Također, onečišćenja mogu potjecati iz same ljekovite djelatne tvari kao produkti razgradnje ljekovite tvari djelovanjem svjetla, temperature, prisutnosti vode ili promjenom pH [6].

Međunarodna konferencija za usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu (engl. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) postavila je jasne standarde, definicije i smjernice kroz vodiče o onečišćenjima u lijekovima i ljekovitim djelatnim tvarima. Prema smjernicama opisanim u ICH vodičima za farmaceutsku industriju, onečišćenje se definira kao bilo koji sastojak ljekovite djelatne tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar [7]. Onečišćenja u lijekovima su pitanje kvalitete jer potencijalno mogu ugroziti djelotvornost lijeka ili utjecati na sigurnost primjene. Mogu biti uzrok inkompatibilnosti, razgrađivati djelatnu tvar i time utjecati na nestabilnost lijeka i smanjiti njegov učinak, a često imaju i neželjene farmakološko-toksikološke učinke koji mogu prevagnuti u odnosu na korist od primljene terapije. Zbog svega navedenog, njihova je prisutnost u lijekovima nepoželjna i mora se kontrolirati [8].

Onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala.

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa i/ili pri skladištenju ljekovite tvari ili farmaceutskog oblika, a uključuju:

- početne sirovine i međuprodukte kemijskih reakcija sinteze kao najčešća onečišćenja koja se mogu pronaći u ljekovitoj djelatnoj tvari;
- sporedne produkte kemijskih reakcija;
- procesna onečišćenja;
- razgradna onečišćenja;
- reagense, ligande i katalizatore.

Posebna skupina organskih onečišćenja su i stereokemijska onečišćenja koja mogu nastati kod optički aktivnih ljekovitih tvari. Ljudski je organizam kiralna sredina, a u takvim uvjetima stereoizomeri mogu imati različitu selektivnost prema receptorima, enzimima i proteinima u procesima prijenosa i metabolizma, stoga je sve veći naglasak stavljen na proizvodnju enantiomerno čistog spoja koji se smatra boljim entitetom [6].

Anorganska onečišćenja uglavnom zaostaju iz proizvodnog postupka, a uključuju:

- anorganske katalizatore, reagense i ligande;
- anorganske soli;
- teške metale ili tragove metala;
- ostale materijale (drveni ugljen i tvari koje se koriste za filtraciju, poput dijatomejske zemlje, silika gela, celuloze).

Ostatna otapala su zaostale, hlapljive organske kemijske tvari koje se rabe ili nastaju u postupku proizvodnje lijeka. U ICH vodičima navedene su smjernice i klasifikacija otapala koja mogu zaostati u ljekovitim i pomoćnim tvarima nakon proizvodnje ovisno o toksičnosti otapala, načinu primjene i dozama lijeka. Ovisno o potencijalnom riziku za ljudsko zdravlje, ostatna otapala su podijeljena u tri skupine [9]:

- prva skupina ostatnih otapala - obuhvaća otapala koja se moraju izbjegavati zbog dokazane kancerogenosti ili sumnje na kancerogenost u ljudi, te otapala opasna za okoliš;
- druga skupina ostatnih otapala - otapala čija upotreba treba biti ograničena zbog moguće neurotoksičnosti, teratogenosti i drugih tipova toksičnosti;
- treća skupina ostatnih otapala - otapala niske toksičnosti i malog rizika za zdravlje ljudi.

Složeni postupak proizvodnje ljekovitih djelatnih tvari temelji se na upotrebi širokog raspona reaktivnih reagensa, a njihova prisutnost na niskim koncentracijskim razinama u konačnoj ljekovitoj djelatnoj tvari, kao i prisutnost njihovih nusprodukata u kemijskim reakcijama, mogu imati nepovoljne farmakološko-toksikološke učinke. Ovakva onečišćenja, uključujući i produkte razgradnje ljekovite djelatne tvari, mogu biti potencijalno genotoksična, mutagena ili kancerogena. Kao dio postupka procjene sigurnosti, regulatorna tijela širom svijeta zahtijevaju informacije o genotoksičnom potencijalu novih lijekova i ljekovitih djelatnih tvari.

Poznata (identificirana) onečišćenja, prisutna u polaznim materijalima i intermedijerima, te onečišćenja iz polaznih materijala koja nastaju kao nusprodukti njihovog procesa sinteze, predstavljaju rizik prijenosa (engl. *carry-over*) istih do konačnog proizvoda. Iako je taj rizik neznatniji za pojedina onečišćenja (npr. onečišćenja koja nastaju u početnim fazama sinteze), potrebno ih je evaluirati i napraviti procjenu genotoksičnosti.

Međunarodni standard za farmaceutsku industriju opisan u smjernici ICH M7 „Procjena i kontrola DNK reaktivnih (mutagenih) onečišćenja u farmaceutskim proizvodima radi ograničavanja potencijalno kancerogenog rizika” (engl. *Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk*) navodi suvremeni pristup dizajnu lijekovitih djelatnih tvari korištenjem QSAR metodologije kao *in silico* strategije za procjenu sigurnosti [10].

QSAR metodologija zasniva se na kvantitativnoj vezi strukturnog svojstva molekule i njezine biološke aktivnosti pri čemu se svaka kemijska struktura na temelju određenih kriterija opiše pomoću jednog ili više molekulskih deskriptora. Korelacija biološke aktivnosti i molekulskih deskriptora predstavlja matematički model koji nam omogućuje da unaprijed predvidimo biološka svojstva novih spojeva samo na temelju njihovih molekulskih deskriptora. Na temelju preporuka opisanih u ICH smjernicama, kod *in silico* procjene sigurnosti potrebno je koristiti dvije QSAR metode, od kojih jedna koja treba biti stručno utemeljena, te druga koja će se temeljiti na statistici. Najčešće se radi o dva komercijalno dostupna računalna programa: Derek Nexus (stručno utemeljen) i Sarah Nexus (zasnovan na statistici).

Osim QSAR metodologije, tijekom izvođenja studija genotoksičnosti koriste se i različiti *in vitro* i *in vivo* testovi osmišljeni kako bi identificirali bilo koju tvar ili spojeve koji mogu izravno ili neizravno oštetiti genetski materijal raznim mehanizmima. Prema tome, ovi testovi nam pomažu u prepoznavanju opasnosti već u ranoj fazi samog razvoja lijeka. Jedan od često korištenih *in vivo* testova je test kometa, a Amesov test je jedan od poznatijih *in vitro* testova koji se koristi kao test bakterijske reverzne mutacije [11].

Identifikacija genotoksičnih tvari pomaže nam da razumijemo mehanizam mutacije i genotoksičnosti, čime nam otvara put da bolje spriječimo učestalost istog [11].

Na temelju provedene evaluacije potencijalne genotoksičnosti svakog pojedinog onečišćenja, slijedi njihova daljnja klasifikacija [10]:

- Klasa I - poznati mutageni kancerogeni;
- Klasa II - poznati mutageni s nepoznatim kancerogenim potencijalom;
- Klasa III - upozoravajuća struktura, koja nije povezana sa strukturom ljekovite tvari, nema podataka o mutagenosti;
- Klasa IV - upozoravajuća struktura, upozorenje u ljekovitoj tvari ili spojevima povezanim s ljekovitom tvari koji su testirani i koji nisu mutageni;
- Klasa V - nema strukturnih upozorenja ili upozoravajuće strukture s dovoljno podataka koji pokazuju nedostatak mutagenosti ili kancerogenosti.

Identifikacija, strukturalna karakterizacija, kvantifikacija i procjena biološke sigurnosti svakog pojedinog onečišćenja (organskog ili anorganskog) u djelatnoj tvari ključan je dio procesa razvoja ljekovite djelatne tvari i samoga lijeka, a ujedno je na taj način, optimizacijom procesa sinteze i odgovarajućim ispitivanjima, od samog početka moguće osigurati proizvodnju lijekova visoke kvalitete.

2.3. Kontrola onečišćenja u ljekovitim djelatnim tvarima

Kontrola onečišćenja obuhvaća identifikaciju onečišćenja, postavljanje zahtjeva kvalitete (specifikacije) i ograničavanje količine onečišćenja u ljekovitim djelatnim tvarima. Kroz zahtjeve kvalitete (specifikaciju) definiraju se osnovni te kritični i/ili specifični parametri koje predlaže i obrazlaže proizvođač, a odobravaju ih regulatorna tijela [12]. U ICH smjernicama Q3A (R2) [7] i Q3B (R2) [13] navedeni su pragovi izvještavanja (engl. *reporting threshold*) ispod kojih nije potrebno izvještavanje o prisutnim onečišćenjima, prag identifikacije (engl. *identification threshold*) i prag kvalifikacije (engl. *qualification threshold*) (**Tablice 1 i 2**). Tablično navedeni pragovi u ICH vodičima ovise o maksimalnoj dnevnoj dozi ljekovite djelatne tvari.

Tablica 1: Propisani pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije onečišćenja u ljekovitim djelatnim tvarima prema ICH Q3A (R2) [7]

Maksimalna dnevna doza	Prag izvještavanja	Prag identifikacije	Prag kvalifikacije
≤ 2 g/dan	0,05 %	0,10 % ili 1,0 mg/dan unosa	0,15 % ili 1,0 mg/dan unosa
> 2 g/dan	0,03 %	0,05 %	0,05 %

Tablica 2: Propisani pragovi izvještavanja, identifikacije i kvalifikacije razgradnih onečišćenja u novim ljekovitim djelatnim tvarima prema ICH Q3B (R2) [13]

Maksimalna dnevna doza	Prag izvještavanja	Prag identifikacije	Prag kvalifikacije
< 1 mg/dan	0,1 %	1,0 % ili 5 µg TDI*	1,0 % ili 50 µg TDI*
1–10 mg/dan	0,1 %	0,5 % ili 20 µg TDI	1,0 % ili 50 µg TDI*
10–100 mg/dan	0,1 %	0,2 % ili 2 mg TDI	0,5 % ili 200 µg TDI*
0,1–1 g/dan	0,1 %	0,2 % ili 2 mg TDI	0,2 % ili 3 mg TDI
1–2 g/dan	0,05 %	0,2 % ili 2 mg TDI	0,2 % ili 3 mg TDI
> 2 g/dan	0,05 %	0,10 %	0,15 %

*TDI (engl. *total daily intake*) – ukupan dnevni unos

Ovakva podjela i izračun odnosi se na organska onečišćenja, bilo da se radi o poznatom ili nepoznatom onečišćenju, dok su granice za ostatna otapala definirana u poglavlju Q3C (R6) [9].

Preporučene granice za elementne nečistoće i teške metale opisane su u ICH smjernici u poglavlju Q3D [14]. Kontrola ovih onečišćenja je dio strategije kontrole farmaceutske kvalitete koja osigurava da koncentracije elementnih onečišćenje ostanu unutar granica dopuštene dnevne izloženosti (engl. *permitted daily exposure*, PDE) za pojedini farmaceutski proizvod. Na temelju dostupnih informacija o njihovoj toksičnosti i vjerojatnosti pojave u farmaceutskom proizvodu, elementna onečišćenja su podijeljena u tri skupine. U poglavlju Q3D mogu se pronaći dopuštene koncentracijske razine elementnih onečišćenja za oralnu (**Tablica 3**), parenteralnu i inhalacijsku primjenu u svrhu procjene sadržaja elementnih onečišćenja kod ljekovitih oblika, s dozom ne višom od 10 g/dan [14].

Tablica 3: Propisane dopuštene koncentracije elementnih onečišćenja za dnevni unos lijeka (10 g/dan) oralnim putem prema smjernici ICH Q3D [14]

Element	Klasa	Koncentracija (µg/g)
Cd	1	0,5
Pb	1	0,5
As	1	1,5
Hg	1	3
Co	2A	5
V	2A	10
Ni	2A	20
Tl	2B	0,8
Au	2B	10
Pd	2B	10
Ir	2B	10
Os	2B	10
Rh	2B	10
Ru	2B	10
Se	2B	15
Ag	2B	15
Pt	2B	10
Li	3	55
Sb	3	120
Ba	3	140
Mo	3	300
Cu	3	300
Sn	3	600
Cr	3	1100

Slika 2 prikazuje primjer tipičnih materijala, opreme i komponenti korištenih u proizvodnji farmaceutskog proizvoda. Svaki od ovih izvora može doprinijeti pojavi elementnih onečišćenja u lijeku, bilo kojim pojedinim ili bilo kojom kombinacijom navedenih potencijalnih izvora.



Slika 2. Potencijalni izvori elementnih onečišćenja u farmaceutskom proizvodu [14]

*Rizik unosa elementnih onečišćenja smanjuje se pravilnim odabirom, redovitim održavanjem i kvalifikacijom korištene proizvodne opreme.

**Rizik unosa elementnih onečišćenja iz vode smanjuje se pridržavanjem propisanih zahtjeva za kvalitetu vode.

Stoga tijekom procjene rizika, treba uzeti u obzir potencijalni doprinos svakog od tih izvora kako bi se odredio ukupni doprinos elementnih onečišćenja u lijeku. Također, treba razmotriti mogućnosti smanjenja određenih rizika. Na primjer, rizik onečišćenja koje potječe od proizvodne opreme može se smanjiti razumijevanjem procesa, pravilnim odabirom opreme, kvalifikacijom opreme i korištenjem dobre proizvođačke prakse (engl. *good manufacturing practice*, GMP). Dok se rizik za unos elementnih onečišćenja iz vode može smanjiti usklađivanjem s propisanim zahtjevima za kvalitetu vode (npr. europska farmakopeja).

Dopuštene količine genotoksičnih onečišćenja u lijeku navedene su u ICH poglavlju M7(R1) [10]. Skup podataka koji je obično dostupan za genotoksična onečišćenja prilično je varijabilan i glavni je čimbenik koji diktira postupak koji se koristi za procjenu prihvatljivih granica [15]. Prag toksikološke zabrinutosti (engl. *threshold of toxicological concern*, TTC) razvijen je kako bi se definirao prihvatljiv unos bilo koje neistražene kemikalije koja predstavlja zanemariv rizik od kancerogenosti ili drugih toksičnih učinaka. Evaluacija potencijalne genotoksičnosti uključuje početnu analizu stvarnih i potencijalnih onečišćenja pretraživanjem baze podataka i literature za kancerogenost i bakterijsku mutagenost. Na temelju TTC-a smatra se da je prihvatljivi unos genotoksičnog onečišćenja od 1,5 µg po osobi dnevno povezan sa zanemarivim rizikom i da se općenito može koristiti za većinu farmaceutskih proizvoda kao zadana prihvatljiva granica za kontrolu.

Ovaj se pristup obično koristi za mutagene nečistoće prisutne u farmaceutskim proizvodima za dugotrajno liječenje (> 10 godina) i tamo gdje nisu dostupni podaci o kancerogenosti (klase II i III) [10].

Vrijednost TTC-a veća od 1,5 µg/dan može biti prihvatljiva pod određenim uvjetima, npr. kratkotrajna izloženost, za liječenje stanja opasnog po život, kada je očekivani životni vijek kraći od 5 godina ili ako je nečistoća poznata tvar, a izloženost ljudi bit će mnogo veća iz drugih izvora (npr. hrane). Genotoksične nečistoće koje su također značajni metaboliti mogu se procijeniti na temelju prihvatljivosti metabolita. Granice masenog udjela (ppm) genotoksične nečistoće u ljekovitoj tvari dobivenoj iz TTC-a mogu se izračunati na temelju očekivane dnevne doze za pacijenta pomoću sljedeće jednadžbe [15]:

$$\text{Granični udio (ppm)} = \frac{\text{TTC } [\mu\text{g/dan}]}{\text{doza } [\text{g/dan}]} \quad (1)$$

Standardne procjene rizika poznatih kancerogena pretpostavljaju da se rizik od raka povećava kao funkcija kumulativne doze. Stoga bi rizik od kontinuirane niske doze tijekom života bio jednak riziku od raka povezanom s identičnom kumulativnom izloženošću koja je u prosjeku kraća.

Da bi se riješila izloženost mutagenim onečišćenjima u farmaceutskim proizvodima koja je kraća od životnog vijeka (eng. *less-than-lifetime*, LTL), primjenjuje se pristup u kojem se prihvatljiva kumulativna doza tijekom života (1,5 µg/dan × 25,550 dana = 38,3 mg) ravnomjerno raspoređuje na ukupan broj dana izlaganja tijekom kraćeg životnog vijeka. Što omogućava veći dnevni unos mutagenih onečišćenja nego što bi to bio slučaj za cjeloživotno izlaganje, a i dalje održava usporedivu razinu rizika za svakodnevne i nesvakodnevne režime liječenja (**Tablica 4**) [10].

Tablica 4: Prikaz prihvatljivih dnevnih unosa za pojedinačna onečišćenja [10]

Trajanje liječenja	< 1 mjesec	> 1–12 mjeseci	> 1–10 godina	> 10 godina do doživotno
Dnevni unos [µg/dan]	120	20	10	1,5

2.4. Analitička kvaliteta osigurana dizajnom

Kvaliteta osigurana dizajnom (engl. *quality by design*, QbD) podrazumijeva sustavni pristup razvoju koji započinje s unaprijed definiranim ciljevima, stavlja naglasak na razumijevanje proizvoda te na razumijevanje i kontrolu proizvodnog postupka, a temelji se na znanstvenim činjenicama i upravljanju rizicima [16]. Znanstvenim pristupom razvoju farmaceutskog proizvoda mogu se spriječiti problemi kvalitete konačnog proizvoda kroz bolje razumijevanje proizvodnog postupka, definiranjem prostora znanja, identificiranjem kritičnih svojstava kvalitete te naposljetku implementacijom odgovarajuće strategije kontrole. Osnovni cilj QbD pristupa je ugradnja kvalitete u farmaceutski proizvod od početka razvoja kako bi se u konačnici osigurala sigurnost pacijenta.

QbD postao je integralni dio razvoja farmaceutskih proizvoda i proizvodnih postupaka nakon implementacije od strane nekoliko svjetskih regulatornih tijela, poput Američke agencije za hranu i lijekove, Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), japanske Agencije za lijekove i medicinsku opremu (eng. *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*, PMDA) i kanadskog vladinog Odjela za zdravlje (eng. *Health Canada*, HC). Regulatorna tijela predlažu provedbu QbD smjernica opisanih u ICH vodičima za farmaceutsku industriju u poglavljima kao što su ICH Q8 (R2) (Smjernica o farmaceutskom razvoju) [16], ICH Q9 (Smjernica o upravljanju rizicima u kvaliteti) [17], ICH Q10 (Smjernica o farmaceutskom sustavu kvalitete) [18] te ICH Q11 (Smjernica za razvoj i proizvodnju djelatnih tvari (kemijskih tvari i biotehnoloških/bioloških tvari)) [19]. Ovakav pristup razvoju farmaceutskih proizvoda osigurava tržišnu dostupnost proizvoda dosljedne kvalitete, a u slučaju generičkih lijekova, dostupnost lijekova za koje je zajamčena terapijska ekvivalentnost referentnom (izvornom) lijeku.

Analitičke metode predstavljaju kritičan parametar životnog ciklusa farmaceutskog proizvoda zbog njihove uloge u ranoj fazi razvoja novog proizvoda, kao i zbog njihove ključne uloge u kontroli kvalitete konačnog proizvoda. Pravilno razumijevanje svrhe i namjene analitičke metode podrazumijeva razumijevanje kemijske strukture organskog spoja, kao i njegovih fizikalno-kemijskih svojstava, procesnih onečišćenja, razgradnog profila, osjetljivosti na različite okolišne čimbenike, uvjete skladištenja, rok trajanja i ključne značajke kvalitete proizvoda.

Tradicionalni pristup razvoju analitičkih metoda prema načelima pokušaja i pogreške mijenjanjem jednog faktora u vremenu (engl. *one-factor-at-time*, OFAT) sa stajališta farmaceutske industrije iznimno je dugotrajan, a samim tim i skup proces razvoja analitičke metode.

OFAT pristupom moguće je razviti odgovarajuće analitičke metode, no njegovi glavni nedostaci su nedovoljno istražena kombinacija svih značajki koji mogu utjecati na kromatografsko razdvajanje, kao i ograničeno razumijevanje sposobnosti metode, usko područje robusnosti i nemogućnost upravljanja rizicima [20].

Posljednjih godina razvoju analitičkih metoda sve više se pristupa prema načelima „analitičke kvalitete osigurane dizajnom“ kao dijelom strategije potpune procjene rizika. AQbD pristup izravno je povezan s QbD načelima koje je u područje farmaceutske industrije uvela FDA [21]. Glavna svrha AQbD pristupa razvoju analitičkih metoda je potpuno razumijevanje namjene metode, razvoj robusnih metoda i jasno definiranje strategije kontrole metode tijekom njene rutinske primjene.

Posljednjih godina, u porastu je broj znanstvenih radova koji primjenjuju AQbD pristup u razvoju analitičke metode i koji uključuju različite instrumentalne tehnike [22-27].

2.4.1. Definiranje namjene i cilja analitičke metode

Razvoj analitičkih metoda primjenom AQbD pristupa započinje jasnim definiranjem cilja analitičke metode, odnosno profila namjene analitičke metode (engl. *analytical target profile*, ATP). Definiranje namjene i cilja metode podrazumijeva dobro razumijevanje proizvoda i proizvodnog postupka, dok se profil namjene analitičke metode definira kao skup mjernih zahtjeva kojima se osigurava prikladnost metode za određenu namjenu. ATP predstavlja skup kriterija koji definiraju što će se mjeriti, u kojoj matrici uzorka, te u kojem rasponu koncentracija uz zahtjeve koji proizlaze iz poglavlja ICH Q2 (R1) (specifičnost, preciznost, točnost, linearnost, granica dokazivanja i određivanja) [28, 29].

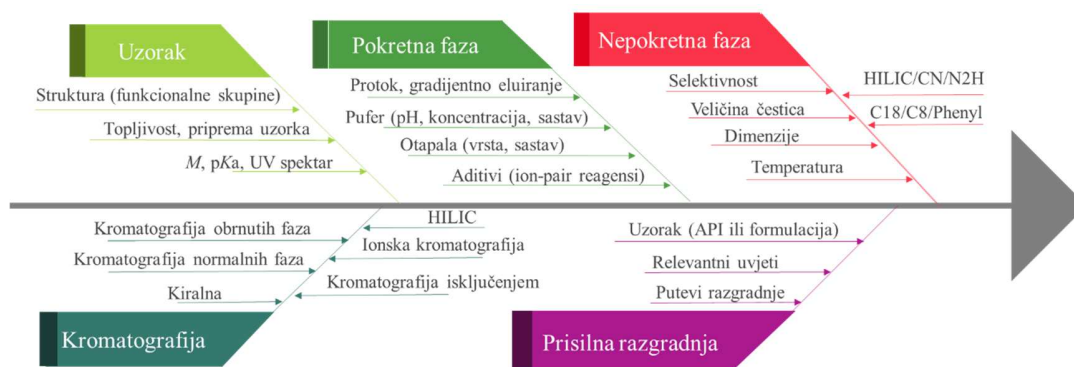
ATP, odnosno općeniti cilj razvoja kromatografskih metoda u farmaceutskoj industriji je razvoj robusne, točne, precizne i selektivne analitičke metode s razumnim trajanjem analize te prihvatljivim troškovima [30].

2.4.2. Procjena rizika i definiranje kritičnih značajki i parametara metode

Jasnim definiranjem cilja i namjene analitičke metode ujedno se definiraju i kritične značajke metode (engl. *critical method attributes*, CMA) koje moraju biti mjerljive i za koje se moraju jasno definirati kriteriji prihvatljivosti. Tijekom procjene rizika potrebno je uzeti u obzir svaku fazu životnog ciklusa analitičke metode, od preliminarnih eksperimenata, dizajna i razvoja metode, validacije metode, sve do njenog odobravanja i rutinske primjene u kontroli kvalitete konačnog proizvoda. Procjena rizika omogućuje identifikaciju kritičnih parametara metode (engl. *critical method parameters*, CMP) koje treba razmotriti tijekom razvoja metode [31].

Procjenom rizika dobivaju se informacije o kritičnim značajkama metode koje mogu imati najveći učinak na zadovoljavanje unaprijed definiranog ATP-a i koje mogu utjecati na kvalitetu konačnog rezultata. Za kromatografske metode kao kritična značajka metode najčešće se definira faktor razlučivanja kritičnog para pikova (R_s), ali i različite kromatografske značajke metode kao što su faktor kapaciteta zadržavanja (k'), asimetrija pika (A_s), učinkovitost odabrane nepokretne faze (broj teorijskih odsječaka, N), a kao kritične značajke metode potrebno je navesti još i vrijeme trajanja analize, preciznost analitičke metode, te mjerno područje metode.

Tijekom procjene rizika potrebno je identificirati parametre metode koji mogu utjecati na definirane CMA. U ovu svrhu poseže se za alatima poput Ishikawinog dijagrama (dijagram riblja kost, engl. *Fishbone diagram*), ili pak alatima poput tzv. analize pogrešaka i posljedica (engl. *failure modes and effects analysis*, FMEA). Primjer identifikacije potencijalnih rizika primjenom Ishikawinog dijagrama prikazan je na slici ispod (**Slika 3**).



Slika 3. Primjer identifikacije potencijalnih rizika primjenom Ishikawinog dijagrama tijekom razvoja stabilitetno-indikativne metode prema AQbD načelima

Ishikawin dijagram predstavlja alat za kvalitativnu procjenu rizika koji omogućuje identifikaciju i klasifikaciju glavnih izvora opasnosti u kategorije, dok se za kvantitativnu procjenu rizika koristi FMEA metodologija. FMEA metodologija se temelji na kritičkom ocjenjivanju svake ispitivane značajke metode prema vjerojatnosti, P (vjerojatnost da će se pojaviti na temelju dosadašnjeg iskustva, razumijevanja procesa); detekciji, D (sposobnost da će se otkriti neuspješnost analitičke metode) i ozbiljnosti, S (posljedice, kakav će učinak imati na izvedbu metode, utjecaj na pacijenta, udovoljavanje zahtjevu specifikacije itd.). Za svaki P, S i D koristi se sustav numeriranja, a faktor rizika izračunava se kao doprinos sva tri faktora ($P \times S \times D$) [32]. Promjenjivost kritičnih parametara metode utječe na definirane kritične značajke metode, stoga ih je potrebno kontrolirati. Kritični parametri metode koji mogu imati najveći utjecaj na kritične značajke i specifičnost/selektivnost kromatografske metode su vrijeme trajanja gradijenta (t_G), temperatura nepokretne faze (T), pH vodene komponente pokretne faze (A), sastav organske komponente pokretne faze (B) kao i sastav nepokretne faze (kromatografska kolona).

2.4.3. Dizajn eksperimenta

Nakon definiranja CMA i CMP, sljedeći korak je ispitivanje njihovih međusobnih utjecaja. Načela AQbD-a temelje se na definiranju teorijskog prostora robusnosti analitičke metode (engl. *design space*) koristeći statističke alate i metode kao što je planiranje eksperimenata (DoE) s ciljem procjene utjecaja CMA na CMP. Teorijski prostor robusnosti analitičke metode predstavlja višedimenzionalnu kombinaciju i interakciju kritičnih parametara metode koje utječu na izvedbene značajke metode.

2.4.3.1. Metodologija probirnog dizajna i dizajna odgovora površine

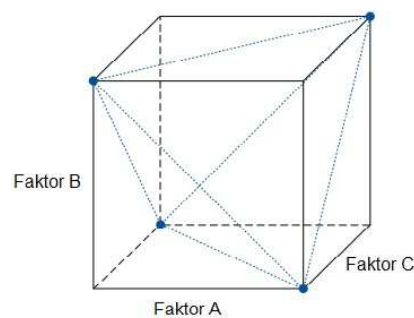
Primijenjeni statistički model planiranja eksperimenta treba omogućiti procjenu eksperimentalne pogreške i procjenu valjanosti modela, a sam plan eksperimenta sastoji se od faze razvoja i faze optimizacije. U fazi razvoja, kroz provedbu preliminarnih studija, utvrđuje se odnos kritičnih značajki metode i kritičnih parametara metode. U tu svrhu koristi se metodologija probirnog dizajna (engl. *screening design*) koja se temelji na primjeni statističkih alata poput Plackett-Burmanov dizajna i djelomičnog faktorskog dizajna na dvije razine (engl. *fractional factorial design*) [32].

Djelomični faktorski dizajn (Slika 4) zasniva se na načelu provođenja manjeg broja eksperimenata, a eksperimenti se pažljivo odabiru kako bi uključili što više informacija o samoj analitičkoj metodi.

Budući da se provodi manji broj eksperimenata, neminovno se gube informacije o nekim interakcijama odabranih čimbenika [33]. Kod djelomičnog faktorskog dizajna ukupan broj eksperimenata (N) definiran je jednadžbom:

$$N = n^{k-p} \quad (2)$$

gdje je n broj razina, k broj faktora, a p proizvoljna vrijednost koja se uzima ovisno o željenom smanjenju broja eksperimenata (npr. $p = 0$ za potpuni faktorski dizajn, $p = 1$ u slučaju kada želimo provesti samo polovicu eksperimenata potpunog faktorskog dizajna).



Slika 4. Djelomični faktorski dizajn za tri čimbenika na dvije razine [33]

Plackett–Burmanov dizajn (Slika 5), za razliku od djelomičnog faktorskog dizajna, pruža informacije o učincima značajnih čimbenika, ali ne i o njihovim međusobnim interakcijama. U ovom slučaju se koristi najmanji mogući dio n -razinskog dizajna, a značajka ovog dizajna je izvođenje $4n$ eksperimenata. Plackett–Burmanov dizajn s $4n$ eksperimenata prikladan je za proučavanje do $4n-1$ čimbenika [33, 34]. Tako se preliminarne studije koje sadrže i do 11 čimbenika, mogu provesti u samo 12 eksperimenata.

	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Slika 5. Plackett-Burmanov plan za provedbu 12 eksperimenta za 11 odabranih čimbenika [34]

Dizajni odzivne površine (engl. *response surface design, RSM*) poput potpunog faktorskog dizajna na tri razine, centralno kompozitnog dizajna, Box-Behnkenovog dizajna, Doehlertovog dizajna, D-optimalnog dizajna te mješovitog dizajna, koriste se kao skup matematičkih i statističkih metoda kojima se modeliraju i analiziraju utjecaji nekoliko čimbenika na promatrani odgovor. U fazi optimizacije se najčešće koriste metode centralnog kompozitnog dizajna, Box-Behnkenov i Doehlertov dizajn [35]. Navedene metode temelje se na ispitivanju velikog broja eksperimentalnog radnog područja, razumijevanju dobivenih odgovora i kritičnih značajki metode, te utvrđivanju odnosa utjecajnih (nezavisnih) čimbenika na zavisnu varijablu (odgovor) kroz odzivnu funkciju. Opći oblik modela [36] dan je jednadžbom (3), gdje je ε pogreška.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon \quad (3)$$

Prvi korak u modeliranju površine odaziva zasniva se na pronalasku odgovarajuće aproksimacije za stvarnu vezu između zavisne varijable y i nezavisnih varijabli x_i , a pri tome se najčešće koriste polinomi nižeg reda. Model prvog reda (jednadžba (4)) primjenjuje se ako je zavisna varijabla y dobro opisana linearnom kombinacijom nezavisnih varijabli:

$$y = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + \dots + B_nx_n + \varepsilon \quad (4)$$

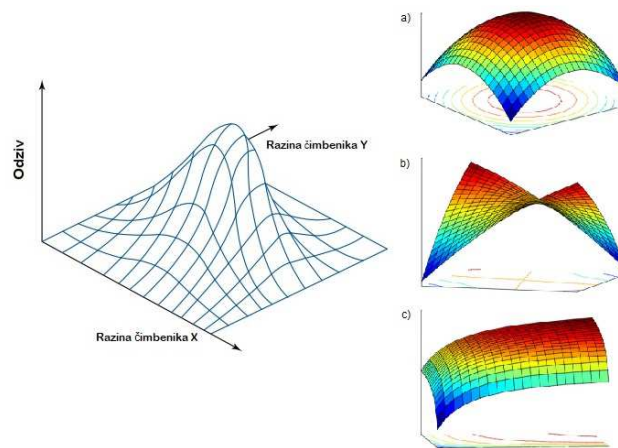
B_0, B_1, \dots, B_n su regresijski koeficijenti.

Ako veza između zavisne varijable i nezavisnih varijabli nije linearna nego dijagram raspršenja poprima neki drugi oblik, koriste se polinomi višeg stupnja, najčešće drugog, pa je riječ o modelu drugog reda:

$$y = B_0 + \sum_{i=1}^n B_i x_i + \sum_{i=1}^n B_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^n B_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (5)$$

Gotovo svi RSM dizajni koriste jedan od ova dva modela ili oba. Za određivanje parametara modela koristi se statistička metoda najmanjih kvadrata. RSM, tj. model odzivne površine, je slijedni proces koji se odvija u više koraka. Polazeći od jednostavnog modela prvog reda, pokušava se pronaći optimalna aproksimacija veze između zavisne varijable i nezavisnih varijabli. Nakon što se, primjenom statističkih metoda, dobije optimalan model prvog reda prelazi se na analizu modela drugog reda za promatrani problem [36].

Istovremeno, mjerenje nekoliko kritičnih značajki i preklapanje srednjih odgovora površine koristi se kako bi se pronašla kombinacija značajki kojom se predviđa optimalan odgovor s dobrom preciznošću. Model odzivne površine prikazuje se grafički u čitavom eksperimentalnom području mogućih kombinacija čimbenika, a za trodimenzionalnu vizualizaciju površine odgovora upotrebljava se konturni dijagram (**Slika 6**) [34, 37].



Slika 6. Primjer odzivne površine za dva čimbenika; a) maksimalni odziv površine u ispitivanom području za dva čimbenika; b) bez jasnog maksimuma odzivne površine u ispitivanom području za dva čimbenika; c) konstantan odziv površine („plato“) u ispitivanom području za dva čimbenika [34, 37]

U dizajnu eksperimenta kromatografskih metoda najčešće se primjenjuju Monte Carlo simulacije kojima se dobivaju podaci i/ili poboljšava učinkovitost metode pomicanjem unutar prostora dizajna do područja koje pokazuje najveću izdržljivost za kombinacije ulaznih varijabli [38].

2.4.3.2. Primjena statističkih programskih paketa u razvoju metoda prema AQbD načelima

Posljednjih godina sve više su u upotrebi mnogobrojni računalni programi poput DryLab (Molnár Institute, Berlin, Njemačka), ACD/LC Simulator (ACD/Labs, Toronto, Kanada), ChromSword (ChromSword Group, Riga, Latvija), Osiris (Datalys, Grenoble, Francuska) te Fusion AE (S-Matrix, Eureka, CA, Amerika). Zahvaljujući komercijalnoj dostupnosti navedenih statističkih programskih paketa sve je veća i primjena AQbD pristupa u razvoju analitičkih metoda. Načela rada ovih programski paketa temelje se na kromatografskim teorijama poput teorije linearne jakosti otapala (engl. *linear solvent strenght theory*), solvofobne teorije (engl. *solvophobic theory*) te modelu višestruke linearne regresije (engl. *multiple linear regression*, MLR). Provedbom malog broja eksperimenta računalni programi mogu predvidjeti kretanje pikova u kromatografskom sustavu u ovisnosti o promijeni sastava ili pH pokretne faze, promijeni temperature nepokretne faze, brzine protoka te promijeni dimenzija i veličina čestica nepokretne faze. Najčešće korišteni računalni program u razvoju analitičkih metoda je komercijalni računalni program DryLab (Molnar Institute, Berlin, Njemačka) [39, 40].

Teorijska osnova DryLab računalnog programa temelji se na primjeni solvofobne teorije koja koristi termodinamička načela u opisu kromatografskog ponašanja analita [40, 41]. Prema solvofobnoj teoriji, kromatografski sustav može se sagledati kao reverzibilno vezanje molekula analita s ugljikovodičnim ligandima nepokretne faze, a na čije vezivanje veći utjecaj ima pokretna faza nego same privlačne sile između molekula analita i liganda nepokretne faze [41].

Termodinamika slobodne energije u kromatografskim procesima opisana je sljedećom jednačbom [40]:

$$\ln k = A + BD + C\Delta A + D(\kappa^e - 1)V^{2/3}\gamma + E + RT\ln\left(\frac{RT}{p_0V}\right) \quad (6)$$

gdje su:

A i C – konstante koje se određuju eksperimentalno

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

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

γ – površinski napetost, $N\ m^{-1}$

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

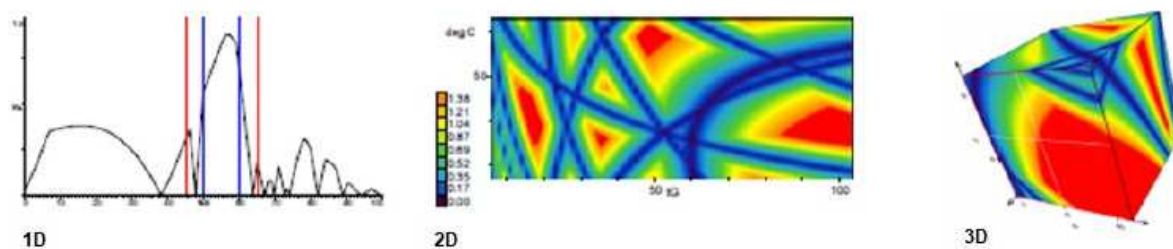
T – temperatura, K

p_0 – atmosferski tlak, Pa

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

κ_e – molekulski parametar analita.

Navedena jednačba opisuje utjecaj pokretne faze na osnovu površinske napetosti, s obzirom na utjecaj temperature, utjecaj molekulskih svojstava analita i kemijski vezanog liganda i utjecaj elektrostatskih svojstava kao što su koncentracija pufera u vodenoj komponenti pokretne faze [40, 42]. Prednosti upotrebe DryLab računalnog programa je njegova jednostavnost. Na osnovu provedenih preliminarnih eksperimenata i odabira kritičnih parametara metode koji će se pri tome mijenjati, moguće je generirati 1-, 2- ili 3-dimenzionalni model (**Slika 7**) ovisno mijenja li se jedan, dva ili tri parametra. Na taj način se predviđa kretanje pikova u kromatogramu u različitim uvjetima i izračunava se kritično razlučivanje između dva analita čije je razlučivanje najlošije (kritični par).



Slika 7. Primjer 1D, 2D i 3D vizualnog prikaza radnog područja metode (MODR) dizajniranog upotrebom DryLab računalnog programa [43]

DryLab na taj način daje vizualni prikaz područja robusnosti metode odnosno radnog područja metode (MODR) unutar kojeg svaka odabrana radna točka može biti validirana i odabrana za kvantitativnu analizu [44].

2.4.4. Validacija analitičke metode i strategija kontrole

Validacija razvijenih analitičkih metoda slijedi smjernice opisane u poglavlju ICH Q2 (R1) [28] s naglaskom na ispitivanje robusnosti. Tijekom formalne validacije analitičkih metoda ispituje se njena točnost, preciznost, linearnost, radno područje, granice detekcije i kvantifikacije kao i prikladnost sustava (broj teorijskih odsječaka (N), faktor kapaciteta (k'), ponovljivost (RSD %)). Rizik neuspjeha tijekom validacije je nizak upravo zbog ovakvog temeljitog pristupa razvoju analitičke metode prema AQbD načelima.

Uspostavljanje strategije kontrole analitičke metode temelji se na skupu podataka koji su prikupljeni tijekom faze razvoja, optimizacije i validacije analitičke metode. Strategija kontrole osigurava korištenje metode u skladu s njenom namjenom, a definira se postavkama metode kojima se osigurava zadovoljavanje tradicionalnih kriterija prikladnosti sustava [45].

Tijekom definiranja strategije kontrole potrebno je obratiti pozornost na kritične značajke analitičke metode koje su tijekom procjene rizika identificirane kao one koje je potrebno kontrolirati, kao i na značajke za koje se tijekom ispitivanja robusnosti analitičke metode dokazalo da imaju veliki utjecaj na konačne rezultate analize.

Definiranje strategije kontrole temeljene na AQbD načelima ne razlikuje se u usporedbi s tradicionalnim pristupom. Važna razlika između navedenih pristupa je da se definiranje strategije kontrole AQbD pristupom temelji na većoj količini dostupnih podataka koji zadovoljavaju predefinirane ATP kriterije čime je ostvarena veća razina povezanosti svrhe i namjene analitičke metode i izvedbenih značajki metode [44].

Kod kromatografskih metoda namijenjenih za rutinsku primjenu u farmaceutskoj industriji, strategija kontrole temelji se na ispitivanju prikladnosti sustava (engl. *system suitability test*, SST) koje pokazuje da analitička metoda zadovoljava kritične značajke kvalitete definirane tijekom AQbD razvoja [46]. Na temelju dostupnih podataka, a u svrhu ispitivanja prihvatljivosti sustava, najčešće se definiraju kriteriji prihvatljivosti minimalne vrijednosti faktora razlučivanja (R_s) između kritičnog para analita, definira se prihvatljiva vrijednost simetričnosti pikova, maksimalno prihvatljiva vrijednost izražena kao relativno standardno odstupanje (RSD %) za ponovljene analize otopine standarda te minimalna vrijednost koeficijenta determinacije kalibracijske krivulje standarda (R^2).

Procjena valjanosti svakog pojedinog analitičkog rezultata moguće je i vremenski pratiti, a u tu svrhu koriste se grafičke metode poput kontrolnih karata (primjer Shewartove kontrolne karte za z-vrijednosti). Ovakva unutarnja strategija kontrole može dati uvid u trendove rezultata.

2.4.5. Kontinuirano poboljšanje i upravljanje životnim ciklusom analitičke metode

Rutinska primjena razvijene analitičke metode podrazumijeva i kontinuirano praćenje izvedbe metode kao i kontrolu kritičnih značajki koje su usko povezane s definiranim ATP zahtjevima. Optimizacija kromatografskih metoda je vrlo složen posao s obzirom na veliki broj značajki koje mogu utjecati na kromatografsko razlučivanje, no iskustvo i znanje stečeno tijekom faze razvoja analitičke metode prema AQbD načelima, kroz procjenu valjanosti metode i definiranje strategije kontrole, omogućuje kontinuirano poboljšanje izvedbenih značajki postojećih metoda [47]. Vrlo često se validacija analitičkih metoda provodi jednokratno s ciljem izrade validacijskog izvještaja i provedbe testiranja metode prema smjernicama opisanima u poglavlju ICH Q2 (R1). Kad govorimo o upravljanju životnim ciklusom analitičke metode, validacijska testiranja potrebno je provoditi kao smislenu potvrdu valjanosti metode čime se osiguravaju dosljedne izvedbene značajke metode [48].

Upravljanje životnim ciklusom analitičke metode temelji se na potpunom razumijevanju izvora varijabilnosti i kontroli kritičnih parametara metode koji mogu utjecati na valjanost i istinitost konačnog rezultata. AQbD pristup životnom ciklusu analitičke metode koristi znanstvene činjenice temeljene na načelima i alatima koji su predloženi u ICH smjernicama (ICH Q8, ICH Q9, ICH Q10 i ICH Q11), a na ovaj se način tradicionalni pristupi validaciji, verifikaciji i transferu analitičke metode integriraju u životni ciklus analitičke metode i ne gledaju se više kao zasebne cjeline.

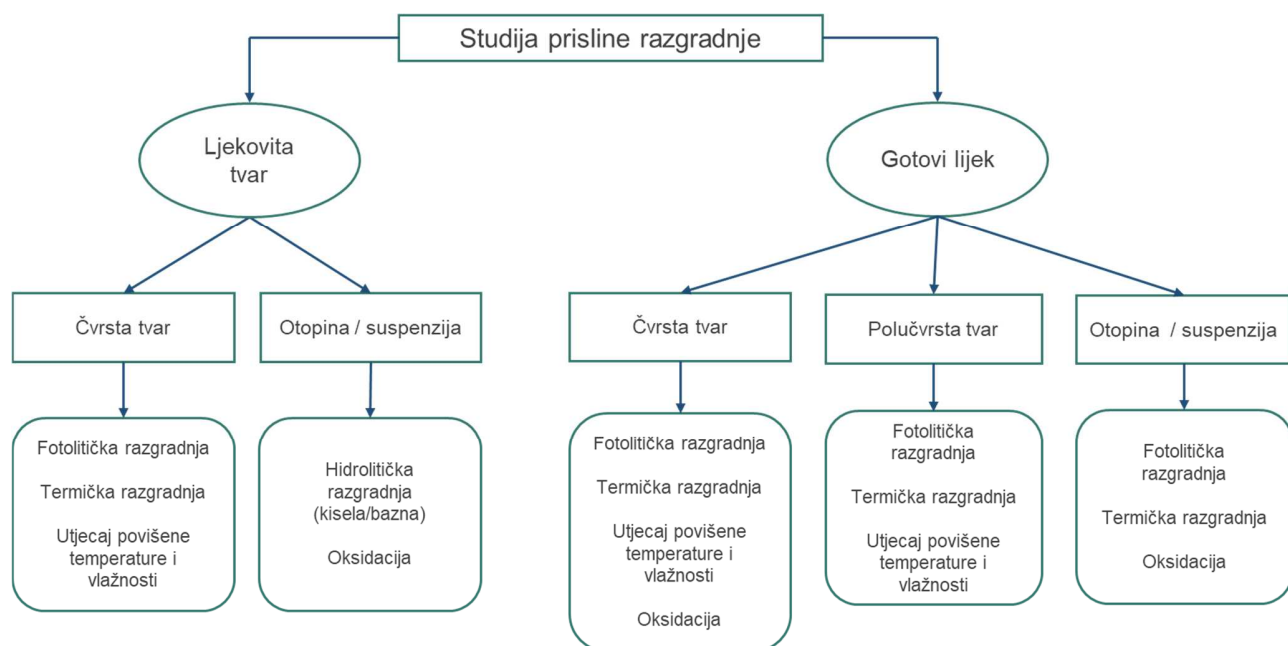
Glavna prednost primjene životnog ciklusa metode umjesto tradicionalne validacije je fleksibilnost u provođenju validacijskih aktivnosti i kontrola samo onih značajki za koje je procjenom rizika utvrđeno da ih je potrebno validirati i koje su definirane ATP-om za danu namjenu metode, a samim tim izbjegava se često nepotreban opsežan rad, utrošak radnog vremena i resursa.

2.5. Prisilna razgradnja

Stabilnost farmaceutskog proizvoda ili ljekovite djelatne tvari kritični je parametar koji može utjecati na čistoću, potentnost i sigurnost lijeka. Budući da promjene u stabilnosti lijeka, kao što su formiranje toksičnih razgradnih produkata ili primjena manje doze lijeka nego što je očekivano, mogu dovesti u rizik pacijentovu sigurnost, nužno je poznavati utjecaj različitih okolišnih čimbenika na ljekovitu djelatnu tvar. Stoga je veliki naglasak u kontroli kvalitete farmaceutskog proizvoda stavljen upravo na aktivnosti ispitivanja stabilnosti ljekovite djelatne tvari te na razvoj i validaciju stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda koje se koriste za kvantifikaciju djelatne tvari i onečišćenja. Pri tome značajnu ulogu imaju studije prisilne razgradnje ljekovite djelatne tvari (**Slika 8**) koje ukazuju na kemijsko ponašanje same molekule, ali i pomažu u daljnjem razvoju formulacije kao i postavljenju zahtjeva za prikladno pakiranje i skladištenje gotovog proizvoda. Prisilna razgradnja ljekovite djelatne tvari i gotovog proizvoda temelji se na uvjetima koji su znatno rigorozniji od uvjeta čuvanja i skladištenja samog proizvoda, a time se daje uvid u mehanizme i puteve razgradnje proizvoda [49–52]. Zbog ovog razloga, studije prisilne razgradnje postale su dio razvojnog procesa svakog farmaceutskog proizvoda, a ujedno i najvažniji alat u predviđanju dugoročne stabilnosti lijekova i ljekovitih djelatnih tvari. Regulatorne agencije preporučuju provođenje studija prisilne razgradnje u ranoj fazi razvoja lijeka. Iako se smjernice opisane u ICH vodičima za farmaceutsku industriju smatraju temeljnim polazištem prilikom izvođenja studija prisilne razgradnje, one ne daju detaljne upute o načinu njihovog provođenja, stoga se izvedba studija prisilne razgradnje uglavnom temelji na znanju i iskustvu istraživača analitičara, fizikalno-kemijskim karakteristikama same ljekovite djelatne tvari i na proučavanju dostupne znanstvene literature.

ICH smjernice preporučuju sljedeće uvjete provođenja studija prisilne razgradnje (**Slika 8**):

- hidrolitička razgradnja (kisela i/ili bazična),
- oksidacija,
- termička razgradnja i
- fotolitička razgradnja (izlaganje UV-A zračenju i vidljivoj svjetlosti).



Slika 8. Dijagram toka različitih uvjeta provođenja studija prisilne razgradnje koji se koriste za ispitivanje razgradnje ljekovitih djelatnih tvari i lijekova [49]

2.5.1. Uvjeti prisilne razgradnje

2.5.1.1. Hidrolitička razgradnja

Reakcije hidrolitičke razgradnje, uz reakcije oksidacije, predstavljaju najučestalije mehanizme razgradnje ljekovite djelatne tvari. Ove reakcije su katalizirane djelovanjem kiselina ili baza. Odabir uvjeta hidrolitičke razgradnje (kisela ili bazična hidroliza) ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama i stabilnosti analita. Kao prikladni reagensi za hidrolitičku razgradnju uglavnom se predlažu klorovodična kiselina (0,1–1,0 M) za kiselu hidrolizu, te natrijev ili kalijev hidroksid (0,1–1,0 M) za bazičnu hidrolizu [53, 54]. Ispitivanja hidrolitičke razgradnje provode se pri sobnoj temperature, no ako ne dolazi do razgradnje preporučuje se primjena povišene temperature (50–70 °C) kako bi se ubrzali mehanizmi razgradnje. Nije preporučljivo koristiti temperature više od navedenih zbog nepredviđenog ponašanja ispitivanog analita pri takvim uvjetima. U **Tablici 5** prikazane su funkcionalne skupine koje podliježu hidrolitičkoj razgradnji kao i mehanizmi njihove razgradnje.

Tablica 5: Funkcionalne skupine spojeva koje podliježu hidrolitičkoj razgradnji [53]

Funkcionalna skupina	Mehanizmi hidrolitičke razgradnje
Esteri	razgradnja esterske skupine na alkohol i kiselinu
Amidi	razgradnja amidne skupine na kiselinu i amin
Laktami	razgradnja laktamskog prstena na kiselinu i alkohol
Laktoni	razgradnja laktonskog prstena na kiselinu i alkohol
Imidi	razgradnja imidnog prstena
Alkil kloridi	prelazak u odgovarajući alkohol
Azometini	pucanje veze

2.5.1.2. Oksidacijska razgradnja

Reakcije oksidacije su najčešće reakcije razgradnje ljekovite djelatne tvari, a testiranje uvjeta oksidacije jedan od najčešće provedenih studija prisilne razgradnje ljekovite djelatne tvari. Prilikom ispitivanja oksidacije predlaže se upotreba vodikovog peroksida u koncentracijskom rasponu od 3 do 30% v/v. Osim vodikovog peroksida, tijekom provođenja studija prisilne razgradnje, mogu se koristiti i drugi oksidansi (npr. metalni ioni, radikali) [53]. U **Tablici 6** prikazane su funkcionalne skupine koje su podložne oksidacijskoj razgradnji.

Tablica 6: Funkcionalne skupine koje podliježu oksidacijskoj razgradnji [53]

Funkcionalna skupina	Mehanizmi razgradnje
Tioli	Nastajanje S-oksida i disulfida
Tioeteri	Nastajanje S-oksida
Biciklički i triciklički fenoli	Nastajanje dimera
Polihidroksibenzeni	Nastajanje kinona
Tiazini	Nastajanje S-oksida
Nezasićene skupine	Nastajanje hidroperoksida
Derivati N-izopropiletanolamina	Oksidacija N-izopropiletanolaminske skupine
Derivati indola	Oksidacija skupine N-H

2.5.1.3. Razgradnja pod utjecajem povišene temperature (termička razgradnja)

Studije razgradnje pod utjecajem povišene temperature povode se na temperaturama od 40 do 80 °C. Kako bi se ljekovita djelatna tvar razgradila pod utjecajem temperature treba biti izložena dovoljno visokoj temperaturi koja će uzrokovati pucanje kovalentnih veza uzrokujući pirolizu uzorka. Utjecaj temperature na razgradnju može se opisati Arrheniusovom jednadžbom [49]:

$$k = A \times e^{-E_a/RT} \quad (7)$$

gdje je:

k – konstanta brzine kemijske reakcije

A – faktor frekvencije (npr. frekvencija sudara između reaktanata)

E_a – energija aktivacije (kJ mol^{-1})

R – opća plinska konstanta ($8,3145 \text{ J K mol}^{-1}$)

T – termodinamička temperatura (K)

Prikazana jednadžba opisuje ovisnost brzine reakcije razgradnje o temperaturi kojoj je uzorak izložen [49]. Treba napomenuti da je Arrheniusova jednadžba bolje primjenjiva kod istraživanja stabilnosti suhih oblika, uz pretpostavku manje ukupne razgradnje (od ≈ 5 do 10 %). Kod veće razgradnje može se pojaviti i razgradnja drugog stupnja, pa jednadžba ne mora dati točne rezultate.

2.5.1.4. Fotolitička razgradnja

Ispitivanja fotostabilnosti ljekovite djelatne tvari dio su studija prisilne razgradnje. Uvjeti ispitivanja fotolitičke razgradnje opisani su u smjernicama ICH Q1B koja predlaže izlaganje ljekovite djelatne tvari vidljivom svjetlu uz ukupno trajanje osvjetljavanja od najmanje 1,2 milijuna lxh za vidljivo svjetlo i 200 Wh/m^2 za ultraljubičasti dio spektra [55]. Prema ICH smjernicama ispitivanje stabilnosti pod utjecajem svjetla provodi se prema Opciji 1 i Opciji 2.

Opcija 1 simulira uvjete Sunčevog zračenja uz pomoć svjetiljke koja kombinira ultraljubičasti i vidljivi dio spektra. Koriste se svjetiljke od metalnih halida ili ksenonova lampa, a uzorci su istovremeno izloženi UV-A i UV-B zračenju te vidljivom zračenju (420 do 800 nm).

Opcija 2 simulira osvjetljavanje unutar zatvorenog prostora, a svjetlo koje se koristi pri ispitivanju sastoji se od hladnog bijelog fluorescentnog svjetla i bliskog UV svjetla (ksenonova lampa).

Funkcionalne skupine koje su podložne fotolitičkoj razgradnji navedene su u **Tablici 7**.

Tablica 7: Funkcionalne skupine koje podliježu fotolitičkoj razgradnji [53]

Funkcionalna skupina	Mehanizmi fotolitičke razgradnje
Olefini	izomerna konverzija s ili bez fotociklizacije nastajanje epoksida, nastajanje hidroperoksida, dimerizacija
Ariloctena kiselina	dekarboksilacija
Aromatska nitro-skupina	redukcija u nitrozo-skupinu i oksidacija prstena
Arilhalogenidi	dehalogeniranje
<i>N</i> -alkilni derivati	<i>N</i> -dealkiliranje
Derivati benzofenona	nastajanje radikala
<i>N</i> -oksidi	nastajanje oksaziridina

2.5.1.5. *In silico* predviđanje puteva razgradnje ljekovite djelatne tvari

Danas je na tržištu dostupan računalni program za *in silico* predviđanje puteva razgradnje ljekovite djelatne tvari. Primjena Zeneth[®] (Lhasa Limited, Leeds, Velika Britanija) računalnog programa omogućuje bolje razumijevanje mogućih puteva razgradnje ljekovite djelatne tvari u unaprijed definiranim uvjetima koji se najčešće koriste tijekom studija ispitivanja prisilne razgradnje [56, 57]. Prednosti korištenja Zeneth[®] računalnog programa je pristup bazi znanja koja uvelike može pomoći prilikom identifikacije, kao i u predlaganju struktura nastalih razgradnih produkata.

2.6. Instrumentalne analitičke tehnike u analizi ljekovitih djelatnih tvari

2.6.1. Kromatografija

Kromatografija (grč. *chroma* – boja; *graphein* – pisati) je fizikalno-kemijska metoda odjeljivanja sastojaka smjese (analita) raspodjelom između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga se giba u određenom smjeru (pokretna faza) [58].

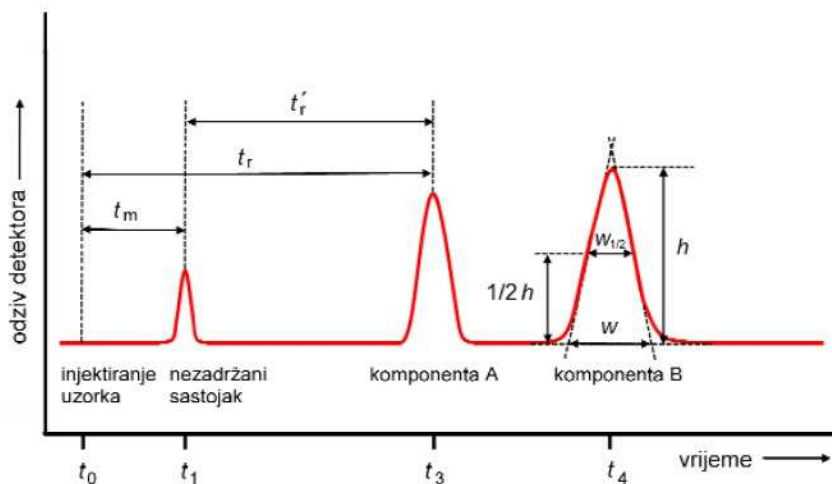
S obzirom na fizikalno stanje pokretne faze razlikujemo plinsku (engl. *gas chromatography*, GC), tekućinsku (engl. *liquid chromatography*, LC) i fluidnu kromatografiju pri superkričnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC), a osnovu razdjeljivanja čine diferencijalne brzine prolaska analita kroz nepokretnu fazu kretanjem pokretne faze. Kromatografske tehnike mogu se podijeliti prema prirodi ravnoteže pokretne i nepokretne faze, te razlikujemo adsorpcijsku, afinitetnu, iono-izmjenjivačku kromatografiju, kromatografiju isključenjem i razdjelnu kromatografiju (**Tablica 8**) [59–61].

Tablica 8: Podjela kromatografije prema mehanizmima odvajanja

Vrste	Princip separacije
Adsorpcijska kromatografija	Razdvajanje komponenti na temelju različite adsorpcije na površini čvrstog sorbensa. Ravnoteža se uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze. Ispitivane molekule se vežu izravno na površinu adsorbensa.
Afinitetna kromatografija	Razdvajanje se temelji na specifičnim interakcijama analita i molekula vezanih za nepokretnu fazu. Na površini čvrste nepokretne faze nalaze se različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, a vezivanje se ostvaruje zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze.
Iono-izmjenjivačka kromatografija	Razdvajanje se temelji na ravnotežnom procesu između nabijenih funkcionalnih grupa na nepokretnoj fazi i iona prisutnih u uzorku i pokretnoj fazi.
Kromatografija isključenjem	Nepokretna faza je materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima. Razdvajanje se temelji na razlikama u veličini i/ili obliku molekula ili naboju; molekule određene veličine ne mogu ući u pore nepokretne faze i tako se odvajaju od manjih molekula.
Razdjelna kromatografija	Ravnoteža se uspostavlja između dviju kapljevine, što znači da je i nepokretna faza kapljevine vezana na inertni čvrsti nosač.

2.6.1.1. Kromatografski parametri

Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o vremenu potrebnom da se sastojak ispere s kolone ili o volumenu eluata naziva se kromatogram [62]. Položaj kromatografskog pika na vremenskoj osi može poslužiti za identifikaciju sastojka, a iz površine ispod kromatografskog pika moguće je izračunati koncentraciju odgovarajućeg sastojka.



Slika 9. Prikaz kromatograma uzorka s dva analita. Oznaka t_m predstavlja zadržano vrijeme, t_r ukupno vrijeme zadržavanja, t_r' prilagođeno vrijeme zadržavanja, h visinu kromatografskog pika, w širinu kromatografskog pika na osnovici, a $w_{1/2}$ širinu kromatografskog pika na polovici njegove visine [62]

Najvažniji kromatografski parametar za kvalitativnu analizu je vrijeme zadržavanja. Ukupno vrijeme zadržavanja, t_r , je karakteristično za svaku komponentu, a predstavlja vrijeme koje je potrebno od injektiranja uzorka na kolonu do njenog maksimalnog odziva. Zadržano vrijeme, t_m , je vrijeme potrebno nezadržanoj komponenti pokretne faze za prolazak kroz kolonu. Ono se koristi za izračunavanje prilagođenog vremena zadržavanja, t_r' , parametra koji predstavlja vrijeme koje je potrebno razmatranoj komponenti uzorka za dolazak do detektora nakon što je nezadržani sastojak stigao na detektor. Često se koristi umjesto ukupnog vremena zadržavanja [62], a izračunava se kao razlika ukupnog vremena zadržavanja i zadržanog vremena prema izrazu:

$$t_r' = t_r - t_m \quad (8)$$

Tekućinska kromatografija se zasniva na principu razdvajanja sastojaka smjese na temelju različitog afiniteta prema pokretnoj i nepokretnoj fazi.

Faktor zadržavanja, k , je mjera zadržavanja analita na koloni, jednaka je omjeru vremena koje otopljena tvar provede u nepokretnoj fazi prema vremenu koje provede u pokretnoj fazi [63]:

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (9)$$

Faktor zadržavanja analita se može povezati s koeficijentom njegova razdjeljenja između nepokretne i pokretne faze, K , prema jednadžbi (10), gdje je V_S/V_M omjer volumena nepokretne i pokretne faze [63].

$$\log k = \log K + \log \frac{V_S}{V_M} \quad (10)$$

Separacijski faktor ili koeficijent selektivnosti α je mjera relativnog zadržavanja dva analita [62]:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (11)$$

Koeficijent selektivnosti je mjera razlike u migraciji i ovisna je o više čimbenika: vrsti nepokretne faze, sastavu pokretne faze i svojstvima analita.

Teorijski odsječak je virtualan pojam koji predstavlja uspostavljanje ravnoteže analita između pokretne i nepokretne faze. Brojem teorijskih odsječaka opisuje se djelotvornost kromatografske kolone [62]:

$$N = \frac{L}{H} \quad (12)$$

gdje N predstavlja broj teorijskih odsječaka, L duljinu kolone, a H visinu teorijskog odsječka. Broj teorijskih odsječaka za različite analite, na istoj kromatografskoj koloni može biti različit. Uz veći broj teorijskih odsječaka, odnosno manju visinu odsječka, kromatografska krivulja je uža, a djelotvornost kolone veća. Također, visina i broj odsječaka mogu se izračunati iz kromatograma, uz poznatu duljinu kolone. Visina odsječka računa se prema sljedećoj jednadžbi (13) gdje w predstavlja širinu pika na njegovoj osnovici.

$$H = \frac{L \times w^2}{16 \times t_r^2} \quad (13)$$

Broj teorijskih odsječaka definiran je sljedećim jednažbama:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \quad (14)$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (15)$$

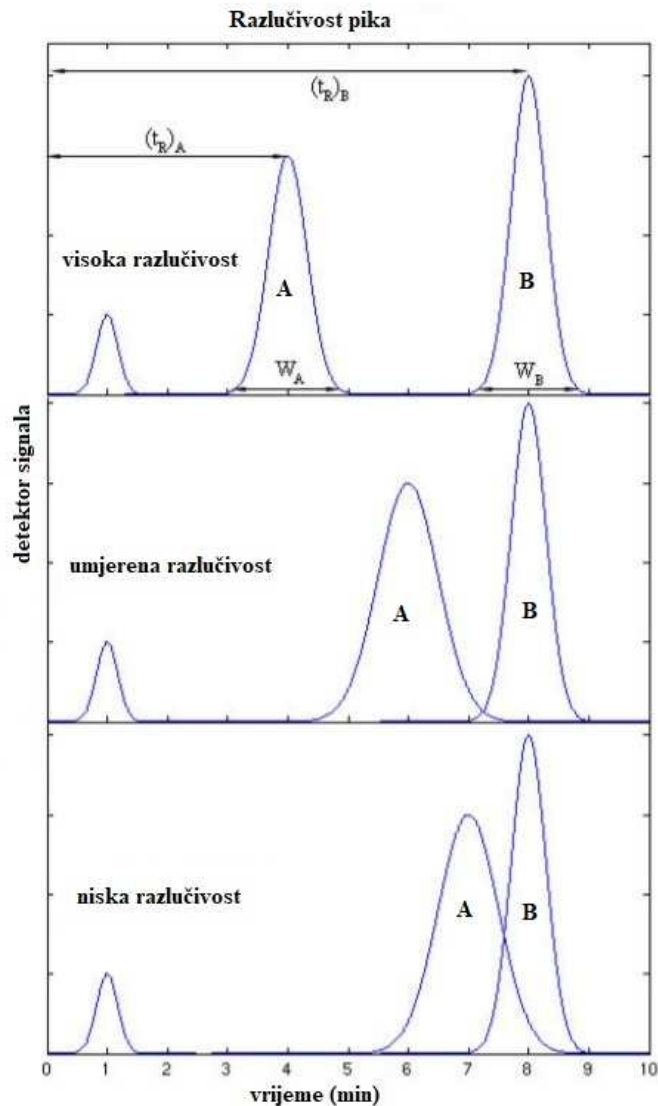
gdje $w_{1/2}$ predstavlja širinu pika u polovici visine [62].

Kvaliteta odjeljivanja dva susjedna pika mjeri se razlučivanjem (R_s), a definirana je razlikom vremena zadržavanja dva pika podijeljena sa srednjom vrijednosti širine pika [62]:

$$R_s = \frac{2 \times \{(t)_B - (t)_A\}}{w_A + w_B} \quad (16)$$

gdje B predstavlja duže zadržanu komponentu. Veći R_s predstavlja uspješnije odjeljivanje komponenata, a za kvantitativnu analizu je potrebno da bude veći od 1,5 [62].

Primjeri raspodjele komponenti prilikom analize uzorka prikazani su na **Slici 10**. Prolazak uzorka kroz kolonu može dovesti do širenja vrpce, te utjecati na učinkovitost odjeljivanja.



Slika 10. Raspodjele komponenti A i B pri analizi uzorka [64]

Prema klasičnoj teoriji, kolona se može podijeliti na određeni broj odsječaka koji imaju visinu H [65, 66].

Za odjeljivanje sastojaka uzorka potrebno je imati dovoljno odsječaka u kojima se uspostavlja ravnoteža razdiobe analita između nepokretne i pokretne faze. Manja H vrijednost, odnosno veći broj odsječaka ukazuju na bolje odjeljivanje sastojaka, kromatografski pikovi su oštriji s užom širinom osnovice, te se dobiva bolja separacija. Na broj teorijskih odsječaka može se utjecati promjenom protoka pokretne faze, duljine kolone te vrste i veličine čestica nepokretne faze.

Uz optimalnu brzinu pokretne faze, povećanjem duljine kromatografske kolone i smanjivanjem promjera čestica nepokretne faze, smanjit će se visina odsječka u koloni te postići bolje razlučivanje.

Za optimizaciju učinkovitosti razdvajanja potreban je maksimalan broj teorijskih odsječaka, što ujedno zahtjeva smanjenje njihove visine. Visina odsječka povezana je s brzinom protoka pokretne faze, a time i za fiksni skup pokretne faza, nepokretne faze i analit.

Kao posljedica brzine raspodjele analita između pokretne i nepokretne faze dolazi do širenja pikova uzduž kolone. Ovaj efekt nazivamo kinetičkim efektom i izravno je proporcionalan brzini protoka pokretne faze. Manja H vrijednost se kod tekućinske kromatografije postiže pri nižim brzinama protoka.

Odnos visine teorijskog odsječka (H) prema različitim kinetičkim parametrima koji utječu na kromatografski proces opisan je Van Deemeter-ovom jednačbom:

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (17)$$

gdje je:

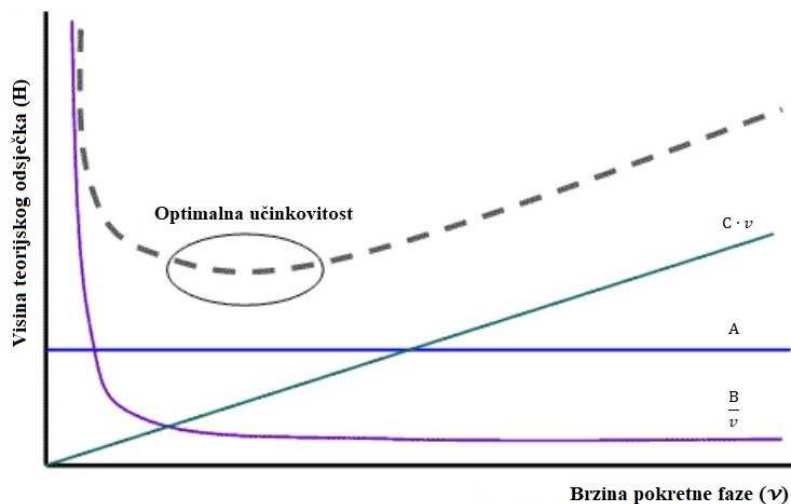
v – linearna brzina pokretne faze;

A – konstanta vrtložne difuzije, mjera Eddyve difuzije;

B – konstanta longitudinalne difuzije;

C – konstanta prijenosa mase između pokretne i nepokretne faze, opisuje brzinu adsorpcije i desorpcije analita u nepokretnoj fazi.

Na **Slici 11** dan je grafički prikaz odnosa brzine pokretne faze (v) i optimalne učinkovitosti.

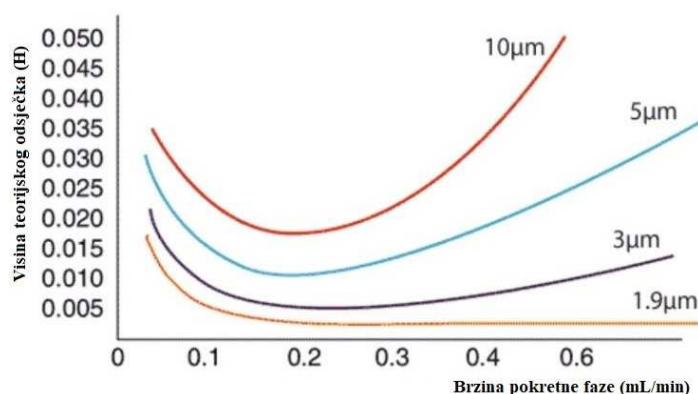


Slika 11. Van Deemterova krivulja. Prikaz odnosa brzine pokretne faze (v) i optimalne učinkovitosti [67]

Uz deblji film i manji koeficijent difuzije, prijenos mase bit će sporiji. Ako je nepokretna faza čvrsta, konstanta prijenosa mase (C) ovisi o brzini procesa adsorpcije i desorpcije.

Kako difuzijski koeficijenti variraju s veličinom molekula, širenje pika ovisi i o relativnoj molekularnoj masi (uz male M_r bolja je učinkovitost odjeljivanja na koloni).

Iz kinetičke teorije vidljivo je da H izravno ovisi o veličini čestica nepokretne faze kroz konstantu prijenosa mase, C . Van Deemterove krivulje na **Slici 12** pokazuju da uz manju veličinu čestica nepokretne faze dolazi do smanjenja visine teorijskih odsječaka i povećanja učinkovitosti odjeljivanja kolone.



Slika 12. Utjecaj veličine čestica na visinu teorijskog odsječka, H [67]

2.6.1.2. Tekućinska kromatografija

2.6.1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je učinkovita separacijska tehnika kojom se mogu analizirati nehlapljive i termički nestabilne tvari, anorganski ioni kao onečišćenja, makromolekule i nestabilni prirodni produkti. Ova separacijska tehnika ima niz prednosti između kojih se ističe brzina, visoka moć razlučivanja, visoka osjetljivost, točnost i automatiziranost, zbog čega je postala nezaobilaznom analitičkom tehnikom [68, 69].

Odabir detektora ovisi o prirodi uzorka, a najčešće korišteni detektori u kromatografskoj analizi su detektor s nizom fotoosjetljivih dioda (DAD), fluorescencijski detektor (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektor (engl. *electrochemical detector*, ED), detektor indeksa loma (engl. *refractive index detector*, RID) te detektor raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *evaporative light-scattering detector*, ELSD) [58].

2.6.1.2.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Kromatografske tehnike postale su neizostavne u gotovo svakoj znanstvenoj disciplini koja razmatra analizu nekog uzorka. S napretkom instrumentacije sve više rastu zahtjevi za analizom uzorka koji sadrže sve veći broj analita i sve kompleksnije matrice, a samim time raste i potreba za sve bržim, učinkovitijim i selektivnijim metodama. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti je nova moderna analitička tehnika temeljena na napretku u instrumentaciji i zahtjevima za postizanjem sve nižih granica detekcije ali i sve kraćeg vremena analize velikog broja analita. Stoga je razvoj analitičkih kolona krenuo u smjeru manjih čestica nepokretne faze [70].

Ujedno Van Deemterova jednadžba pokazuje da upotrebom čestica manjeg promjera raste učinkovitost kromatografske separacije. Stoga je primjena analitičkih kolona sa sub-mikronskim česticama promjera manjeg od 2 μm postala uobičajena što je rezultiralo boljim razlučivanjem, boljom osjetljivošću te razvojem vremenski kraćih metoda i posljedično smanjenjem potrošnje otapala. Istovremeno, kao posljedica navedenog, dolazi do rasta tlaka što ograničava upotrebu HPLC uređaja čiji je najveći operativni tlak 400 bara.

Sve navedeno je potaknulo razvoj novih instrumenta, te kompanija Waters 2004. godine na tržište stavlja novi instrument s radnim tlakom do 1000 bara pod nazivom UPLC (engl. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC) čime primjena visokotlačne tekućinske kromatografije postaje tržišno dostupna [71], a drugi proizvođači su za svoje instrumente primorani koristiti nezaštićeni termin tekućinske kromatografije ultra visokih tlakova (engl. *ultra-high pressure liquid chromatography*, UHPLC). Najveći operativni tlak tržišno dostupnih UHPLC instrumenata kreće se u vrijednostima od 600 do 1400 bara, čime se omogućava bolje kromatografsko razlučivanje u kratkom vremenu [72]. Sam UHPLC instrument je varijanta HPLC instrumenta, ali uz korištenje drugačijih dimenzija kolona (veličina čestica 2,1 μm , kraće dimenzije i uži promjer kolone) te preinake u dizajnu modula instrumenta. Zbog sve užih i ušiljenijih kromatografskih pikova, brzina prikupljanja podataka mora biti sve brža, stoga se ujedno radi i na razvoju novih i prikladnijih detektora [72].

Danas je na tržištu dostupan velik broj UHPLC kolona punjenih različitim vrstama nepokretne faze koje se razlikuju s obzirom na način proizvodnje i veličinu čestica, najviši dozvoljeni tlak, otpornost na pokretne faze ekstremnih pH-vrijednosti i dozvoljeni temperaturni raspon. Novo razvijene nano-, mikro- i kapilarne kolone omogućuju analizu uz korištenje manje količine uzorka i otapala, ali ujedno zahtijevaju prikladnu instrumentaciju.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana s različitim detektorima (poput DAD-a, MS-a i dr.) najbolji su izbor za analizu razgradnih produkata, određivanje farmakokinetike [73, 74] i određivanje metabolita [75, 76].

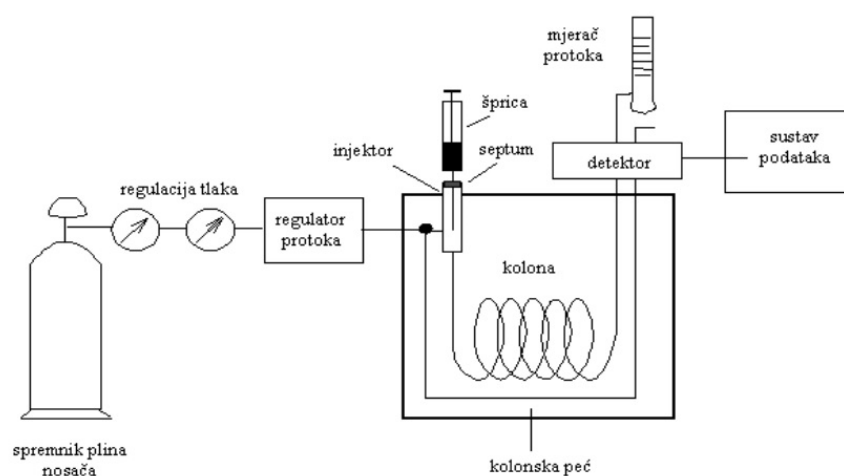
2.6.1.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je jednostavna i vrlo osjetljiva tehnika za razdvajanje analita vrlo niskih koncentracija [77]. U plinskoj kromatografiji odvajanje spojeva uglavnom ovisi o dva čimbenika: polarnosti i točki vrelišta spoja. Što je niža točka vrelišta, veća je tendencija da se spoj nalazi u plinovitoj fazi, pa tako brže putuje u plinovitom obliku kroz kolonu. Spojevi sličnih vrelišta eluiraju s obzirom na njihovu polarnost, pri čemu se prvo eluiraju spojevi koji imaju slabiju interakciju s nepokretnom fazom. Spojevi slične polarnosti eluiraju s povećanjem vrelišta, pri čemu spojevi nižih vrelišta imaju kraće vrijeme zadržavanja [78].

Tehnika se može primijeniti na većinu otapala i pesticida, brojne aromatske spojeve, eterična ulja, ugljikovodična goriva i mnoge lijekove. Kiseline, aminokiseline, amini, amidi, nehlapljivi lijekovi, saharidi i steroidi spadaju u složenije spojeve koji zahtijevaju derivatizaciju kako bi im se povećala hlapljivost. Osnovno načelo rada plinske kromatografije uključuje isparavanje uzorka u zagrijanom dijelu za injektiranje, nakon čega slijedi razdvajanje komponenata smjese na koloni [79]. Plinski kromatograf (**Slika 13**) sastoji se od nekoliko komponenata, a uloga svake komponente ključna je za postizanje dobrog razdvajanja i analize. Pokretnu fazu plinske kromatografije čini plin nosilac, obično vodik, dušik ili helij, koji prenosi uzorak od injektora, kroz kolonu, do detektora.

Nepokretna faza može biti u tekućem ili čvrstom agregatnom stanju, a uzorak u tekućem ili plinovitom te se injektira kroz gumenu pregradu.

Ako se radi o uzorku u tekućem stanju, on se u grijanom dijelu za injektiranje prevodi u plinovito agregatno stanje, a zatim, s pokretnom fazom, prolazi kroz kolonu zadanom brzinom protoka, pri čemu se komponente razdvajaju, do detektora koji je spojen na računalo na kojem se prikazuje kromatogram [80].



Slika 13. Shematski prikaz plinskog kromatografa [81]

2.6.2. Spektrometrija

Metode atomske spektrometrije su skupina tehnika koje se temelje na mjerenju procesa apsorpcije, emisije ili fluorescencije zračenja slobodnih atoma uzorka, te predstavljaju važan alat u elementnoj analizi uzoraka različitog porijekla. Primjena induktivno spregnute plazme vezane sa spektrometrijom masa (engl. *inductively coupled plasma – mass spectrometry*, ICP-MS) i one s atomskom emisijskom spektrometrijom (engl. *inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry*, ICP-AES), češće zvanom optičkom emisijskom spektrometrijom (engl. *inductively coupled plasma – optical emission spectrometry*, ICP-OES) ubrzano se povećava otkako su na snagu stupili određeni, postroženi zahtjevi, zakoni i regulative za sadržaje elementnih onečišćenja u lijekovima i ljekovitim djelatnim tvarima.

2.6.2.1. Induktivno spregnuta plazma

Induktivno spregnuta plazma vezana sa spektrometrijom masa (ICP-MS) predstavlja suvremenu tehniku koja se koristi za identifikaciju, detekciju i kvantifikaciju tragova anorganskih nečistoća u lijekovima i ljekovitim djelatnim tvarima. Kao ionizacijski izvor koristi se induktivno spregnuta plazma, a detekcija se odvija spektrometrijom masa. ICP-MS koristi se od 1983. godine u različitim područjima znanosti za analizu elemenata u tragovima [82].

Plazma je ionizirani plin koji je makroskopski neutralan, jer sadrži jednak broj pozitivnih i negativnih čestica (iona i elektrona) [83]. Pošto se za stvaranje plazme koristi monoatomski plin (X), plazma se matematički opisuje jednačbom (18) gdje je X^{z+} ion pozitivnog naboja z , q broj iona u plazmi, a e^- elektron.

$$X = \sum_{z=1}^q X^{z+} + \sum_{z=1}^q ze^- \quad (18)$$

Argon se najčešće koristi za stvaranje induktivno spregnute plazme, jer je monoatomski element, koji ima visoku energiju ionizacije (15,76 eV), kemijski je inertan, te slabo provodi toplinu.

Radiofrekvencijski generator proizvodi visokofrekvencijsko električno polje u kojem ubrzavaju elektroni, koji ioniziraju plin plazme i stvaraju sekundarne elektrone [83]:



Zatim se nastali ioni argona rekombiniraju s elektronima i nastaju pobuđeni atomi argona (Ar^*) uz emisiju zračenja ($h\nu$):



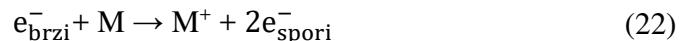
U procesu radijativne rekombinacije iona i elektrona u plazmi, nastaje pozadinsko zračenje $h\nu$, koje može značajno utjecati na analitički signal u dalekom UV dijelu spektra. Plazma veliku količinu energije prenosi na atome i ione analita (M) koji podliježu procesima pobude. Ionizacijski procesi u izvoru plazme su vrlo brzi i traju manje od milisekunde.

Glavni procesi ionizacije u plazmi su [83]:

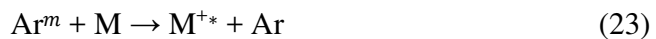
- ionizacija prijenosom naboja s iona argona na analit M:



- ionizacija sudarom ubrzanih elektrona i atoma analita M:



- ionizacija atoma analita M u sudaru s metastabilnom formom argona, Ar^m (*penning* ionizacija):



- ion-elektron radijativna rekombinacija analita M i elektrona uz oslobađanje zračenja ($h\nu$),



Glavne prednosti ove metode su niske granice detekcije, identifikacija i kvantifikacija, velika brzina analize uz mali utjecaj interferencija, visoka točnost i preciznost te mogućnost određivanja više elemenata istovremeno, u jednoj analizi [83].

2.6.3. Spektrometrija masa

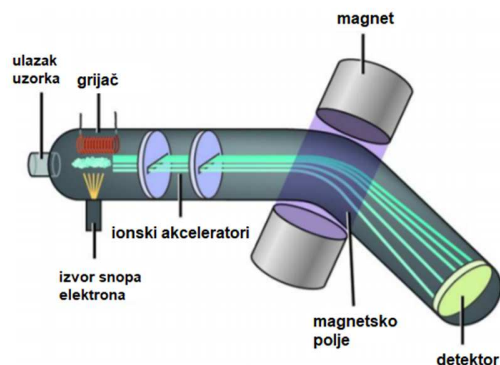
Spektrometrija masa (MS) je široko prihvaćena i nužna instrumentalna tehnika analize organskih molekula kojom se može odrediti elementarni sastav spoja. Osnovni princip ove destruktivne (ireverzibilna) tehnike je ionizacija organskih ili anorganskih spojeva pomoću ionskog izvora, razdjeljivanje prema omjeru mase i naboja (m/z) prolaskom kroz analizator masa i detekcija s obzirom na vrijednost m/z i zastupljenosti u uzorku [84].

Spektrometrija masa se najčešće spreže s tehnikama plinske i tekućinske kromatografije u vezane sustave GC-MS odnosno LC-MS, što omogućava identifikaciju pojedinačnih sastojaka složenih smjesa. Spektrometar masa sastoji se od triju glavnih dijelova: ionizatora, analizatora masa i detektora. Uzorak se u obliku vodene otopine ili otopine u organskom otapalu injektira u uređaj. Na kraju sonde za injektiranje nalazi se grijač koji generiranjem topline dovodi do isparavanja uzorka.

Uzorak se zatim uvodi u ionizacijsku komoru unutar koje dolazi do ionizacije i eventualne fragmentacije analita nekom od metoda ionizacije. Prilikom ulaska u ionski izvor molekula se može ionizirati brzim elektronima pri čemu nastaje molekulski ion:



Molekulski ion podliježe fragmentaciji te nastaju ioni produkti. Fragmentacijom može nastati ion produkt s parnim brojem elektrona i radikal ili ion s neparnim brojem elektrona i neutralna molekula. Nastali se ioni ubrzavaju između pločica za ubrzanje te se takvi uvode u analizator masa. Dobiveni ioni razdvajaju se u analizatoru masa na temelju omjera mase i naboja (m/z) te detektiraju [85]. Analiza spektrometrijom masa rezultira spektrom masa analita koji pokazuje relativnu zastupljenost raznih ionskih vrsta kao funkciju omjera mase i naboja iona. Broj iona, fragmentacija te konačni izgled spektra mase ovise o tehnici ionizacije, a spektrometri masa (**Slika 14**) se međusobno razlikuju ovisno o tipu analizatora, te u skladu s tim i principom rada.



Slika 14. Shematski prikaz spektrometra masa

2.6.3.1. Tehnike ionizacije

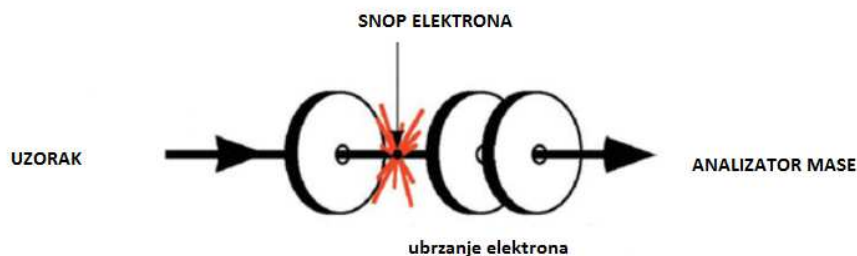
Odabir tehnike ionizacije ovisi o vrsti analiziranog uzorka i podacima koje je potrebno dobiti. Ionizacija analita može se provesti na više načina, a temelji se na predaji energije molekuli analita pri čemu, ovisno o broju skupina pogodnih za ionizaciju, nastaju jednostruko ili višestruko nabijeni ioni analita. Ako je potrebno dobiti blagu ionizaciju tada se ionizacija temelji na predaji manje količine energije molekuli analita i govori se o blagim ionizacijskim tehnikama (engl. *soft ionization*), a ako se predaje velika količina energije i potrebno je dobiti djelomičnu ili potpunu ionizaciju, riječ je o snažnim ionizacijskim tehnikama (engl. *hard ionization*).

Razlikujemo sljedeće najčešće korištene tehnike ionizacije molekule analita:

- 1) *Ionizacija djelovanjem snopa elektrona* (engl. *electron impact ionization*, EI) (**Slika 15**) provodi se tako da se plinoviti uzorak izlaže elektronima energije 70 eV. Ionski izvor za ionizaciju elektronima sastoji se od grijane katode od volframa ili renija koja emitira elektrone. Energija elektrona u interakciji s molekulom analita veća je od energije sadržane u njenim kemijskim vezama, stoga dolazi do ionizacije [85, 86]. Nastaje visokoreaktivni molekulski ion M^+ unutar kojeg može doći do pucanja kemijskih veza, odnosno fragmentacije.

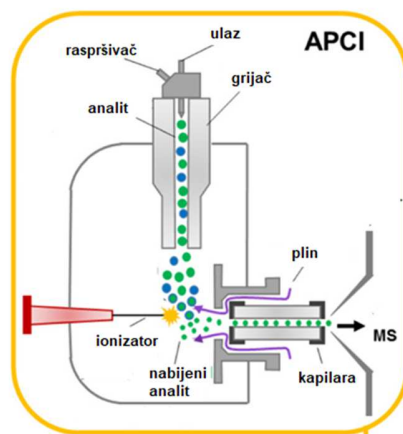
Dobiveni spektar masa karakterističan je za ispitivanu tvar, a zbog značajne fragmentacije pik molekulskog iona slabo je izražen. Ova ionizacijska tehnika nije prikladna za termolabilne i nehlapljive analite i koristi se za analizu molekula koje daju stabilne molekulске ione.

Navedena tehnika omogućuje potvrdu identiteta ispitivanog analita usporedbom dobivenog spektra masa s referentnim spektrom ili određivanje nepoznate strukture analita na temelju karakterističnih fragmenata [85].



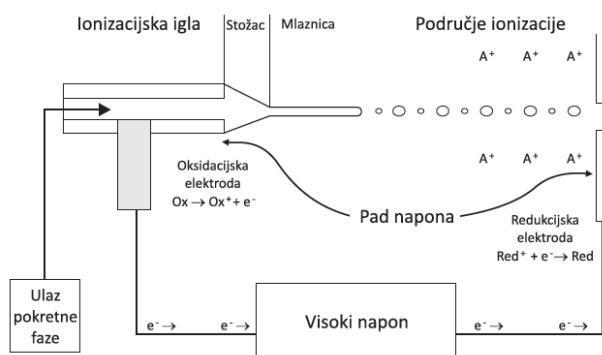
Slika 15. Proces ionizacije elektronima [87]

- 2) *Kemijska ionizacija* (engl. *chemical ionization*, CI) je tehnika u kojoj se kod izvora ionizacije nalazi reakcijska komora u kojoj se plin reagens (najčešće amonijak) ionizira zrakom elektrona. Sudarima nastaju stabilne protonizirane čestice plina kojima se uvodi uzorak i tada dolazi do reakcije, najčešće 10 prijenosa protona. Time se dobivaju stabilni ioni molekula uzorka. Tehnika se također može spregnuti s plinskom kromatografijom [86].
- 3) *Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku* (engl. *atmospheric pressure chemical ionisation*, APCI) (**Slika 16**) je tehnika kemijske ionizacije prikladna za tekuće uzorke iz HPLC kolone. Predstavlja često upotrebljavanu tehniku u spregnutim sustavima tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Ionizacija uzorka događa se posredno preko inertnog plina (vodik, dušik, amonijak, itd.). Dolazi do ionizacije molekula inertnog plina, a nastali ioni potiču kemijsku ionizaciju molekula analita pri čemu najčešće dolazi do prijenosa protona s inertnog plina na analit – $[M+H]^+$. Fragmentiranje analita znatno je manje, stoga je pik molekulskog iona jasno vidljiv u spektru. Uzorak u otapalu se raspršuje te tvori maglicu uzorka koja je u struji dušika. Tehnika je prikladna za termolabilne i hlapljive analite.



Slika 16. Proces kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku [88]

- 4) *Ionizacija elektroraspršenjem* (engl. *electrospray ionization*, ESI) (**Slika 17**) je jedna od najčešće korištenih tehnika ionizacije u spregnutom sustavu tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Ovisno o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi, ionizacija može biti pozitivna ili negativna. Proces ionizacije elektroraspršenjem uključuje raspršenje tekuće faze uz nastajanje nabijenih kapljica i desolvataciju iona analita pri atmosferskom tlaku te njihov odlazak u plinsku fazu. Kapljice pokretne faze se smanjuju, a površinski naboj koji potječe od istovrsno nabijenih iona analita raste. Otopalo iz nabijenih kapljica isparava upotrebom plina za sušenje (dušika). U nekom trenutku odbojne sile između iona prevladaju sile napetosti površine, kapljica se dodatno rasprsnje te nastaju pojedinačni ioni u plinovitom stanju koji se uvode u analizator masa kroz vakuumirani prostor i sustav leća [89].



Slika 17. Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem [89]

5) *Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom* (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI) tehnika je najčešće korištena za analizu visokomolekularnih spojeva poput proteina [90]. Sama tehnika temelji se na desorpciji analita prethodno ugrađenog u kristalnu strukturu molekula matrice koja služi kao nosač iona koji se generiraju iz polarnih ili nabijenih molekula uzorka. Na takvu se matricu zatim djeluje laserskom zrakom (najčešće valne duljine u UV području) pri čemu molekule apsorbiraju energiju zračenja oslobađaju u obliku topline. Zagrijavanjem dolazi do isparavanja i ionizacije molekula matrice i analita, a nastali ioni su protonirane molekule uz slabo izraženu fragmentaciju. Prednost ovakve ionizacije relativna je neosjetljivost na onečišćenja u uzorcima poput soli, pufera i deterdženata ali je ograničena samo na analizator vremena leta (engl. *time of flight*, TOF), što predstavlja nedostatak.

Dvije najčešće korištene ionizacijske tehnike su ESI i MALDI. Ove „blage“ tehnike ne narušavaju strukturni integritet molekula analita tijekom ionizacijskog procesa i dovođenja u plinsku fazu.

2.6.3.2. Analizatori masa u vezanim sustavima

Analizator je dio spektrometra masa koji ima svrhu razdvajanja iona različitog omjera mase i naboja (m/z). Izbor analizatora mase ovisi o njihovim svojstvima. Najznačajniji parametri koji određuju svojstva pojedinog analizatora su: osjetljivost, gornja granica vrijednosti omjera m/z , razlučivanje i točnost mjerenja. Osjetljivost analizatora mase definirana je kao najmanji omjer mase i naboja koji se još može detektirati. Radno područje analizatora mase određeno je osjetljivošću i gornjom granicom vrijednosti m/z . Razlučivanje je omjer srednje mase i najmanje razlike u masama dvaju iona čiji se signali još mogu razlučiti.

Točnost mjerenja određena je slaganjem izmjerene i prave vrijednosti m/z . Osnovne veličine koje se primjenjuju u spektrometriji masa prikazane su u **Tablici 9**, a podjela analizatora prema vrstama i načinu razdvajanja iona prikazana je u **Tablici 10**.

Tablica 9: Osnovne veličine u spektrometriji masa [91]

Velicina	Izraz	Definicija
Razlučivanje	$R = m / \Delta m$	Mjera djelotvornosti odvajanja iona približno istih masa
Točnost mjerenja masa	$\text{ppm} = 10^6 \Delta m_t / m_{mj}$	Sposobnost određivanja molekulske mase čim bliže točnoj masi
Područje mjerenja masa	$\Delta m_{\text{područja}} = m_{gg} - m_{dg}$	Raspon između gornje i donje granice m/z
Osjetljivost	$S_{m/z} = A_{\text{masa-struja}} / (G m_{uz})$	Mjera odziva detektora koja se dobije analizom određene količine analita
Granica detekcije	$V_{mj} > (V_{ol} + 3\sigma_{ol})$	Najmanja moguća količina uzorka koju je moguće kvalitativno odrediti
Brzina snimanja spektara	$\Phi_{\text{snimanja}} = (d_m/d_t)$	Mjera brzine snimanja zadanog raspona masa
M	prosječna molekulska masa na vrhu pika mase	
Δm	raspon masa na polovici visine pika mase	
Δm_t	razlika između izračunate i izmjerene molekulske mase	
m_{mj}	izmjerena molekulska masa	
m_{gg}	najveća moguća izmjerena masa (gg – gornja granica)	
m_{dg}	najmanja moguća izmjerena masa (dg – donja granica)	
$A_{\text{masa-struja}} [C]$	površina ispod pika masa mjerena u vremenu	
G	visina odziva detektora iona	
$m_{uz} [\mu g]$	masa analiziranog uzorka	
V_{mj}	izmjereni napon signala za određeni analit	
V_{ol}	uprosječeni napon u zadanom vremenu	
σ_{ol}	standardno odstupanje napona osnovne linije u zadanom vremenu	
d_m	zadano područje masa	
d_t	vrijeme potrebno za snimanje zadanog područja masa	

Tablica 10: Podjela analizatora prema vrstama i načinu razdvajanja iona

Analizator masa	Način razdvajanja iona
Kvadripolni analizator masa	Električno polje i propusni filter
Kvadripolni analizator masa s ionskom stupicom	Napon i RF polje
Analizator vremena leta	Vrijeme leta
Analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama	Frekvencija

Svi spektrometri masa mjere omjer mase i naboja iona (m/z), a preciznost ovog mjerenja ovisi o vrsti spektrometra masa koji se koristi. Spektrometri masa niske razlučivosti općenito mjere m/z

vrijednost na najbliži cijeli broj ili nominalnu masu, dok spektrometri masa visoke razlučivosti daju informacije i o znamenkama iza decimalne točke i mogu mjeriti točnu masu. Za razlikovanje spektrometra masa visoke i niske razlučivosti koriste se dva pojma: točnost mjerenja mase i razlučivanja. Analizatori masa koji pružaju visoku razlučivost su analizator vremena leta ($R \approx 10^3$ – 10^4) i analizator masa s Fourierovim transformacijama ($R \approx 10^5$ – 10^6).

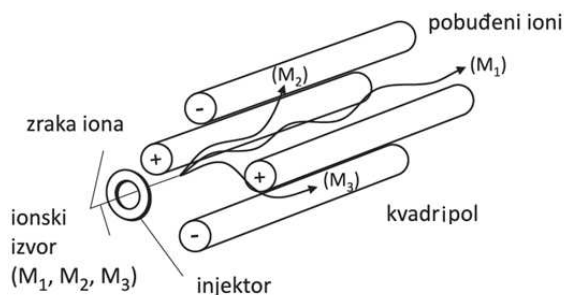
Spektrometre masa možemo podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom kod kojih je teorijski moguća analiza do MS^n (Fourier transformirana spektrometrija masa, FTMS ili ionska stupica, IT), spektrometri masa s više analizatora (trostruki kvadripol, engl. *triple quadrupole*, QqQ) kod kojih je analiza moguća do MS^2 , te spektrometri masa s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija (tzv. hibridni spektrometri masa, npr. QTOF; engl. *quadrupole - time of flight*), kod kojih je moguća analiza do MS. Ovi analizatori ujedno predstavljaju i najčešće korištene analizatore u spektrometriji masa.

Stupica za ione (engl. *ion trap*, IT) [72, 92] vrlo je često korišten analikator u spektrometriji masa. Analikator je sastavljen od dviju kružnih i dviju polukružnih elektroda koje okružuju prostor za zadržavanje iona. Ioni se tangencijalno uvode u trodimenzionalno električno polje gdje se zadržavaju u prostoru između dviju elektroda. U tom prostoru ioni osciliraju sve dok se zbog promjene napona iz stupice ne izbace, a potom dolaze do detektora. Tu se otvara mogućnost zadržavanja određenog molekuskog iona, a ostali se uklanjaju.

Glavna je prednost analizatora stupice za ione mogućnost daljnjih fragmentacija, tj. odabrani se ion može dalje fragmentirati, a nakon toga moguće je među njegovim fragmentnim ionima ponovno izolirati jedan i fragmentirati ga dalje. Na ovaj način moguće je provoditi MS^n analize, odnosno dobiti više strukturnih informacija iz samo jedne analize.

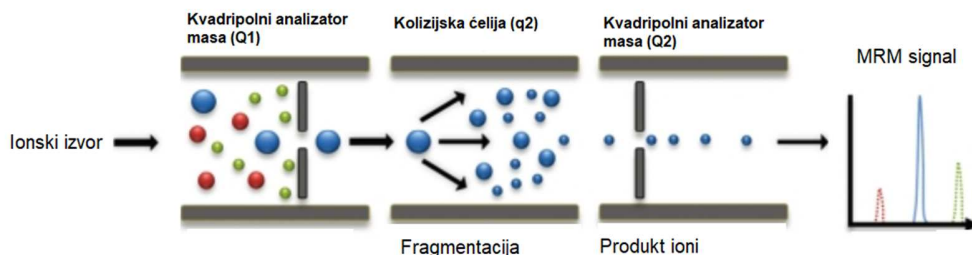
Kvadripolni analizator masa (engl. *quadrupole mass analyzer*, Q) [90] (**Slika 18**) primjenjuje dva elektrostatska polja (pozitivnog i negativnog polariteta) međusobno postavljena pod pravim kutom. Jedno elektrostatsko polje oscilira što rezultira stvaranjem rezonantne frekvencije za svaku m/z vrijednost. Detektiraju se samo ioni koji rezoniraju na frekvenciji kvadripolnog analizatora jer im je putanja stabilna, dok se ostali sudaraju sa stijenkom analizatora.

Ovim se analizatorom može selektirati ion točno određenog omjera m/z ili se, mijenjajući napon elektrostatskog polja, varira frekvencija kvadripola te, posljedično, detektiraju ioni šireg raspona omjera m/z .



Slika 18. Kvadripolni analizator masa [91]

Uz pojedine analizatore, moguće je koristiti i njihove kombinacije. Tada govorimo o spregnutoj spektrometriji masa (MS/MS). Pri tome spregnuti uređaji zahtijevaju odvojene analizatore masa za svaki stupanj MS/MS analize pomoću koje je moguće pregledavati pojedinačne ione u skupini iona. Ta vrsta analize daje informacije o ionskim fragmentima koji su potekli iz složenije molekulske strukture. U spregnutoj spektrometriji masa prvi analizator masa izdvaja ione od interesa koji se zatim fragmentiraju i daju manje ionske produkte koje analizira drugi analizator. Spregnutu spektrometriju masa moguće je ostvariti korištenjem različitih kombinacija analizatora, poput trostrukog kvadripola (QqQ). Trostruki kvadripola najčešće se koristi za kvantitativne analize jer osigurava veću selektivnost u odnosu na jednostruki kvadripola. Osnovni princip rada sastoji se od procesa ionizacije spoja u prostoru prvog kvadripola (Q1), u drugom kvadripolu (kolizijskoj ćeliji, q2) molekula se fragmentira, a u prostoru trećeg kvadripola (Q3) prate se odabrani fragmentni ioni (**Slika 19**). Na taj način na kromatogramu se detektira jedna molekula s molekulskim ionom i odabranim fragmentnim ionom. Ova specifična i osjetljiva MRM tehnika (engl. *multiple reaction monitoring*) omogućava selektivno kvantificiranje spojeva unutar složenih smjesa.



Slika 19. Trostruki kvadrupolni analizator masa [93]

Analizator vremena leta (engl. *time of flight*, TOF) [91, 94] ione odjeljuje na temelju vremena potrebnom ionu da prijeđe put između izvora i detektora. Potencijalna energija nabijene čestice u električnom polju ovisna je o naboju čestice i jakosti električnog polja, te se može prikazati jednadžbom (26).

$$E_p = zV \quad (26)$$

E_p predstavlja potencijalnu energiju, z naboj čestice, a V razliku električnih potencijala.

Kada se nabijena čestica ubrza djelovanjem električnog potencijala V , njena potencijalna energija pretvara se u električnu energiju, pa ioni mase m i naboja z imaju vrijednost potencijalne energije prema izrazu (25). A pretvorba potencijalne energije u kinetičku rezultira izjednačavanjem njihove vrijednosti ($E_p = E_k$) i može se prikazati jednadžbom (27).

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = zV \quad (27)$$

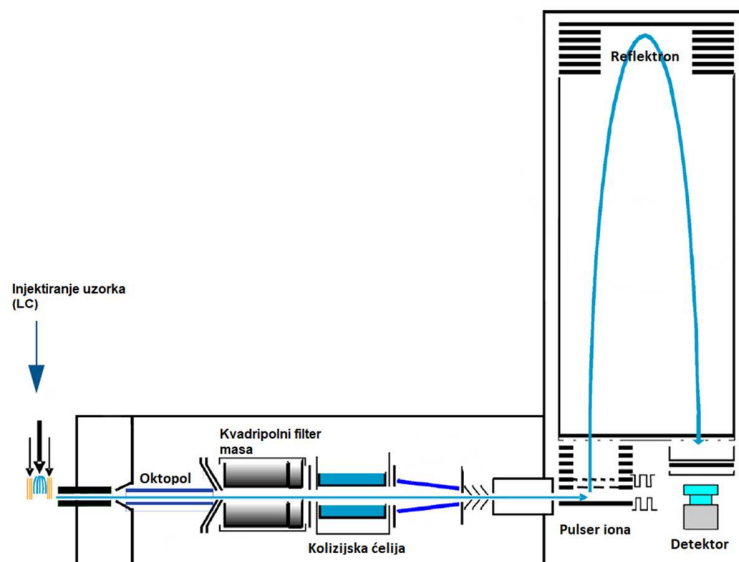
Vrijeme, t , potrebno za prolazak udaljenosti l od izvora do detektora jednako je omjeru udaljenosti i brzine kretanja iona, v (28, 29).

$$t = \frac{l}{v} \quad (28)$$

$$t = \sqrt{\frac{ml^2}{z2Ve}} \quad (29)$$

Iz jednadžbe (29) vidimo da je vrijeme leta direktno proporcionalno korijenu omjera m/z , uzevši u obzir da su udaljenost od izvora do detektora te napon konstantni za određeni instrument, a e označava naboj elektrona. S obzirom da su napon i duljina cijevi konstantni, m/z ovisi jedino o vremenu leta iona. Distribucija kinetičke energije među ionima istog omjera m/z nije uvijek jednaka pa će ioni istog omjera m/z imati različito vrijeme dolaska do detektora. Da bi se ta pogreška umanjila razvijeni su uređaji s ionskim zrcalom odnosno reflektorom.

Reflektor se sastoji od niza prstenastih elektroda na koje se primjenjuje električni napon i tako se stvara električno polje koje ione zakreće i usmjerava prema detektoru. Ioni s većom kinetičkom energijom ući će dublje u ionsko zrcalo te će na detektor stići u isto vrijeme kao ioni istog omjera m/z ali manje kinetičke energije. Kako bi se izmjerilo vrijeme leta iona, TOF se najčešće kombinira s pulsnom tehnikom ionizacije koje imaju ulogu sakupljanja i guranja iona u analizator u kratkim pulsevima, jer sam princip odjeljivanja zahtjeva da se svi ioni kreću u isto vrijeme. Analizatore masa možemo kombinirati kako bi se iskoristile njihove prednosti i umanjili potencijalni nedostaci poput niskog razlučivanja, male brzine i točnosti. Takvi hibridni uređaji mogu imati kombinaciju istih analizatora poput već opisanog trostrukog kvadripola ili na primjer linearnog TOF-a s TOF-reflektorom, a mogu biti i kombinacija različitih analizatora masa. Spregnuti sustav koji se sastoji od kvadripolnog filtera masa, heksapolne kolizijske ćelije te analizatora masa koji mjeri vrijeme leta skraćeno nazivamo QTOF-om. Shema QTOF spektrometra masa prikazana je na **Slici 20**.



Slika 20. Shema QTOF spregnutog spektrometra masa (Agilent 6540) [95]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i standardi

Popis kemikalija korištenih u eksperimentalnom radu, njihova čistoća i proizvođač, prikazan je u **Tablici 11.**

Tablica 11: Popis kemikalija

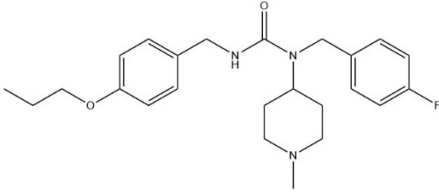
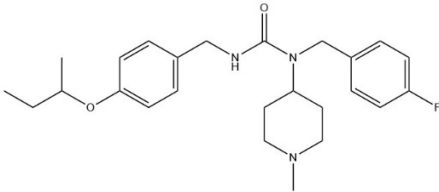
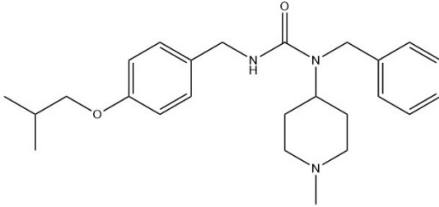
Naziv	Molekulska formula	CAS broj	Čistoća	Proizvođač
Acetonitril	CH ₃ CN	75-05-8	p.a.	J. T. Baker®, Avantor Performance Materials LLC, Radnor, PA, SAD
Tetrahidrofur	C ₄ H ₈ O	109-99-9	p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
Amonijev formijat	NH ₄ COOH	540-69-2	p.a. ≥99,0 %	Honeywell Fluka™, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Njemačka
Mravlja kiselina	HCOOH	64-18-6	p.a. ≥97,5 %	Honeywell Fluka™, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Njemačka

Tablica 11: Popis kemikalija (nastavak)

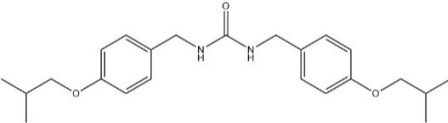
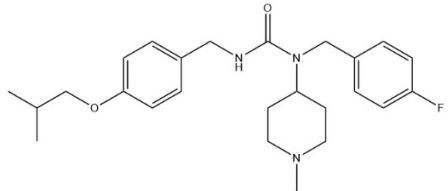
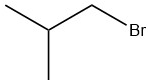
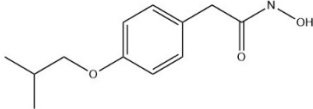
Naziv	Molekulska formula	CAS broj	Čistoća	Proizvođač
Klorovodična kiselina	HCl	7647-01-0	p.a.	J. T. Baker [®] , Avantor Performance Materials LLC, Radnor, PA, SAD
Natrijev hidroksid	NaOH	1310-73-2	p.a.	Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
Vodikov peroksid	H ₂ O ₂	7722-84-1	p.a. 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka
Dušična kiselina	HNO ₃	7697-37-2	69,0 – 70,0 % čistoće za analizu tragova metala	J. T. Baker [®] , Avantor Performance Materials LLC, Radnor, PA, SAD
Perklorna kiselina	HClO ₄	7601-90-3	69,0 – 72,0 % čistoće za analizu tragova metala	J.T. Baker [®] , Avantor Performance Materials LLC, Radnor, PA, SAD
Tiourea	CH ₄ N ₂ S	62-56-2	≥99,999 % čistoće za analizu tragova metala	Sigma-Aldrich, Merck Group, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka

Referentni standardi pimavanserin ljekovite djelatne tvari i srodnih onečišćenja sintetizirani su u Plivi (Pliva HRVATSKA d.o.o., Zagreb, Hrvatska), te su prikazani u **Tablici 12**.

Tablica 12: Popis korištenih standarada

Naziv standarda	Kemijska formula	Molekulska masa, <i>Mr</i>	Struktura	Čistoća
<p align="center">PMV Imp A</p> <p>1-[(4-fluorfenil)metil]-1-(1-metilpiperidin-4-il)-3-[(4-propoksifenil)metil]urea</p>	C ₂₄ H ₃₂ FN ₃ O ₂	413,54		97,5 %
<p align="center">PMV Imp B</p> <p>3-{[4-(butan-2-iloksi)fenil]metil}-1-[(4-fluorfenil)metil]-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea</p>	C ₂₅ H ₃₄ FN ₃ O ₂	427,56		98,7 %
<p align="center">PMV Imp C</p> <p>1-benzil-1-(1-metilpiperidin-4-il)-3-{[4-(2-metilpropoksi)fenil]metil}urea</p>	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₂	409,57		97,3 %

Tablica 12: Popis korištenih standarada (nastavak)

Naziv standarda	Kemijska formula	Molekulska masa, <i>Mr</i>	Struktura	Čistoća
<p align="center">PMV Imp D</p> <p align="center">1,3-bis({[4-(2-metilpropoksi)fenil]metil})urea</p>	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₃	384,52		98,8 %
<p align="center">Pimavanserin</p>	C ₂₅ H ₃₄ FN ₃ O ₂	427,56		99,1 %
<p align="center">IMP-1</p> <p align="center">izobutil-bromid</p>	C ₄ H ₉ Br	137,02		100 %
<p align="center">IMP-2</p> <p align="center"><i>N</i>-hidroksi-2-(4- izobutoksifenil)-acetamid</p>	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	223,27		100 %

Certificirani referentni standardi (engl. *certificate reference standards*, CRS) (**Tablica 13**) proizvođača Inorganic Ventures korišteni su tijekom razvoja i validacije ICP-MS metode za određivanje tragova elementnih onečišćenja u pimavanserin ljekovitoj djelatnoj tvari.

Tablica 13: Certificirani referentni standardi elementnih onečišćenja

Element	Oznaka proizvoda/LOT	Koncentracija (mg/L)
Litij	CGLI1/P2-LI675235	1003
Vandij	CGV1/N2-V665058	999
Krom	CGCR(3)10/K2-CR03122	10030
Kobalt	CGCO1/N2-CO666182	1000
Nikal	CGNI1/N2-NI665352	1000
Bakar	CGCU10/N2-CU672484	9997
Arsen	MSAS-10PPM/N2-AS665051	9,989
Selen	CGSE(4)1/M2-SE663138	999
Molyiden	CGMO10/N2-MO670050	10013
Rutenij	CGRU1/M2-RU661862	1000
Rodij	CGRH1/N2-RH673649	999
Paladij	CGPD1/P2-PD675461	1003
Silver	CGAG1/N2-AG666654	999
Kadmij	MSCD-10PPM/M2-CD657221	10,000
Kositar	CGSN10/N2-SN02090R	10039
Antimon	CGSB1/N2-SB665459	1002
Barij	CGBA10/K2-BA653976	10038
Osmij	CGOS1/N2-OS667462	1000
Iridij	CGIR1/N2-IR671389	999
Platina	CGPT1/N2-PT669552	1000
Zlato	CGAU1/N2-AU665518	1002
Živa	CGHG1/N2-HG669550	1002
Talij	MSTL-10PPM/N2-TL673671	10,001
Olovo	MSPB-10PPM/N2-PB672896	9,999
Skandij	CGSC1/M2-SC661609	999
Germanij	CGGE1/N2-GE666183	999
Disprozij	CGDY1/M2-DY663881	1000
Indij	CGIN1/M2-IN658619	1000

3.2. Instrumenti

Kako bi se opisala i karakterizirala onečišćenja pimavanserin ljekovite djelatne tvari, te razvile robusne metode za rutinske analize kontrole kvalitete proizvoda, tijekom istraživanja korišteni su sljedeći instrumenti:

- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan s detektorom s nizom dioda (UHPLC- DAD),
- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (UHPLC-QTOF),
- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan s detektorom s nizom dioda i spektrometrom masa s jednostrukim kvadripolom (UHPLC-DAD/SQD),
- plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa s jednostrukim kvadripolom (GC-MS),
- induktivno spregnuta plazma vezan sa spektrometrom masa s jednostrukim kvadripolom (ICP-MS),
- uređaj za mikrovalnu digestiju (Milestone Ultrawave SRC Microwave),
- uređaj za osvjtljivanje umjetnim Sunčevim zračenjem.

3.2.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom s nizom dioda (UHPLC-DAD)

Razvoj nove UHPLC metode AQbD pristupom proveden je na sustavu tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Sustav se sastoji od binarne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 20 μ l, odjeljka za kolonu te DAD detektora. Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Waters Empower 2 (Waters, Milford, SAD).

3.2.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (UHPLC-QTOF)

Identifikacija produkata razgradnje pimavanserin ljekovite djelatne tvari nakon provedenih studija prisilne razgradnje provedena je na sustavu tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti Agilent 1290 vezanog s Agilent 6550 spektrometrom masa koji mjeri vrijeme preleta, TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Sustav se sastoji od binarne pumpe, kvarterne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 20 μ l, odjeljka za kolonu, dva ventila za pohranu uzorka, dva detektora s nizom dioda (DAD) i spektrometra masa koji mjeri vrijeme

preleta. Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnih programa Agilent MassHunter Data Acquisition za Q-TOF B.06.01 (B6157) i OpenLab CDS ChemStation C.01.07 SR2.

3.2.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana s detektorom s nizom diode i spektrometrom masa (UHPLC-DAD/SQD)

Razvoj i validacija metode za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnog onečišćenja provedeni su na sustavu tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti Waters I Class (Milford, Massachusetts, SAD). Sustav se sastoji od binarne pumpe, otplinjača, sustava za automatsko uzorkovanje s volumenom do 20 µl, odjeljka za kolonu, DAD detektora, spektrometra masa s jednostrukim kvadripolom (engl. *single quadropole detector*, SQD) i ionizacijom elektroraspršenjem (ESI). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Waters Empower 2.

3.2.4. Plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa (GC-MS)

Razvoj i validacija metode za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnog onečišćenja provedeno je na sustavu plinske kromatografije Agilent 7890A s izvorom ionizacije pomoću elektronskog snopa (EI) opremljen automatskim injektorom i autosamplerom te vezan sa spektrometrom masa s jednostrukim kvadripolnim (Q) analizatorom Agilent 5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnih programa Agilent MassHunter Data Acquisition za GC-MS (B.07.06) i Agilent MassHunter Qualitative Analysis Navigator B.08.00.

3.2.5. Induktivno spregnuta plazma vezana sa spektrometrom masa (ICP-MS)

Razvoj i validacija metode za kvantifikaciju elementnih onečišćenja u pimavanserin ljekovitoj djelatnoj tvari provedeno je na sustavu induktivno spregnute plazme vezane sa spektrometrom masa s jednostrukim kvadripolnim analizatorom Agilent 7900 (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Sustav se sastoji od kvarcnog koncentričnog pneumatskog raspršivača s protokom uzorka \approx 0,2 mL/min, Scott-tip komore za odvajanje kapljica s dvostrukim prolazom, peristaltičkom pumpom s 10 valjaka i 3 odjeljaka za dovod uzorka i internog standarda te za odvod otpada iz komore za odjeljivanje kapljica. Plin nosilac je argon, a radiofrekventni generator radi na 27 MHz s impedancijom varijabilne frekvencije, radnim rasponom snage od 500 do 1600 W.

Korišteni analizator masa je hiperbolični kvadripolni spektrometar masa koji radi na visokoj frekvenciji (3 MHz) s ortogonalnim detektorom (engl. *orthogonal detector system*, ODS). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa ICP-MS Agilent MassHunter 4.1.

3.2.6. Uređaj za mikrovalnu digestiju

Priprema uzoraka za analizu elementnih onečišćenja provedena je mikrovalnom digestijom kiselinom za što je korišten instrument Ultrawave (Milestone Srl, Sorisole, Italija). Uređaj se temelji na tehnologiji „*jednoreaktorske komore*“ (engl. *single reactor chamber*, SRC). Navedeni reaktor izrađen je od debele ovojnice od nehrđajućeg čelika koja može održavati ekstremne unutarnje uvjete: temperatura do 300 °C i tlak do 200 bara. Ovi uvjeti omogućuju potpunu mikrovalnu digestiju uzorka u kratkom vremenu.

3.2.7. Uređaj za osvjetljavanje umjetnim Sunčevim zračenjem

Za ispitivanje fotolitičke osjetljivosti (u rasponu valnih duljina 300 – 800 nm) ljekovite djelatne tvari tijekom provedbe studija prisilne razgradnje korišten je Suntest XLS+ uređaj (Atlas, Linsengericht, Njemačka). Uređaj se sastoji od ksenonske lampe kao izvora zračenja, a parametri koji se mogu ugađati su temperatura, intenzitet zračenja i vrijeme izlaganja.

3.2.8. Analitički uređaji za pripremu otopina i uzoraka

Za pripremu otopina i uzoraka korišteni su sljedeći analitički uređaji:

- analitička vaga Balance XPE205 (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- mikro vaga Mettler Toledo MX 5 (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- pH-metar Seven Excellence S400 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ultrazvučna kupelj Sonorex digital 10P (Bandelin, Berlin, Njemačka)

3.2.9. Računalni programski paketi

U radu su korišteni sljedeći računalni programski paketi:

- Marvin Sketch 5.6.0.2. (ChemAxon, Budimpešta, Mađarska) – korišten za *in silico* određivanje pK_a i $\log D$ vrijednosti ispitivanih analita;
- DryLab® 4.3.2. (Molnar Institute, Berlin, Njemačka) – korišten za *in silico* razvoj UHPLC metode i određivanje područja robusnosti metode;

- Zeneth[®] (Lhasa Limited, Leeds, Velika Britanija) – korišten za *in silico* predviđanje puteva razgradnje djelatne tvari pimavanserina pri različitim uvjetima prisilne razgradnje;
- Microsoft[®] Office Excel 2016 (Microsoft, Seattle, SAD) – korišten za obradu eksperimentalno dobivenih podataka.

3.3. Metode rada

3.3.1. Razvoj UHPLC-DAD metode za određivanje pimavanserina i onečišćenja

Temeljne standardne otopine (eng. *stock solution*) pimavanserin ljekovite djelatne tvari (koncentracije 1 mg/mL) i njegovih onečišćenja (koncentracije 0,1 mg/mL svakog onečišćenja) pripremljene su otapanjem u smjesi acetonitrila i ultračiste vode, a čuvane su u hladnjaku na temperaturi od 2–8 °C. Smjesa acetonitrila i ultračiste vode u omjeru 1:1 (v/v) korištena je kao diluent za sva razrjeđenja. Sva korištena otapala i pripremljene otopine tretirane su ultrazvučno 2 minute i filtrirane kroz 0,45 mm PTFE filtere (Millipore, SAD) prije upotrebe.

Za UHPLC analizu korišteni su sljedeći puferi:

- pufer pH-vrijednosti 3,0 (10 mmol/L) pripremljen je na način da je odvagano 1,26012 g NH₄COOH, otopljeno u ultračistoj vodi i nadopunjeno do oznake (2 L) ultračistom (Milli-Q) vodom. pH-vrijednost korigirana je dodatkom HCOOH.
- pufer pH-vrijednosti 5,0 (10 mmol/L) pripremljen je vaganjem 1,26012 g NH₄COOH, otapanjem u ultračistoj vodi i nadopunjavanjem do oznake (2 L) ultračistom vodom. pH-vrijednost korigirana je dodatkom NH₃.
- pufer pH-vrijednosti 10,0 (10 mmol/L) pripremljen je vaganjem 1,26012 g NH₄COOH, otapanjem u ultračistoj vodi i nadopunjavanjem do oznake (2 L) ultračistom vodom. pH-vrijednost korigirana je dodatkom NH₃.

Puferi su korišteni za pripremu vodene komponente pokretne faze (A), dok je za organsku komponentu pokretne faze (B) korištena smjesa acetonitrila i tetrahidrofurana (70 : 30, v/v). Sve puferske otopine korištene za kromatografske analize su filtrirane korištenjem 0,45 µm PTFE filtera prije upotrebe.

Razvoj UHPLC-DAD metode obuhvatio je ispitivanje utjecaja promjene pH-vrijednosti vodene komponente pokretne faze (3,0, 5,0 i 10,0), promjene gradijenta i temperature kromatografske kolone (30 i 50 °C) s ciljem postizanja što boljeg razlučivanja pimavanserina i onečišćenja.

Dobiveni eksperimentalni podaci preliminarnih ispitivanja korišteni su za modeliranje i određivanje radnog područja metode pomoću DryLab računalnog programa. Rezultati preliminarnih ispitivanja i odabir optimalnih radnih uvjeta UHPLC-DAD metode prikazani su u poglavlju 4.1.

3.3.2. Validacija razvijene UHPLC-DAD metode za određivanje pimavanserina i onečišćenja

Validacija metode UHPLC-DAD provedena je ispitivanjem njenih izvedbenih značajki: specifičnosti, linearnosti, granica detekcije i kvantifikacije, iskorištenja i preciznosti.

Specifičnost

Specifičnost metode ispitana je analizom standardne otopine pimavanserin ljekovite djelatne tvari koja sadrži pimavanserin (1 mg/mL) i sva onečišćenja (koncentracija pojedinog onečišćenja 1 µg/mL, odnosno 0,1 % u odnosu na pimavanserin).

Linearnost

Linearnost metode za određivanje pimavanserina i njegovih onečišćenja ispitana je u koncentracijskom rasponu 0,1–20,0 µg/mL injektiranjem 6 otopina standarda pimavanserina i njegovih onečišćenja. Svaka otopina je injektirana jednom.

Ispitana je i linearnosti odziva DAD detektora za pimavanserin u koncentracijskom rasponu 0,5–1,2 mg/mL (što odgovara koncentracijskom rasponu od 50–120 % nazivne koncentracije ispitivanog uzorka pimavanserina (1 mg/mL)).

Granice detekcije i kvantifikacije

Granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) određene su injektiranjem otopina poznatih koncentracija Imp A, Imp B, Imp C i Imp D, testiranja preciznosti metode te provjerom odnosa signala i šuma. LOD i LOQ određeni su iz omjera signala i šuma (S/N), 3:1 za LOD i 10:1 za LOQ.

Točnost

Točnost je definirana kao blizina rezultata ispitivanja očekivanoj, unaprijed utvrđenoj vrijednosti. Točnost se određuje kao iskorištenje metode. Iskorištenje metode ispitano je pri koncentraciji pimavanserina od 1 mg/mL i tri različite koncentracije onečišćenja: 0,1, 1,0 i 20,0 µg/mL. Iskorištenje je određeno kao omjer određene koncentracije u odnosu na stvarnu i izraženo je u postocima.

Ispitana je trostrukim injektiranjem otopine smjese standarda pimavansrina i poznatih onečišćenja pri 3 različite koncentracije: 0,01 % (0,1 µg/mL, LOQ), 0,10 % (1,0 µg/mL) i 2,0 % (20,0 µg/mL) u odnosu na nominalnu koncentraciju otopine uzorka (1 mg/mL) te izračunom iskorištenja.

Preciznost

Ponovljivost određivanja provjerena je injektiranjem 6 nezavisno pripremljenih otopina pimavanserina proizvedenih komercijalnim postupkom i standarda pimavanserina. Otopina uzorka pimavanserina proizvedenog komercijalnim postupkom nacijepljena je svim onečišćenjima pri koncentraciji 0,10 %, u odnosu na nominalnu koncentraciju (1 mg/mL).

Međupreciznost mjerenja je ispitana analizom šest nezavisno pripremljenih otopina smjese pimavanserina (1 mg/mL) nacijepljenih sa svim onečišćenjima (koncentracija pojedinog onečišćenja 0,10 % u odnosu na koncentraciju pimavanserina). Ispitivanje međupreciznosti mjerenja provedeno je unutar istog laboratorija korištenjem dva UHPLC sustava unutar dva dana. Preciznost je iskazana u postocima kao relativno standardno odstupanje.

Robusnost

Tijekom ispitivanja robusnosti, eksperimentalni uvjeti metode su promijenjeni te je provjeren utjecaj promijenjenih uvjeta metode na definirane CMA vrijednosti. Brzina protoka promijenjena je za 0,05 mL/min (s 0,2 na 0,15 i 0,25 mL/min). Utjecaj promjene temperature kromatografske kolone na CMA vrijednosti ispitivan je pri 30 i 40 °C (optimalna temperatura je 35 °C). Ispitane su i male promijene u pH-vrijednostima eluensa A. pH-vrijednost eluensa A je promijenjena za 0,5 (s 9,5 na 9,0 i 10,0).

Stabilnost

Stabilnost otopine uzroka ljekovite djelatne tvari pimavanserina (nominalne (radne) koncentracije 1 mg/mL) i otopine referentnog standarda ljekovite djelatne tvari pimavanserina ispitana je čuvanjem otopina u dobro zatvorenim volumetrijskim tikvicama na sobnoj temperaturi tijekom sedam dana.

3.3.3. Studija prisilne razgradnje

Studija prisilne razgradnje pimavanserin lijekovite djelatne tvari provedena je kroz 5 eksperimenata s ciljem ispitivanja utjecaja povišene temperature, fotolitičke stabilnosti te podložnosti oksidaciji, kao i kiseloj i bazičnoj hidrolizi. Otopina pimavanserin lijekovite djelatne tvari (1 mg/mL) pripravljena je otapanjem 20 mg pimavanserina u 20 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v).

Hidrolitička razgradnja pimavanserina ispitana je u kiselim i bazičnim uvjetima. U tu svrhu pripravljene su dvije otopine:

- Prva otopina pripravljena je u tikvici od 20 mL u koju je preneson 20 mg pimavanserina, dodano je 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 1 mL prethodno pripravljene otopine HCl koncentracije 1 mol/L. Tikvica je ostavljena 15 sati na sobnoj temperaturi za odvijanje reakcije. Nakon 15 sati dodan je 1 mL NaOH koncentracije 1 mol/L i nadopunjeno do oznake s otopinom smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v).
- Druga otopina također je pripravljena u tikvicu od 20 mL u koju je prenesena odvaga od 20 mg pimavanserina, dodano je 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 1 mL prethodno pripravljene otopine NaOH koncentracije 1 mol/L. Tikvica je ostavljena 15 sati na sobnoj temperaturi za odvijanje reakcije. Nakon 15 sati dodan je 1 mL HCl koncentracije 1 mol/L i nadopunjeno do oznake s otopinom smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v).

Oksidacija pimavanserina ispitana je dodatkom H₂O₂ (30 %). Otopina je pripravljena vaganjem 20 mg pimavanserina u tikvicu od 20 mL uz dodatak 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) te 0,2 mL 30 % H₂O₂. Pripravljena otopina ostavljena je na sobnoj temperaturi 10 minuta zbog odvijanja reakcije nakon čega je tikvica nadopunjena smjesom acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) do oznake.

Za provjeru stabilnosti pimavanserina pri povišenoj temperaturi, otopina pimavanserina (koncentracije 1 mg/mL) držana je 1 sat u vodenoj kupelji na temperature 80 °C.

Fotolitička stabilnost pimavanserina ispitana je izlaganjem otopine pimavanserina (koncentracije 1 mg/mL) UV-A zračenju (200 Wh/m²) i vidljivom zračenju (1,2 milijuna lxh). Studija fotostabilnosti provedena je u fotostabilnoj komori Suntest CPS+ (Atlas, Njemačka).

3.3.4. Ispitivanje i validacija GC-MS metode za određivanje potencijalno genotoksičnog onečišćenja izobutil-bromida (IMP-1)

Prije pripreme otopina ispitana je topljivost uzorka pimavanserina proizvedenog komercijalnim postupkom u sljedećim otapalima: acetonitril, 2-propanol, *N*-metil-2-pirolidon, dimetil-sulfoksid, aceton, *n*-heksan, *n*-heptan, diklormetan i tetrahidrofuran. Kao pogodno otapalo pokazao se diklormetan, te je u njemu ispitana topljivost potencijalnog genotoksičnog onečišćenja izobutil-bromida (IMP-1).

Nominalna koncentracija (20 mg/mL) komercijalnog uzorka pimavanserina pripravljena je vaganjem 20,13 mg uzorka u tikvicu volumena 1 mL na analitičkoj vagi, te je tikvica nadopunjena otapalom diklormetanom do oznake. Temeljna standardna otopina onečišćenja IMP-1 (1 mg/mL) pripravljena je otapanjem 109,26 mg IMP-1 u tikvici volumena 100 mL u diklormetanu. Temeljna standardna otopina IMP-1 korištena je za pripremu radnih standardnih otopina različitih koncentracija a koje su korištene za validaciju analitičke metode.

Validacija GC-MS metode provedena je ispitivanjem njenih izvedbenih značajki: specifičnosti, linearnosti, granica detekcije i kvantifikacije, iskorištenja i preciznosti.

Temeljna standardna otopina potencijalno genotoksičnog onečišćenja IMP-1 (izobutil-bromida) pripravljena je otapanjem 100 mg IMP-1 diklormetanom u tikvici volumena 100 mL, dok je radna standardna otopina IMP-1 (0,01 mg/mL) pripravljena razrjeđivanjem temeljene standardne otopine. Linearnost metode za određivanje potencijalno genotoksičnog onečišćenja IMP-1 ispitana je u koncentracijskom rasponu od 0,06–0,6 µg/mL (od 3–30 ppm u odnosu na nominalnu koncentraciju pimavanserina) injektiranjem pet standardnih otopina IMP-1, a svaka otopina je injektirana jedanput.

Granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) određene su injektiranjem otopina poznatih koncentracija IMP-1 (0,03 µg/mL za granicu detekcije, te 0,06 µg/mL za granicu kvantifikacije).

Testirana je preciznost metode pri LOQ (0,06 µg/mL) te provjeren odnos signala i šuma.

Analizom komercijalno proizvedenog pimavanserina nije utvrđena prisutnost IMP-1, te je ponovljivost metode ispitana analizom šest nezavisno pripremljenih otopina uzorka komercijalno proizvedenog pimavanserina nacijepljenih onečišćenjem IMP-1 na koncentraciju 0,2 µg/mL (10 ppm u odnosu na nominalnu koncentraciju pimavanserina 20 mg/mL).

Točnost analitičke metode ispitana je trostrukim injektiranjem otopine uzorka komercijalno proizvedenog pimavanserina naci jepljenog s onečišćenjem IMP-1 na četiri koncentracije: 0,06 µg/mL (LOQ), 0,2 µg/mL, 0,3 µg/mL i 0,6 µg/mL, te izračunom iskorištenja.

Stabilnost standardne otopine IMP-1 onečišćenja (0,2 µg/mL) te stabilnost otopine pimavanserin lje kovite djelatne tvari naci jepljene s IMP-1 (0,2 µg/mL) ispitana je čuvanjem otopina u dobro zatvorenim volumetrijskim tikvicama na sobnoj temperaturi tijekom tri dana.

3.3.5. Ispitivanje i validacija LC-MS metode za određivanje potencijalno genotoksičnog onečišćenja *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamida (IMP-2)

Prije pripreme otopina bilo je potrebno odrediti topljivost komercijalno proizvedenog pimavanserin uzorka i onečišćenja *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamida (IMP-2). Ispitana je topljivost u metanolu i acetonitrilu koju se nisu pokazali kao dobra otapala, no pogodnim otapalom se pokazala smjesa acetonitrila i vode (50:50, v/v). Nominalna koncentracija (10 mg/mL) komercijalnog uzorka pimavanserina pripremljena je vaganjem 9,97 mg uzorka u tikvicu volumena 1 mL na analitičkoj vagi, te je tikvica nadopunjena otapalom (smjesom acetonitrila i vode u omjeru 50:50 (v/v)) do oznake.

Temeljna standardna otopina onečišćenja IMP-2 (0,5 mg/mL) pripremljena je otapanjem 25,11 mg IMP-2 smjesom acetonitrila i vode u omjeru 50:50 (v/v) u tikvici volumena 50 mL, dok je radna standardna otopina IMP-2 (0,005 mg/mL) pripremljena prenošenjem 1 mL temeljene standardne otopine u odmjernu tikvicu volumena 100 mL koja je nadopunjena smjesom acetonitrila i vode u omjeru 50:50 (v/v). Temeljna standardna otopina IMP-1 korištena je za pripremu radnih standardnih otopina različitih koncentracija koje su korištene za validaciju analitičke metode.

Linearnost metode za određivanje potencijalno genotoksičnog onečišćenja IMP-2 ispitana je u koncentracijskom rasponu 0,03–0,3 µg/mL (3–30 ppm u odnosu na nominalnu koncentraciju pimavanserina) injektiranjem pet standardnih otopina IMP-1, a svaka otopina je injektirana jedanput. Granice detekcije i kvantifikacije određene su injektiranjem otopina poznatih koncentracija IMP-2 (0,015 µg/mL za granicu detekcije, te 0,03 µg/mL za granicu kvantifikacije), testirana je preciznost metode pri LOQ (0,03 µg/mL) te provjeren odnos signala i šuma.

Analizom komercijalno proizvedenog pimavanserina nije utvrđena prisutnost IMP-1, te je ponovljivost metode ispitana analizom šest nezavisno pripremljenih otopina uzorka komercijalno proizvedenog pimavanserina naciyepljenih onečišćenjem IMP-2 na koncentraciju 0,1 µg/mL (10 ppm u odnosu na nominalnu koncentraciju pimavanserina (10 mg/mL)).

Točnost analitičke metode ispitana je trostrukim injektiranjem trostrukim injektiranjem otopine uzorka komercijalno proizvedenog pimavanserina naciyepljenog onečišćenjem IMP-2 onečišćenja na četiri koncentracije: 0,03 (LOQ), 0,10, 0,15 i 0,30 µg/mL, te izračunom iskorištenja.

3.3.6. Ispitivanje i validacija ICP-MS metode za određivanje elementnih onečišćenja

Tijekom istraživanja razvijena je i metoda za određivanje elementnih onečišćenja induktivno spregnutom plazmom sa spektrometrom masa (ICP-MS).

Otopine uzoraka pimavanserin ljekovite djelatne tvari pripremljene su vaganjem 50 mg uzorka u kvarcnu kivetu te dodatkom 5 mL koncentrirane nitratne kiseline, 0,25 mL koncentrirane perklorne kiseline i 0,1 mL internog standarda. Kvarcne kivete su pažljivo zatvorene i postavljene u reaktorsku komoru mikrovalnog uređaja (Milestone Ultrawave SRC Microwave), a potpuna digestija uzoraka provedena je primjenom gradijentnog programa provedenog u dva koraka opisanog u **Tablici 14**.

Table 14: Eksperimentalni uvjeti mikrovalne digestije uzoraka pimavanserina

Korak	Vrijeme (min)	T (°C)	Tlak (bar)
	0	25	0
1	25	210	130
2	20	210	130

Tijekom prvog koraka mikrovalne digestije, uzorci se zagrijavaju linearnim podizanjem temperature tijekom 25 minuta od početne sobne temperature do konačne temperature od 210 °C, dok unutarnji tlak reaktora linearno raste do zadane vrijednosti (130 bara).

U drugom koraku, mikrovalni reaktor tijekom 20 minuta održava postignutu temperaturu (210 °C) i unutarnji tlak (130 bara).

Temperatura vanjske ovojnice mikrovalnog reaktora održava se konstatnom (na 70 °C) cijelo vrijeme rada, čime se osigurava sigurna upotreba mikrovalnog reaktora uz održavanje ekstremnih unutarnjih uvjeta digestije.

Nakon mikrovalne digestije, uzorci su kvantitativno prebačeni u odmjerne tikvice od polipropilena, volumena 50 mL, te nadopunjene otopinom za razrjeđivanje (10 mM tiourea u 2,5 % v/v HCl).

Za pripremu temeljnih standardnih otopina elemenata korišteni su certificirani referentni standardi proizvođača Inorganic Ventures navedeni u **Tablici 13**. Volumeni koje je potrebno dodati kako bi dobili temeljne standardne otopine pogodnih koncentracija za daljnju pripremu radnih standardnih otopina, izračunati su prema ICH Q3D smjernici za elementna onečišćenja u proizvodima za oralnu primjenu (**Tablica 3**). Pripremljene su dvije temeljne standardne otopine, u prvoj temeljnoj standardnoj otopini izdvojeni su elementi koji su stabilni u razrijeđenoj nitratnoj kiselini, a u drugoj temeljnoj standardnoj otopini elementi koji se čuvaju u razrijeđenoj klorovodičnoj kiselini (prema preporuci proizvođača primijenjenih certificiranih referentnih otopina). Na ovaj način postiže se bolja stabilnost standardnih otopina elemenata, a pripremljene temeljne standardne otopine prikladnih koncentracija analita korištene su za pripremu radnih standarda za kalibraciju i ispitivanje linearnog područja metode te kao standardni dodatak koji se dodaje u komercijalni uzorak za ispitivanje izvedbenih značajki metode tijekom provedbe validacije razvijene ICP-MS metode. Analizom komercijalnog proizvedenog pimavanserina nije utvrđena prisutnost elementnih onečišćenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Razvoj i validacija UHPLC metode za određivanje pimavanserina i onečišćenja primjenom strategije analitičke kvalitete osigurane dizajnom temeljene na procjeni rizika

Analitičke su metode kritičan parametar životnog ciklusa farmaceutskog proizvoda zbog njihove uloge u razvoju i kontroli kvalitete proizvoda. Neadekvatno razvijene analitičke metode mogu dovesti do nepouzdanih rezultata koji mogu biti ključni za daljnji razvoj proizvoda.

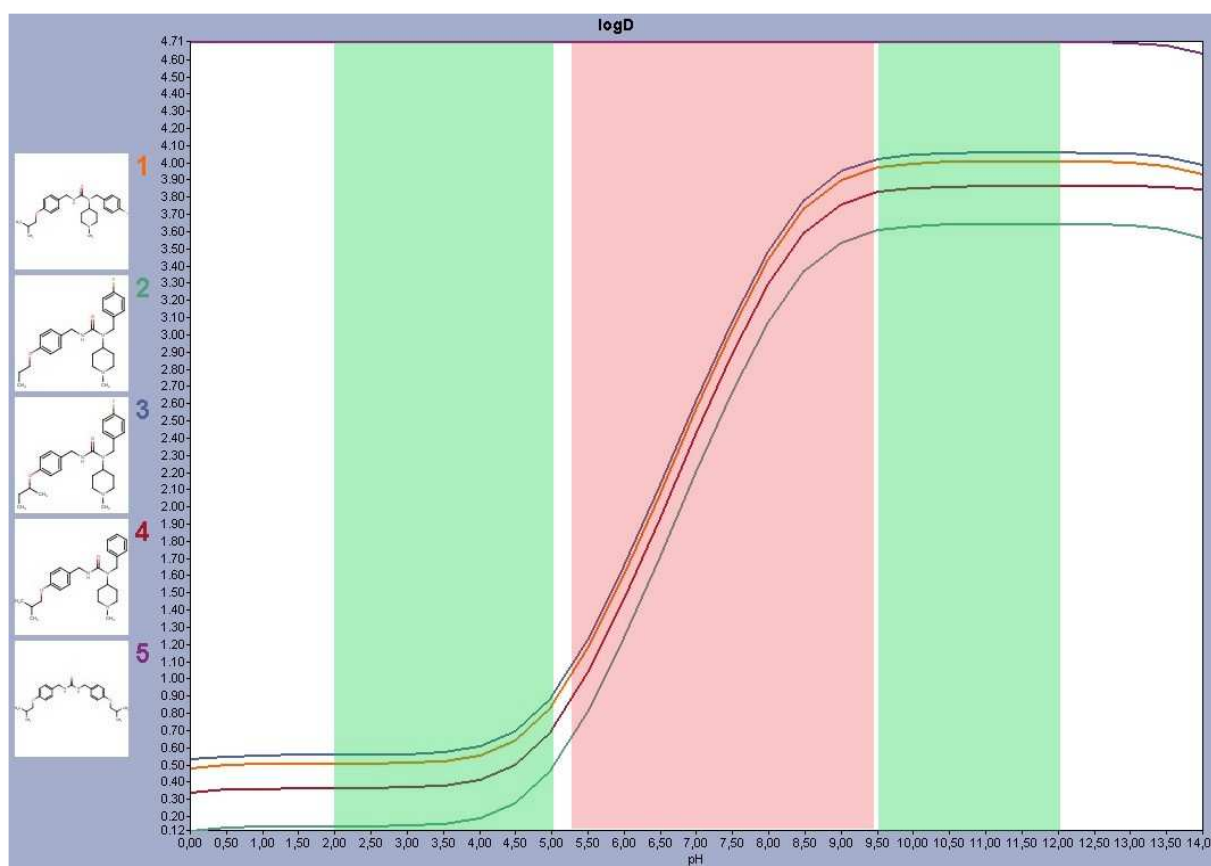
Glavni cilj istraživanja predstavljenog u ovom radu bio je razvoj brze, specifične i pouzdane analitičke metode za određivanje pimavanserina i njegovih onečišćenja. Razvoj UHPLC metode temeljio se na AQbD pristupu s ciljem potpunog razumijevanja analitičkog procesa i predlaganja smislenih mjera kontrole tijekom rutinske primjene metode, obuhvatiti iteracije između procjene rizika i eksperimenata, uključujući dizajn eksperimenata, s ciljem stvaranja baze znanja koja jasno utvrđuje utjecaj kromatografskih parametara na učinkovitost analitičkog postupka i identificira područje sa stabilnim radnim uvjetima (MODR).

4.1.1. Definiranje namjene analitičke metode (ATP)

Najvažniji korak AQbD pristupa razvoju analitičkih metoda je jasno definiranje namjene analitičke metode (ATP). ATP se koristi za definiranje i procjenu prikladnosti analitičke metode u fazi razvoja ali i tijekom životnog ciklusa metode. Namjena analitičke metode definirana je kao precizno, specifično i istovremeno određivanje ljekovite djelatne tvari pimavanserina i njegovih procesnih organskih onečišćenja u kratkom vremenu trajanja analize. ATP kriteriji definirani su na sljedeći način: (i) razvijena metoda treba osigurati odgovarajuću selektivnost između pimavanserina i njegovih onečišćenja, (ii) faktor razlučivanja između svih onečišćenja treba biti veći od 1,5, (iii) za analizu onečišćenja, granica kvantifikacije treba biti jednaka ili niža od praga izvještavanja od 0,05 % u odnosu na pimavanserin, i (iv) vrijednost omjera signala i šuma trebala bi biti ≥ 10 .

4.1.2. Preliminarna ispitivanja, procjena rizika i definiranje kritičnih značajki i kritičnih parametara UHPLC metode

Tijekom preliminarnih ispitivanja kromatografskih sustava i početnih kromatografskih uvjeta potrebno je razumjeti fizikalno-kemijska svojstva analita, a pri tome značajnu ulogu imaju pK_a i $\log D$ vrijednosti. Ove vrijednosti su određene *in silico* korištenjem Marvin Sketch računalnog programa. Uvidom u $\log D$ dijagrame (Slika 21) i vrijednosti pK_a analita ($pK_a = 8,44$ za PMV, onečišćenje A, B i C; onečišćenje D je komponenta koja ne ionizira), te uzimajući u obzir da optimalna pH-vrijednost odabranog puferskog sustava treba biti barem 1 do 2 pH jedinice od vrijednosti pK_a veličine analita, za svrhe preliminarnih ispitivanja odabrana su dva pH-područja: za ispitivanje utjecaja niskih pH-vrijednosti (2,0–5,0) i za ispitivanje utjecaja visokih pH-vrijednosti (9,5–12,0).



Slika 21. Log D dijagrami pimavanserina i specifičnih procesnih onečišćenja (Marvin Sketch);

- zeleno područje - prikaz odabranih pH-područja za preliminarna ispitivanja: za ispitivanje utjecaja niske pH-vrijednosti (2,0–5,0) i za ispitivanje utjecaja visoke pH-vrijednosti (9,5–12,0);
- crveno označeno područje je pH-područje blisko vrijednosti pK_a veličine analita

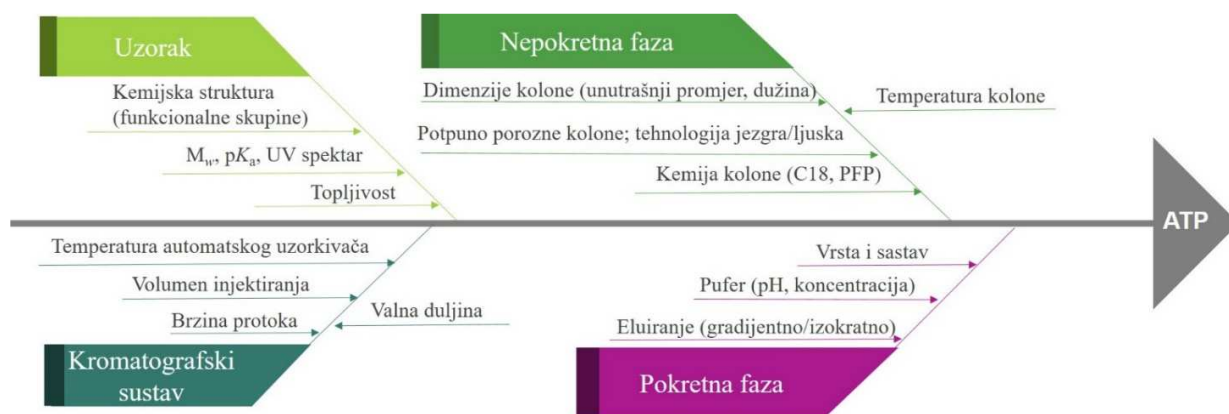
Pri pH-vrijednostima unutar odabranog nižeg raspona pH-vrijednosti puferkog sustava pimavanserin i procesna onečišćenja A, B i C nalaze se u ≈ 100 % protoniranom obliku, a pri pH-vrijednostima unutar odabranog višeg raspona pH-vrijednosti u ≈ 100 % disociranom obliku (u ionskom obliku). Procesno onečišćenje D ima najvišu log P ali i log D vrijednost (log $P = 4,71$; log $D = 4,71$), također nema funkcionalnih skupina koje mogu ionizirati u odabranim područjima pH, što upućuje da je onečišćenje D najlipofilnija komponenta čije zadržavanje u kromatografskom sustavu isključivo ovisi o raspodjeli analita između organske i vodene komponente pokretne faze. Pimavanserin i specificirana procesna onečišćenja su hidrofobne molekule s malim polarnim dijelovima, stoga je odabrana kromatografija obrnutih faza kao metoda njihove identifikacije i kvantifikacije. Za onečišćenje D, zbog njegove lipofilnosti, pretpostavljeno je da će posljednje izlaziti s kromatografske kolone u kromatografskom sustavu obrnutih faza.

Tijekom preliminarnih ispitivanja testirano je nekoliko kromatografskih kolona s različitim punjenjem (C18, pentafluorfenil (PFP)). Slični profili razdvajanja analita postignuti su na svim ispitanim nepokretnim fazama. Potpuno porozna Acquity UPLC BEH C18 kolona, koja je nastala kemijskom modifikacijom silikagela vezanjem hibridnih etilena, odabrana je kao optimalna. Odabranu optimalnu kolonu karakterizira mogućnost korištenja u širokom rasponu pH-vrijednosti (1,0–12,0), visoka stabilnost u području niskih pH-vrijednosti, te mogućnost korištenja i u LC-MS vezanim sustavima.

Kako bi se izbjegao problem preranog eluiranja analita ($t_0 + t_D$, t_D -vrijeme zadržavanja sustava), ali i prekasnog eluiranja analita u odabranom kromatografskom sustavu ($t_0 + t_D + t_{\text{grad}}$, t_{grad} -trajanje gradijenta), izvedeno je nekoliko preliminarnih eksperimenata čiji je cilj bio definiranje početnog i konačnog udjela organske komponente u pokretnoj fazi tijekom linearnog gradijentnog eluiranja. Provedbom preliminarnih eksperimenata ispitan je i sastav organske komponente (B), a smjesa acetonitrila i tetrahidrofurana (70:30, v/v) odabrana je kao optimalna. Kod odabira gradijenta ispitani su početni omjeri vodene komponente i organske komponente pokretne faze (0, 25 i 45 % eluenta B). Najbolje razdvajanje kritičnog para analita (Imp B–Imp C) postignuto je s 45 %-tnim početnim volumnim udjelom organske komponente B u pokretnoj fazi.

Kako bi se osiguralo eluiranje svih ispitivanih analita s kromatografske kolone, odabran je konačni 90 %-tni volumni udio organske komponente B u pokretnoj fazi.

Rezultati provedenih preliminarnih eksperimenata omogućili su definiranje kritičnih značajki analitičke metode (CMA), a odabrane su sljedeće kritične značajke: faktor kapaciteta onečišćenja A ($k_{Imp A} > 1,00$), vrijeme trajanja analize koje je definirano vremenom zadržavanja onečišćenja D ($t_{Imp D} < 10,0$ min) kao komponente koja eluira posljednja, kritično razlučivanje između onečišćenja B i C ($R_s > 1,5$), simetrija kromatografskih pikova izražena preko *tailing* faktora, T_f (prema USP, $T_f < 1,5$) i broj teorijskih odsječaka ($N > 20000$ za sve ispitivane komponente). Odabrane kritične značajke izravno su povezane s definiranim ATP kriterijem analitičke metode te pružaju informaciju o kvaliteti kromatografske separacije. Kako bi se osigurali pouzdani rezultati tijekom cijelog životnog ciklusa analitičke metode, u ranoj fazi razvoja metode primijenjena je strategija procjene rizika s ciljem identificiranja CMP koji bi potencijalno mogli utjecati na odabrane CMA. U ovu svrhu korišten je Ishikawin dijagram (Slika 22).



Slika 22. Ishikawin dijagram za procjenu potencijalnih rizika i identifikaciju kritičnih parametara metode (CMP)

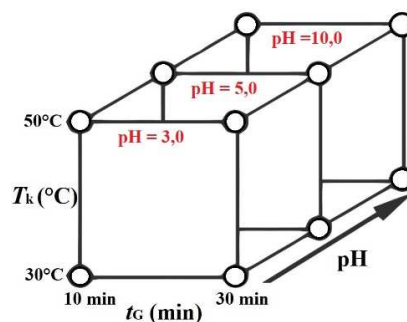
Analizom čimbenika koji mogu utjecati na kvalitetu rezultata kromatografske analize, prikazanih Ishikawinim dijagramom, identificirana su tri kritična čimbenika koji potencijalno mogu utjecati na definirane kritične značajke i posljedično ATP metode: pH-vrijednost vodene komponente pokretne faze (A), vrijeme trajanja gradijenta (t_G) i temperatura kromatografske kolone (T_k).

4.1.3. Dizajn eksperimenta (DoE) – vizualizacija područja robusnosti i odabir radnog područja metode (MODR)

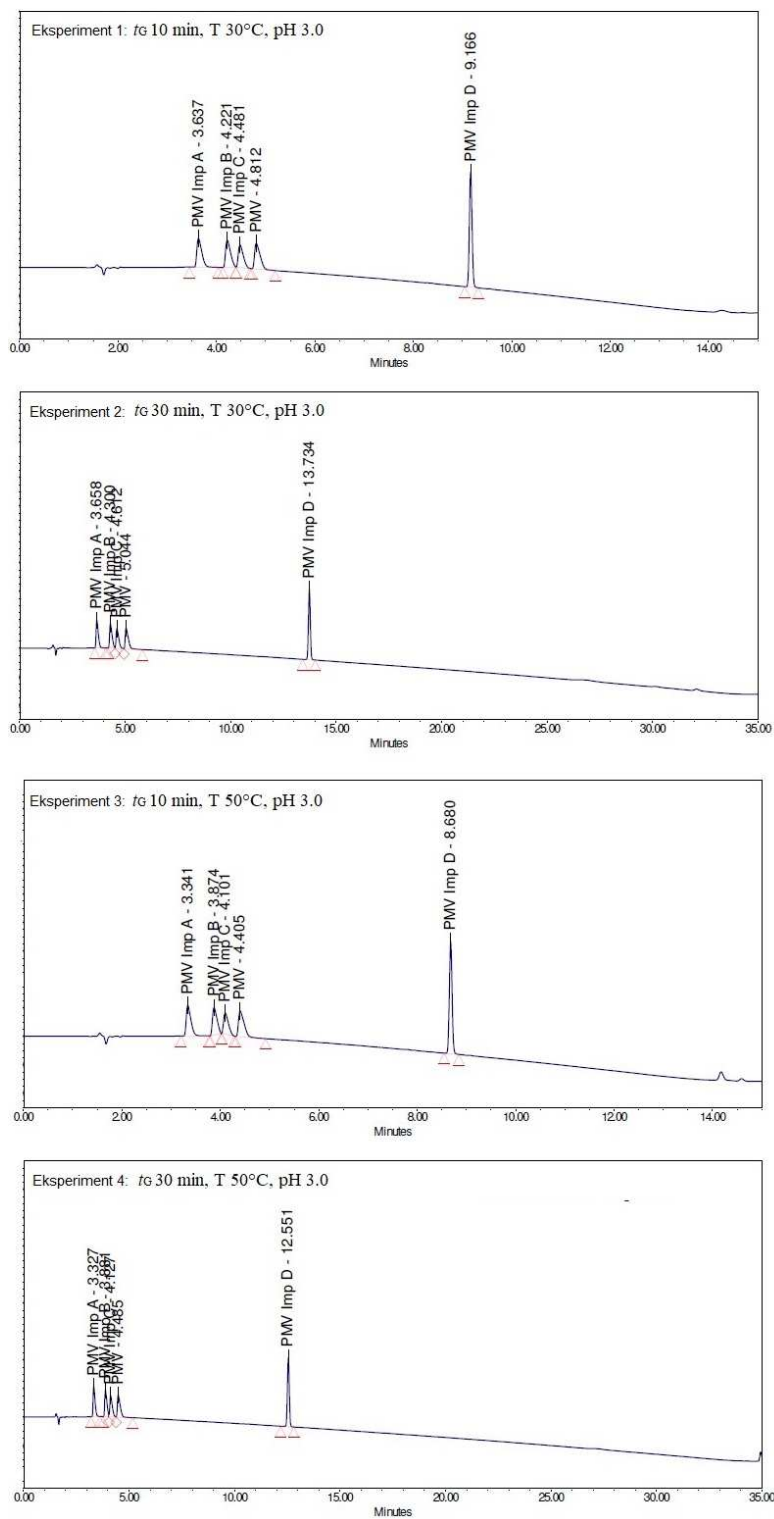
Međusoban utjecaj kritičnih parametara metode na kritične značajke metode ispitan je koristeći alate i metode planiranja eksperimenta. U ovu svrhu korištena je metoda probirnog dizajna temeljena na primjeni djelomičnog faktorijskog dizajna.

Trajanje gradijentnog eluiranja ispitano je na dvije razine (odnos kratkog i dugog vremena eluiranja je višekratnik broja tri ($t_{G2}/t_{G1}=3$)). Utjecaj temperature kromatografske kolone također je ispitan na dvije razine (30 i 50 °C), dok je utjecaj promjene pH-vrijednosti vodene komponente pokretne faze (10 mmol/L NH_4COOH) sagledan na tri pH-razine (3,0, 5,0 i 10,0).

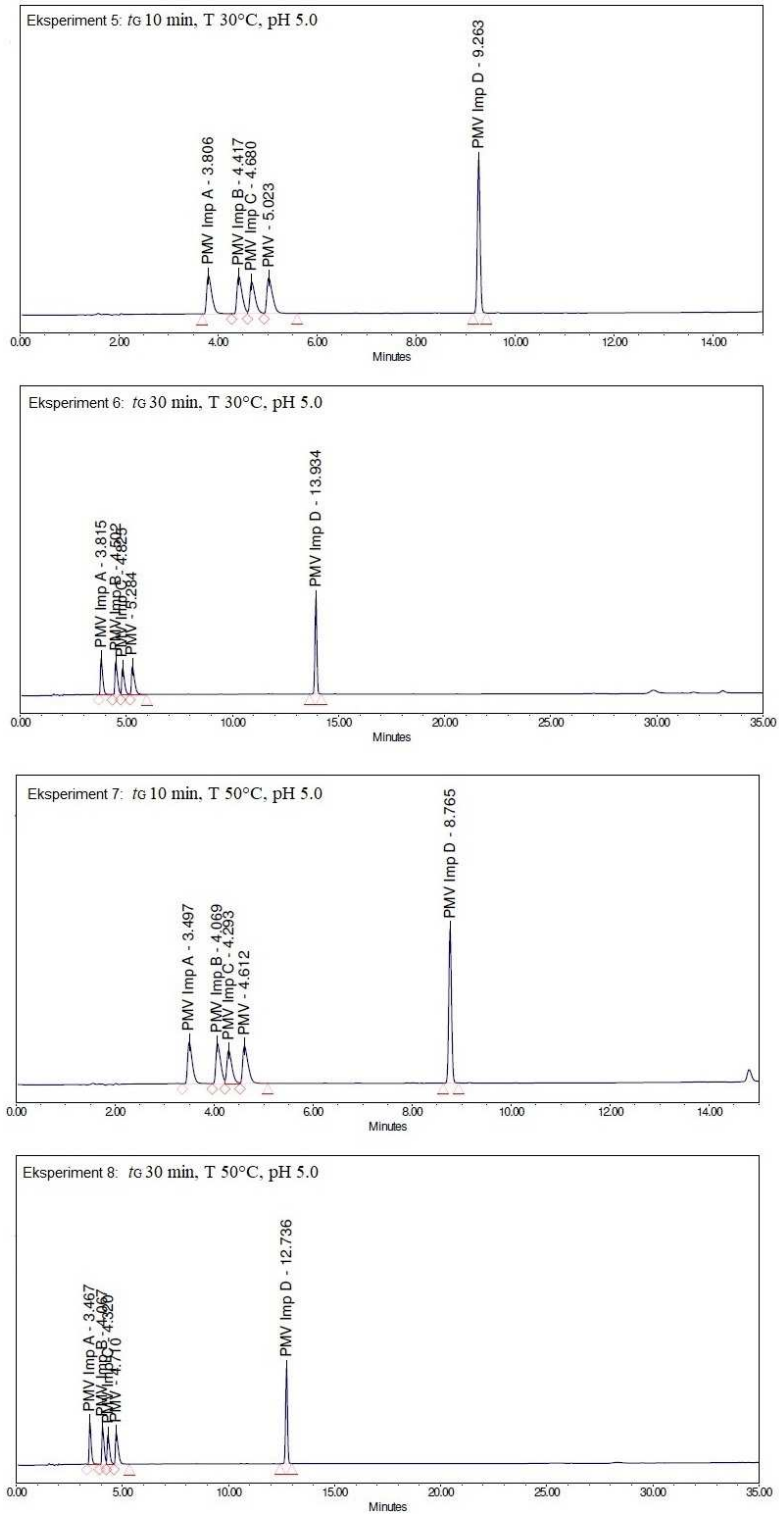
Ostali kromatografski parametri, poput vrste nepokretne faze (kolona Acquity BEH C18), sastav organske komponente pokretne faze (B: acetonitril:tetrahidrofuran = 70:30, v/v), sastav vodene komponente pokretne faze (A: 10 mmol/L NH_4COOH u vodi), raspon udjela organske komponente (B) tijekom gradijentnog eluiranja (45 % → 90 % B), volumen injektiranja (1 μL) i brzina protoka pokretne faze kroz kromatografsku kolonu (0,2 mL/min), nisu se mijenjali tijekom faze optimizacije. Dvanaest preliminarnih ispitivanja provedeno je prema t_G - T_k -pH modelu koji je prikazan na **Slici 23**. Eksperimentalni kromatogrami i rezultati preliminarnih ispitivanja prikazani su na **Slikama 24–26** i u **Tablici 15**.



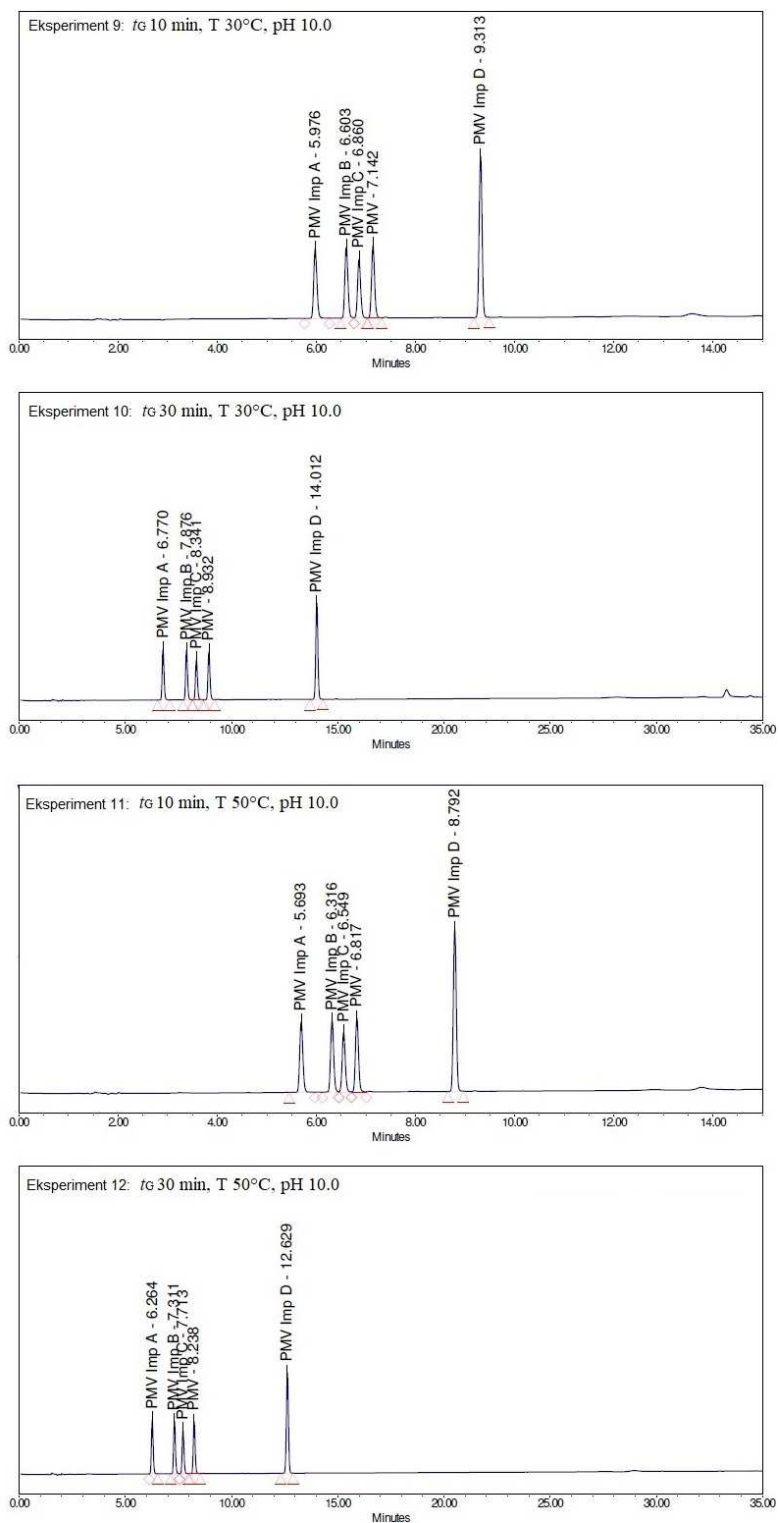
Slika 23. Shematski prikaz plana preliminarnih ispitivanja (t_G - T_k -pH model)



Slika 24. Eksperimentalni kromatogrami preliminarnih ispitivanja prema t_G - T_k -pH modelu (pH = 3,0)



Slika 25. Eksperimentalni kromatogrami preliminarne ispitivanja prema t_G - T_k -pH modelu (pH = 5,0)



Slika 26. Eksperimentalni kromatogrami preliminarnih ispitivanja prema t_G - T_k -pH modelu (pH = 10,0)

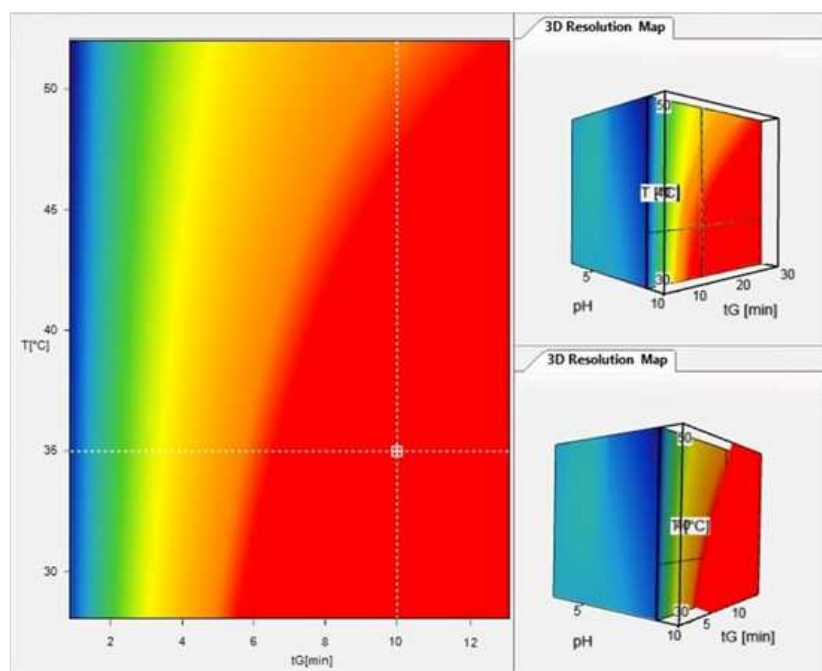
Tablica 15: Rezultati dvanaest preliminarnih ispitivanja prema t_G - T_k -pH modelu

Broj eksperimenta	t_G (min)	T_k (°C)	pH	Protok (mL/min)	$k_{Imp A}$	$t_{Imp D}$ (min)	R_S (Imp B – Imp C)	Analit	T_f	N
1	10	30	3,0	0,20	0,82	9,166	1,37	Imp A	1,8	5883
								Imp B	1,6	7483
								Imp C	1,7	8421
								PMV	1,9	7822
								Imp D	1,1	129917
2	10	50	3,0	0,20	0,67	8,680	1,25	Imp A	1,7	5668
								Imp B	1,5	7146
								Imp C	1,7	7553
								PMV	2,2	6439
								Imp D	1,1	110674
3	30	30	3,0	0,20	0,83	13,734	1,40	Imp A	1,8	5547
								Imp B	1,9	5754
								Imp C	1,7	6012
								PMV	2,2	5184
								Imp D	1,1	109664
4	30	50	3,0	0,20	0,66	12,551	1,21	Imp A	1,6	5625
								Imp B	-	5758
								Imp C	-	5616
								PMV	2,1	4795
								Imp D	1,1	90836
5	10	30	5,0	0,20	0,90	9,263	1,37	Imp A	1,7	6344
								Imp B	-	8095
								Imp C	-	8984
								PMV	1,8	8954
								Imp D	1,1	124800
6	10	50	5,0	0,20	0,75	8,765	1,23	Imp A	1,7	6174
								Imp B	-	7672
								Imp C	-	7956
								PMV	1,8	8018
								Imp D	1,1	106454

Tablica 15: Rezultati dvanaest preliminarnih ispitivanja prema t_G - T_k -pH modelu (nastavak)

Broj eksperimenta	t_G (min)	T_k (°C)	pH	Protok (mL/min)	$k_{Imp A}$	$t_{Imp D}$ (min)	R_s (Imp B – Imp C)	Analit	T_f	N
7	30	30	5,0	0,20	0,91	13,934	1,44	Imp A	1,8	5731
								Imp B	1,9	6326
								Imp C	1,8	6567
								PMV	2,1	5903
								Imp D	1,0	110265
8	30	50	5,0	0,20	0,73	12,726	1,27	Imp A	1,7	6152
								Imp B	-	6627
								Imp C	-	6429
								PMV	2,0	5881
								Imp D	1,0	93770
9	10	30	10,0	0,20	1,99	9,313	1,99	Imp A	1,2	39233
								Imp B	1,1	50484
								Imp C	1,1	53546
								PMV	1,1	59265
								Imp D	1,1	108643
10	10	50	10,0	0,20	1,85	8,792	2,03	Imp A	1,1	36556
								Imp B	1,1	47599
								Imp C	1,1	50677
								PMV	1,1	56252
								Imp D	1,1	100478
11	30	30	10,0	0,20	2,39	14,012	2,76	Imp A	1,2	26808
								Imp B	1,1	34635
								Imp C	1,1	36678
								PMV	1,1	41258
								Imp D	1,0	88576
12	30	50	10,0	0,20	2,13	12,629	2,53	Imp A	1,7	25845
								Imp B	1,1	33266
								Imp C	1,1	35396
								PMV	1,1	40111
								Imp D	1,0	78705

Eksperimentalni podaci dobiveni preliminarnim ispitivanjima korišteni su za utvrđivanje radnog područja metode (MODR) pomoću računalnog programskog paketa DryLab. Na temelju dvanaest preliminarnih pokusa, softver predlaže trodimenzionalni model koji pokazuje ovisnost faktora razlučivanja kritičnog para analita o trajanju gradijenta, temperaturi kromatografske kolone i pH-vrijednosti vodene komponente pokretne faze (**Slika 27**).



Slika 27. 2-D i 3-D grafički prikaz radnog područja analitičke metode (MODR) i odabir optimalnih radnih uvjeta (pH 9,5 vodene komponente pokretne faze, temperatura kromatografske kolone $T_k = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ i vrijeme trajanja gradijentnog eluiranja $t_G = 10 \text{ min}$)

Dobiveni trodimenzionalni model (**Slika 27**) prikazuje zonu robusnosti metode, što omogućuje definiranje teorijskog područja robusnosti metode (engl. *design space*), odnosno višedimenzionalno područja unutar kojega promjene kritičnih parametra metode (CMP) ne uzrokuju značajne promjene definiranih kritičnih značajki metode (CMA). Plava boja prikazuje područja radnih uvjeta pri kojima dolazi do koeluiranja pikova analita ($R_s = 0$), dok područja zelene i žute boje prikazuju područja radnih uvjeta pri kojima postoji određen stupanj preklapanja pikova analita ($0 < R_s < 1,5$).

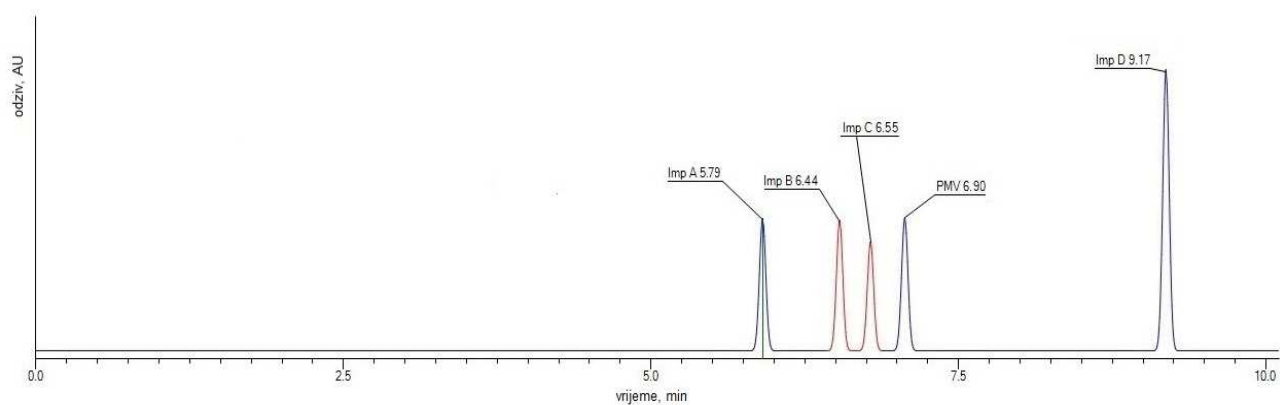
Crvena boja prikazuje MODR područje u kojem se ostvaruje najbolje kromatografsko razlučivanje između kritičnog para analita (Imp B–Imp C) i zadovoljen je minimalni kriterij prihvatljivosti, $R_S > 1,5$.

U odnosu na klasično ispitivanje područja robusnosti analitičke metode koje bi uključivalo provedbu 8–12 kritičnih eksperimenata, DryLab računalni program simulirao je 2187 eksperimenata unutar MODR područja koji su zadovoljili minimalni kriterij prihvatljivosti $R_S > 1,81$. *In silico* modelom utvrđeno je da je duljina trajanja gradijenta imala utjecaj jedino na vrijeme trajanja analize, bez pozitivnog ili negativnog utjecaj na kritičnu razlučivost.

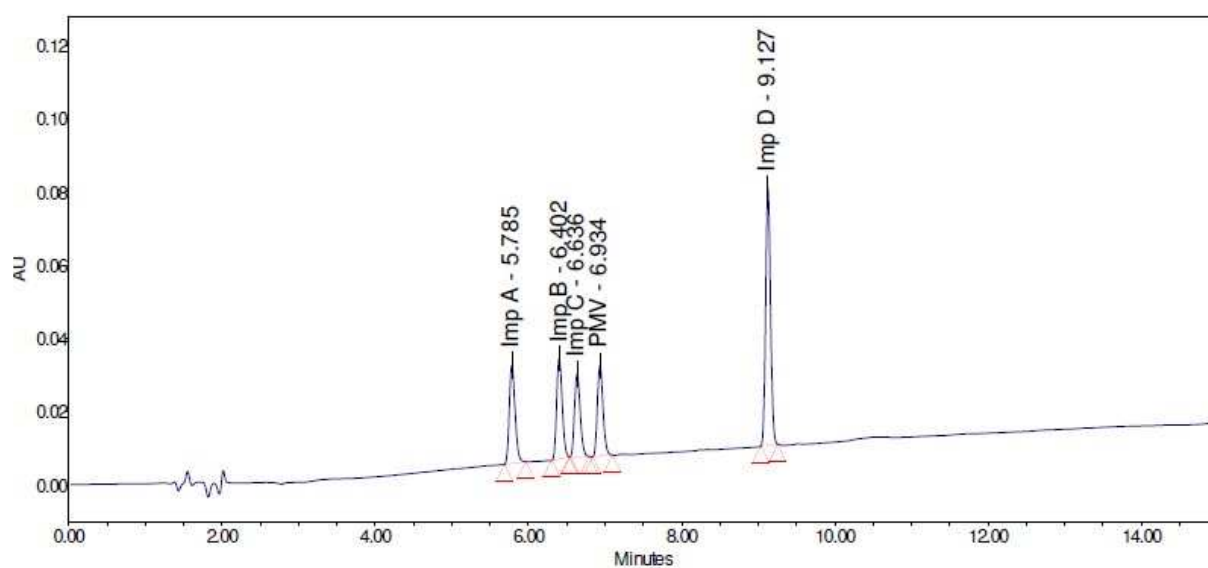
Promjena pH-vrijednosti vodene komponente A značajno je utjecala na simetriju pika ispitivanih analita. U području niskog pH, vrijednosti T_f je veća od 2,0 (postavljeni kriterij prihvatljivosti $T_f < 1,5$) za sve ispitivane analite. Zadovoljavajuća simetrija pika, dobra selektivnost i razlučivanje može se postići u području visokih pH-vrijednosti vodene komponente pokretne faze (A), uzimajući u obzir i vrijednosti pK_a veličina pimavanserina i njegovih onečišćenja, zaključeno je da je 9,5 (ili više) optimalna pH-vrijednost vodene komponente pokretne faze.

Naposljetku, primijećen je utjecaj promjene temperature kromatografske kolone na vrijeme zadržavanja ispitivanih komponenti, a samim tim i utjecaj promjene temperature na vrijeme trajanja analize. Više temperature rezultirale su kraćim vremenom trajanja analize.

Budući da visoke pH-vrijednosti pokretne faze, u kombinaciji s visokim temperaturama kromatografskih kolona, skraćuje životni vijek kromatografske kolone, definirani su sljedeći optimalni uvjeti rada: komponenta A pokretne faze pH = 9,5, temperatura kolone $T_k = 35$ °C i vrijeme trajanja linearnog gradijenta $t_G = 10$ min. Odabrani optimalni radni uvjeti UHPLC metode provjereni su i eksperimentalno. *In silico* i eksperimentalno dobiveni kromatogrami pri odabranim optimalnim uvjetima prikazani su na **Slikama 28 i 29**, dok su rezultati kromatografske analize kao i usporedba *in silico* predviđenih vremena zadržavanja (DryLab) s eksperimentalno određenim vremenima zadržavanja pri odabranim optimalnim uvjetima prikazani u **Tablicama 16 i 17**.



Slika 28. *In silico* kromatogram pimavanserina i onečišćenja dobiven DryLab računalnim programom pri odabranim optimalnim radnim uvjetima (komponenta A pokretne faze pH 9,5, temperatura kromatografske kolone $T_k = 35\text{ }^\circ\text{C}$ i trajanja gradijentnog eluiranja $t_G = 10\text{ min}$)



Slika 29. Eksperimentalni kromatogram pimavanserina i onečišćenja pri odabranim optimalnim radnim uvjetima (komponenta A pokretne faze pH 9,5, temperatura kromatografske kolone $T_k = 35\text{ }^\circ\text{C}$ i trajanja gradijentnog eluiranja $t_G = 10\text{ min}$)

Tablica 16: Rezultati kromatografske analize smjese pimavanserina i onečišćenja pri odabranim optimalnim uvjetima (komponenta A pokretne faze pH 9,5, temperatura kromatografske kolone $T_k = 35\text{ }^\circ\text{C}$ i trajanja gradijentnog eluiranja $t_G = 10\text{ min}$)

t_G (min)	T_k ($^\circ\text{C}$)	pH	Protok (mL/min)	$k_{\text{Imp A}}$	$t_{\text{Imp D}}$ (min)	R_s (Imp B – Imp C)	Analit	T_f	N
10	30	9,5	0,20	1,89	9,127	1,73	Imp A	1,2	27351
							Imp B	1,2	35150
							Imp C	1,2	36484
							PMV	1,2	40809
							Imp D	1,1	90575

Tablica 17: Usporedba *in silico* predviđenih vremena zadržavanja (DryLab) i eksperimentalno određenih pri odabranim optimalnim uvjetima (komponenta A pokretne faze pH 9,5, temperatura kromatografske kolone $T_k = 35\text{ }^\circ\text{C}$, trajanja gradijentnog eluiranja $t_G = 10\text{ min}$)

Analit	DryLab ($t_G = 10\text{ min}$)		Eksperiment ($t_G = 10\text{ min}$)		Pogreška ^a (t_R) (%)
	t_R (min)	R_s	t_R (min)	R_s	
Imp A	5,79		5,79		0,0
Imp B	6,44	6,25	6,40	4,55	0,6
Imp C	6,55	2,51	6,64	1,73	1,4
PMV	6,90	2,88	6,93	2,20	1,9
Imp D	9,17	23,97	9,13	17,31	0,4

^a Pogreška (%) = [(eksperiment – DryLab)/DryLab] × 100

Ovakav pristup razvoju analitičke metode uključivao je promatranje iteracija procjene rizika i provedenih eksperimenata s ciljem stvaranja prostora znanja i robusnog radnog područja metode (MODR), odnosno područja stabilnih radnih uvjeta unutra kojeg svaka odabrana radna točka može biti validirana, a odabrani radni uvjeti koristiti se u rutinskoj analizi.

Primijenjeni DryLab računalni program dao je trodimenzionalni model koji pokazuje optimalne teorijske uvjete za najbolje razdvajanje s obzirom na trajanje gradijenta (t_G) i temperaturu kolone. Iz rezultata prikazanih na **Slikama 28 i 29**, te **Tablici 17** vidljivo je izvrsno slaganje *in silico* i eksperimentalno dobivenih rezultata što ukazuje na primjenjivost *in silico* metode u predviđanju robusnog radnog područja metoda.

4.1.4. Validacija UHPLC-DAD metode za kvantitativno određivanje pimavanserina i onečišćenja

Razvijena UHPLC-DAD metoda za kvantifikaciju pimavanserina i srodnih procesnih onečišćenja validirana je u skladu s ICH smjernicama opisanim u poglavlju ICH Q2 (R1) [29]. Validacijom su potvrđena sljedeća značajke metode: specifičnost, linearnost, granice kvantifikacije i detekcije, točnost, preciznost i stabilnosti otopina. Ključni parametar validacije metode su studije ispitivanja robusnosti analitičke metode. Studije robusnosti metode su provedene unutar definiranog radnog područja metode (MODR), a eksperimentalni rezultati su uspoređeni s *in silico* rezultatima ispitivanja robusnosti. Ispitivanje robusnosti ima ključnu ulogu u uspostavi robusne strategije kontrole analitičke metode.

4.1.4.1. Specifičnost

Specifičnost razvijene UHPLC metode za pimavanserin ljekovitu djelatnu tvar određena je u prisutnosti njegova četiri procesna onečišćenja. Specifičnost metode potvrđena je s obzirom da je dobiveno potpuno razlučivanje svih pikova analita, bez interferencija na mjestu eluiranja analita. Provedena studija prisilne razgradnje, također potvrđuje specifičnost razvijene UHPLC metode. Tijekom ispitivanja prisilne razgradnje pimavanserina svi razgradni produkti pimavanserina međusobno su dobro odvojeni s prihvatljivim kromatografskim razlučivanjem, postignuta je i zadovoljavajuća separacija između pika pimavanserina i razgradnih produkata, a ujedno je potvrđena i spektralna čistoća pika glavne komponente.

4.1.4.2. Linearnost

Linearnost metode za određivanje pimavanserina i njegovih onečišćenja ispitana je u koncentracijskom rasponu 0,1–20,0 $\mu\text{g/mL}$. Ispitana je i linearnost odziva DAD detektora za pimavanserin u koncentracijskom rasponu 0,5–1,2 mg/mL (što odgovara koncentracijskom rasponu od 50–120 % nazivne koncentracije ispitivanog uzorka pimavanserina (1 mg/mL)).

Dobivena je značajna korelacija između površine pikova i odgovarajućih koncentracija analita s koeficijentima determinacije u rasponu od 0,9998 do 1,0000 za sve ispitivane analite (**Tablica 18**).

Tablica 18: Rezultati ispitivanja linearnosti UHPLC-DAD metode za određivanje pimavanserina i procesnih onečišćenja

Analit	Linearno područje	Koeficijent determinacije (R^2)	Odsječak (a)	Nagib (b)	RRT ^a	RRF ^b
Imp A	0,1–20,0 µg/mL	0,9999	191,8	$6,7 \cdot 10^6$	0,84	1,0
Imp B	0,1–20,0 µg/mL	0,9999	189,5	$6,6 \cdot 10^6$	0,93	1,0
Imp C	0,1–20,0 µg/mL	0,9998	213,8	$5,6 \cdot 10^6$	0,96	0,9
PMV	0,5–1,2 mg/mL	0,9999	-11175,2	$6,6 \cdot 10^6$	1,00	1,0
Imp D	0,1–20,0 µg/mL	1,0000	44,54	$1,6 \cdot 10^6$	1,32	2,5

^a RRT – relativno vrijeme zadržavanja u odnosu na glavnu komponentu (engl. *relative retention time*)

^b RRF – relativni odziv (eng. *relative response factor*)

4.1.4.3. Granice kvantifikacije i detekcije

Granica detekcije (LOD) je najmanja količina analita u uzorku koju je metodom moguće detektirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti. Dok je granica kvantifikacije (LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću preciznost i točnost [29].

Postavljeni kriterij odnosa signala i šuma (engl. *signal to noise ratio, S/N*) za granicu kvantifikacije je ≥ 10 , a za granicu detekcije ≥ 3 . Granice detekcije procesnih onečišćenja pimavanserin djelatne tvari su jednake i iznose 0,05 µg/mL, a granice kvantifikacije su jednake i iznose 0,1 µg/mL.

Za provjeru LOQ vrijednosti provedeno je ispitivanje preciznosti na koncentracijskim razinama 0,1 µg/mL. RSD (%) vrijednosti provedenih ispitivanja preciznosti bile su manje od 5,0 % za sva onečišćenja (u rasponu od 1,1 %, za onečišćenje D, do 4,2 %, za onečišćenje C).

Rezultati provedenih ispitivanja LOD i LOQ vrijednosti prikazane su tablično (**Tablica 19**).

Tablica 19: Rezultati ispitivanja granica detekcije i kvantifikacije

Analit	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	S/N (na LOQ)	RSD % (na LOQ)
Imp A	0,05	0,1	12,2	2,3
Imp B	0,05	0,1	13,1	3,6
Imp C	0,05	0,1	11,2	4,2
Imp D	0,05	0,1	29,8	1,1

4.1.4.4. Točnost i iskorištenje

Točnost (engl. *accuracy*) predstavlja stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Točnost razvijene analitičke metode potvrđena je za sva procesna onečišćenja pimavanserina. Ostvarena su iskorištenja (engl. *recovery*) u rasponu 95,3–102,7 % za koncentracije u rasponu 0,1–20,0 $\mu\text{g/mL}$. Rezultati ispitivanja prikazani su tablično (**Tablica 20**) kao srednja vrijednost iskorištenja.

Tablica 20: Rezultati ispitivanja točnosti

Analit	Koncentracijska razina	Iskorištenje (%)	RSD (%)
Imp A	0,1 $\mu\text{g/mL}$ (LOQ)	102,1	1,8
	1,0 $\mu\text{g/mL}$	95,3	0,2
	20,0 $\mu\text{g/mL}$	102,2	0,2
Imp B	0,1 $\mu\text{g/mL}$ (LOQ)	98,0	0,8
	1,0 $\mu\text{g/mL}$	97,8	0,2
	20,0 $\mu\text{g/mL}$	102,6	0,3
Imp C	0,1 $\mu\text{g/mL}$ (LOQ)	96,3	1,4
	1,0 $\mu\text{g/mL}$	97,6	1,1
	20,0 $\mu\text{g/mL}$	102,7	0,3
Imp D	0,1 $\mu\text{g/mL}$ (LOQ)	105,5	2,1
	1,0 $\mu\text{g/mL}$	98,0	0,6
	20,0 $\mu\text{g/mL}$	97,4	0,1

4.1.4.5. Preciznost

Preciznost metode potvrđena je analizom zasebno pripremljenih šest otopina uzorka pimavanserina koncentracije 1,0 mg/mL nacijspljenih sa standardima onečišćenja koncentracije 1 µg/mL. Dobivene vrijednosti relativnog standardnog odstupanja (RSD) za sva onečišćenja su unutar 2,0 %. Rezultati za srednju preciznost, iskazani kao RSD (%), su unutar 5,0 % za sve pikove poznatih onečišćenja i pimavanserin.

4.1.4.6. Stabilnost otopina

Stabilnost otopine uzorka ljekovite djelatne tvari pimavanserina (nazivne koncentracije 1 mg/mL) i otopine referentnog standarda ljekovite djelatne tvari pimavanserina ispitana je čuvanjem otopina u dobro zatvorenim volumetrijskim tikvicama na sobnoj temperaturi tijekom sedam dana. Pohranjene otopine uzorka i referentnog standarda su potom analizirane, a izračunati omjeri između inicijalnih površina pikova i površina pikova dobivenih injektiranjem istih otopina nakon sedam dana bili su unutra 0,97–1,03, što ukazuje na prihvatljivu stabilnost otopina bez vidljive značajne degradacije.

4.1.5. Procjena robusnosti metode i uspostava strategije kontrole analitičke metode

Robusnost ili otpornost metode je svojstvo analitičke metode da uz male promjene uvjeta ispitivanja daje rezultate prihvatljive pouzdanosti i ostane prikladna za namijenjenu upotrebu.

Strategija kontrole analitičke metode definira se na temelju podataka prikupljenih tijekom razvoja i optimizacije metode, ispitivanja robusnosti metode i validacije analitičke metode. Kritični parametri analitičke metode (CMP) koji su tijekom procjene rizika identificirani kao oni koje je potrebno kontrolirati te parametri za koje je tijekom studija robusnosti dokazano da imaju značajan utjecaj na rezultate uzimaju se u obzir prilikom postavljanja robusne strategije kontrole analitičke metode.

4.1.5.1. Studija robusnosti metode unutar definiranog radnog područja metode (MODR)

Nakon razvoja metode i definiranja MODR područja analitičke metode, provedeno je ispitivanje robusnosti kako bi se ispitalo daje li metoda, uz određene promjene parametara, odgovarajuće odgovore i rezultate koji zadovoljavaju definirane ATP zahtjeve.

Dizajnom eksperimenta planiraju se i obrađuju kritični parametri metode za kontinuirane varijable za koje se zahtjev prikazuje numerički (pH-vrijednost, temperatura kromatografske kolone, brzina protoka pokretne faze) te se procjenjuje njihov utjecaj na kritične značajke analitičke metode (CMA).

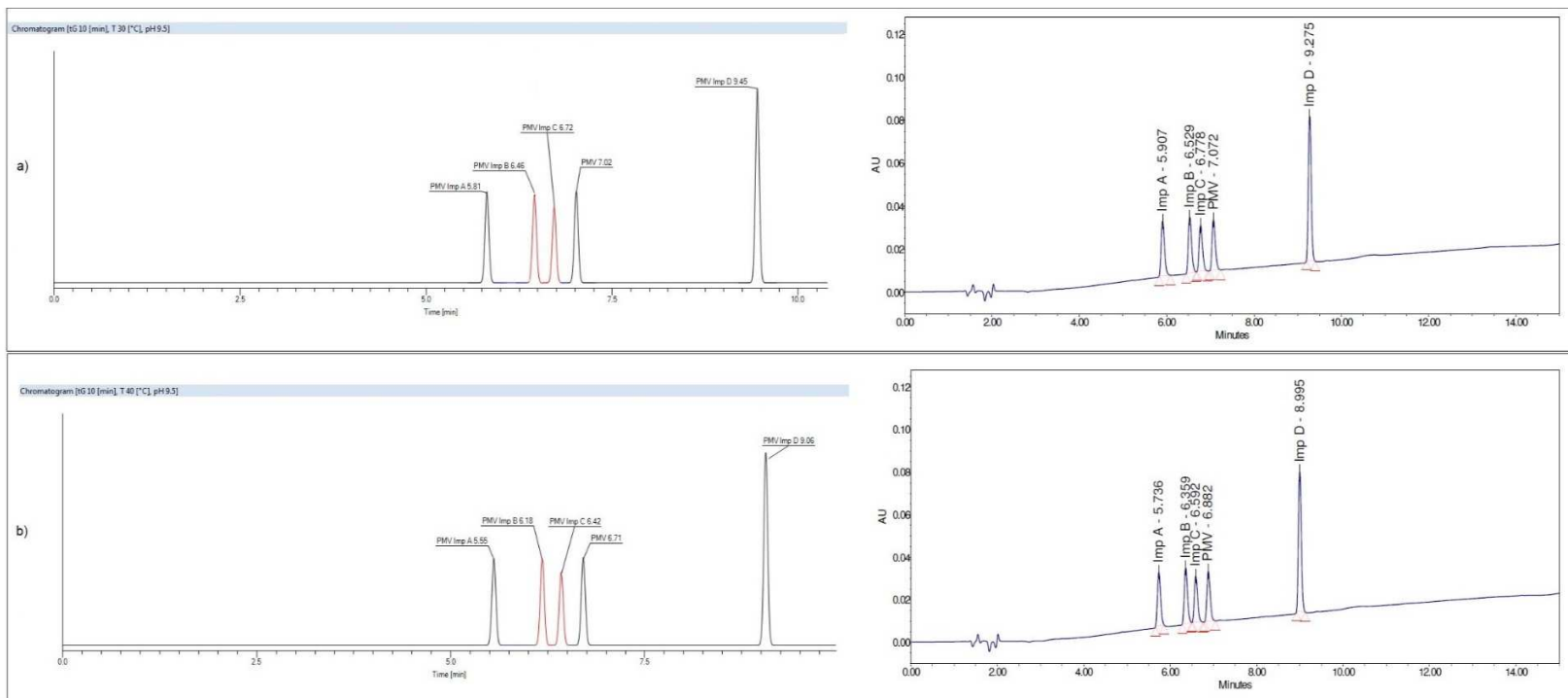
Kako bi se ispitala robusnost razvijene metode, promijenjeni su eksperimentalni uvjeti provedbe metode i praćen je utjecaj tih promjena na CMA vrijednosti. Tijekom ispitivanja robusnosti, istražen je utjecaj malih promjena kritičnih parametara metode (CMP) – promjena temperature kromatografske kolone, pH-vrijednosti komponente A pokretne faze, kao i utjecaj male promijene brzine protoka pokretne faze – na CMA vrijednosti.

Brzina protoka promijenjena je za 0,05 mL/min (s 0,2 na 0,15 i 0,25 mL/min). Utjecaj promijene temperature kromatografske kolone na CMA vrijednosti ispitivan je pri 30 i 40 °C (optimalna temperatura je 35 °C).

Ispitane su i male promijene u pH-vrijednostima vodene komponente pokretne faze (A). pH-vrijednost promijenjena je za 0,5 (s 9,5 na 9,0 i 10,0). Rezultati provedene studije robusnosti prikazani su u **Tablici 21** i na **Slici 30**.

Tablica 21: Studija robusnosti – ispitivanje utjecaja malih promjena u brzini protoka pokretne faze (0,15 i 0,20 mL/min), temperature kromatografske kolone ($T_k = 30$ i 40 °C) i pH-vrijednosti (9,0 i 10,0).

Broj eksperimenta	Protok (mL/min)	T_k (°C)	pH	$k_{Imp A}$	$t_{Imp D}$ (min)	R_s (Imp B–Imp C)	Analit	T_f	N
Optimalni radni uvjeti	0,20	35	9,5	1,90	9,127	1,73	Imp A	1,1	27333
							Imp B	1,1	35944
							Imp C	1,1	36196
							PMV	1,2	38824
							Imp D	1,1	86898
1	0,15	35	9,5	2,69	10,966	1,70	Imp A	1,2	33317
							Imp B	1,2	42069
							Imp C	1,2	44007
							PMV	1,3	48526
							Imp D	1,2	100931
2	0,25	35	9,5	1,41	7,937	1,61	Imp A	1,2	20256
							Imp B	1,2	25174
							Imp C	1,2	26598
							PMV	1,2	29633
							Imp D	1,2	65348
3	0,20	30	9,5	1,95	9,275	1,77	Imp A	1,3	27070
							Imp B	1,2	34146
							Imp C	1,3	35891
							PMV	1,3	40236
							Imp D	1,2	90975
4	0,20	40	9,5	1,87	8,995	1,69	Imp A	1,2	27245
							Imp B	1,2	33571
							Imp C	1,3	34896
							PMV	1,2	38802
							Imp D	1,2	81681
5	0,20	35	9,0	1,89	9,127	1,73	Imp A	1,2	27351
							Imp B	1,2	35150
							Imp C	1,2	40809
							PMV	1,2	38802
							Imp D	1,1	90575
6	0,20	35	10,0	1,89	9,124	1,71	Imp A	1,2	27306
							Imp B	1,2	34575
							Imp C	1,2	35631
							PMV	1,2	40688
							Imp D	1,1	90112



Slika 30. Studija robusnosti – *in silico* i eksperimentalni kromatogrami pimavanserina i srodnih onečišćenja pri temperaturi kromatografske kolone 30 °C (a) i 40 °C (b) (pH vodene komponente pokretne faze (A) pH 9,5, protok 0,2 mL/min, vrijeme trajanja linearnog gradijenta $t_G= 10$ min)

Na temelju rezultata provedene studije robusnosti analitičke metode (**Tablica 21** i **Slika 30**) zaključeno je da je metoda robusna s obzirom da su pri svim namjernim varijacijama kromatografskih uvjeta (brzina protoka, pH-vrijednost i temperatura kromatografske kolone) zadovoljeni definirani kriteriji: faktor kapaciteta onečišćenja A ($k_{\text{Imp A}}$) bio je veći od 1,0, onečišćenje D je eluiralo unutar 10 min trajanja linearnog gradijenta ($t_{\text{Imp D}} < 10,0$ min), faktor razlučivanja kritičnog para analita (onečišćenje B i C) bio je veći od 1,5, zadovoljen je i kriterij simetričnosti svih pikova analita ($T_f < 1,5$), a broj teorijskih tavana za sve pikove analita bio je veći od 20000 (**Tablica 21**).

Provedeno ispitivanje je pokazalo prihvatljivu robusnost razvijene metode unutar *in silico* definiranog radnog područja (MODR).

4.1.5.2. Strategija kontrole analitičke metode

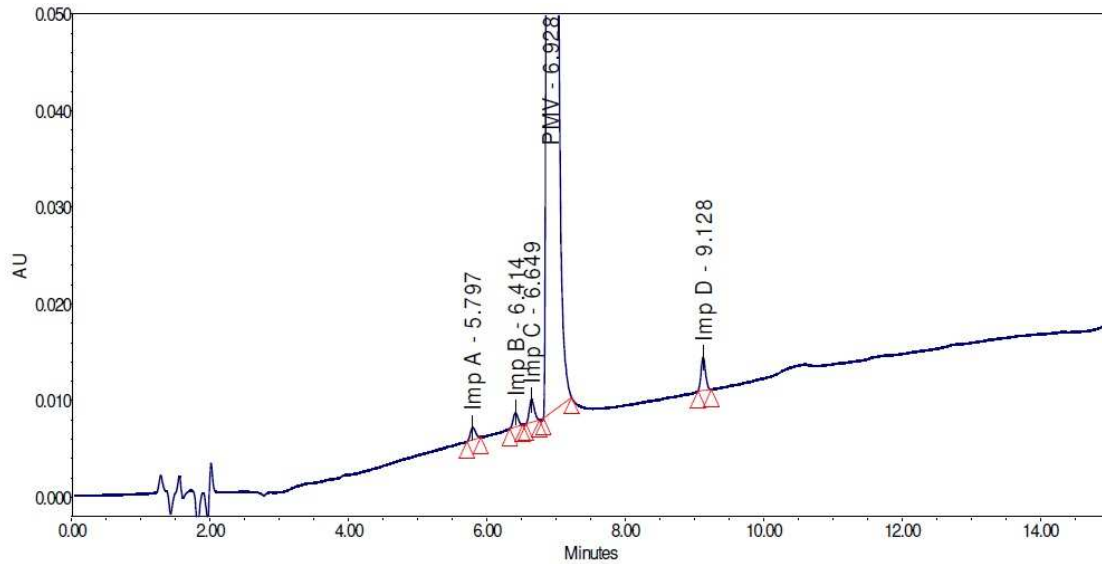
Strategija kontrole predložena je na temelju procjene rizika, definiranih vrijednosti CMA, rezultata provedene validacije analitičke metode i ispitivanja robusnosti. Stoga su kao kriteriji prikladnosti kromatografskog sustava (engl. *system suitability*) postavljeni uvjeti navedeni u **Tablici 22**.

Tablica 22: Kriteriji prikladnosti sustava

Kritične značajke metode (CMA)	Kriteriji prikladnosti sustava
$k_{\text{Imp A}}$	$1,4 < k_{\text{Imp A}} < 2,7$
$t_{\text{Imp D}}$	$8,9 \text{ min} < t_{\text{Imp D}} < 9,3 \text{ min}$
R_s (Imp B – Imp C)	$1,6 < R_s < 1,8$
T_f	$1,1 < T_f < 1,3$
N	$20000 < N < 34000$ (Imp A)
	$25000 < N < 43000$ (Imp B)
	$26000 < N < 44000$ (Imp C)
	$29000 < N < 49000$ (PMV)
	$65000 < N < 110000$ (Imp D)

Za procjenu prikladnosti sustava korištena je otopina uzorka pimavanserina koncentracije 1,0 mg/mL nacijepljena sa standardima onečišćenja koncentracije 1 µg/mL.

Analizom dobivenog kromatograma (**Slika 31**) može se potvrditi da su procesna onečišćenja dobro razdvojena s minimalnim razlučivanjem između onečišćenja B i C od 1,73, da je faktor kapaciteta onečišćenja A jednak 1,89, a vrijeme zadržavanja onečišćenja D je 9,128 min. Faktor simetrije pika varira od 1,1 do 1,2 za sve pikove analita, a broj teorijskih odsječaka za sve analite je iznad 20000.



Slika 31. Eksperimentalni kromatogram otopine uzorka pimavanserina (1 mg/mL) nacijepljen sa standardima onečišćenja (1 µg/mL) za procjenu prikladnosti kromatografskog sustava

4.2. Studije prisilne razgradnje lijekovite djelatne tvari pimavanserina

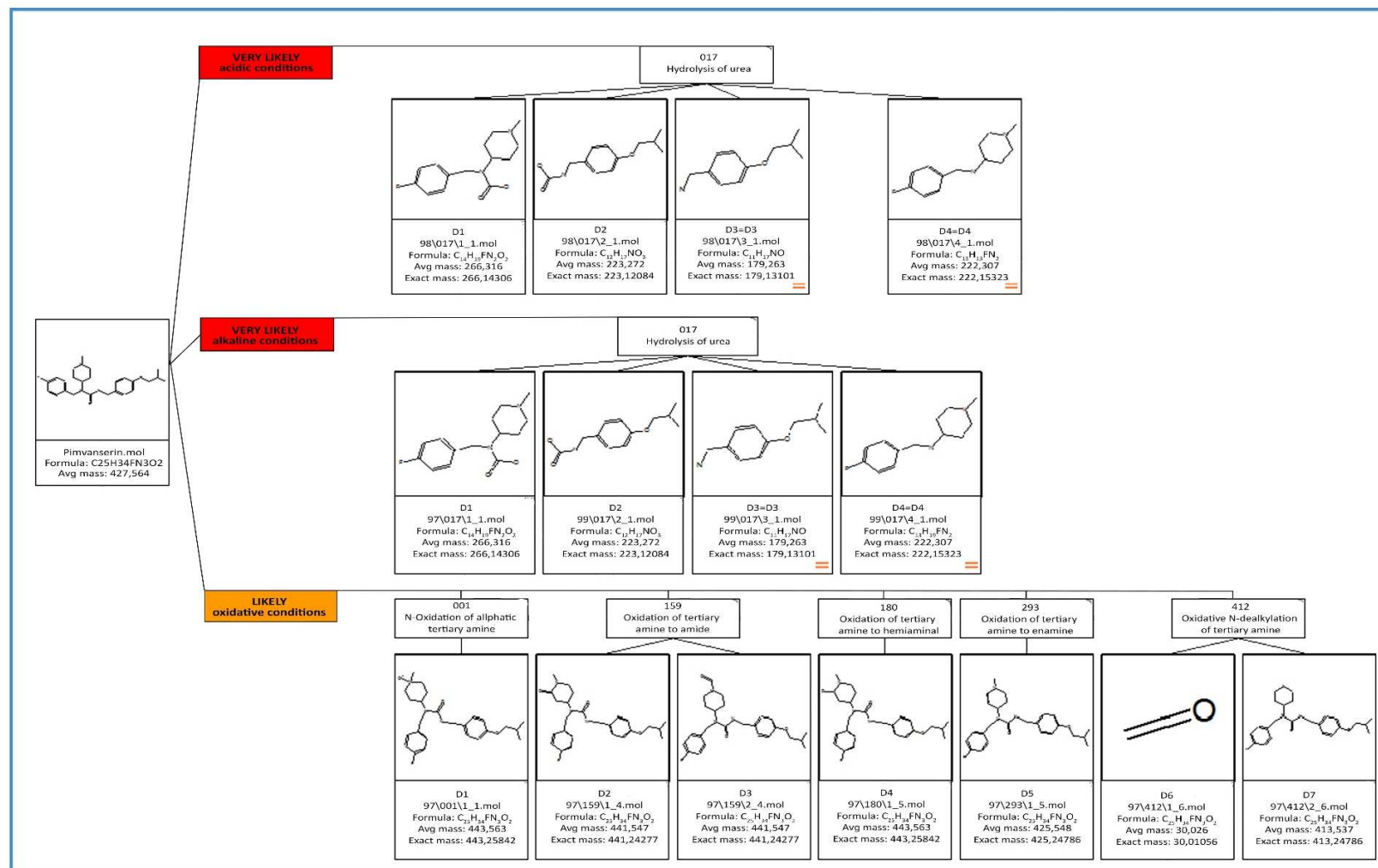
Za potrebe studija prisilne razgradnje pimavanserin je izložen hidrolizi (u kiselim i bazičnim uvjetima), oksidaciji, fotolizi i visokoj temperaturi.

Prije provedbe eksperimenta prisilne razgradnje molekule pimavanserina, a kako bi se dobio uvid u moguće puteve razgradnje lijekovite djelatne tvari, potencijalna razgradnja provjerena je komercijalnim računalnim programom Zeneth[®]. Računalni program može predvidjeti najvjerojatnije transformacije, reakcije pregradnje i predvidjeti moguće puteve razgradnje organskog spoja [96]. *In silico* rezultati razgradnje pimavanserin lijekovite djelatne tvari pokazuju da je molekula pimavanserina podložna razgradnji djelovanjem kisele i bazične hidrolize uree i *N*-oksidaciji alifatske tercijarne amino-skupine (**Slika 32; Prilog P1**).

Rezultati eksperimentalno provedenih ispitivanja prisilne razgradnje pokazali su da je pimavanserin lijekovita djelatna tvar stabilna u uvjetima termičke i fotolitičke razgradnje čime su potvrđeni *in silico* rezultati. Grijanjem otopine pimavanserina na 80 °C tijekom jednog sata nisu uočeni razgradni produkti što upućuje da je molekula stabilna u uvjetima povišene temperature. *In silico* predviđena fotolitička stabilnost molekule pimavanserina potvrđena je nakon izlaganja djelatne tvari svjetlu u Suntest XLS+ uređaju.

U kiselim (1 M HCl, 15 h na 25 °C) i bazičnim (1 M NaOH, 15 h na 25 °C) uvjetima prisilne razgradnje pimavanserina detektiran je razgradni produkt označen kao DP-1 (RRT 0,37).

Dok je prilikom izloženosti oksidativnim uvjetima (30 % v/v H₂O₂, 10 min na sobnoj temperaturi) došlo do značajnije razgradnje molekule pimavanserina od oko 12 % i nastanka produkta razgradnje DP-2 (RRT 0,57). Budući da je kisik-kisik slaba veza, preporučeno je ispitivanje oksidacije potaknute peroksidom izvoditi pri sobnim temperaturama. Pri višim temperaturama dolazi do cijepanja kisik-kisik veze i nastanka hidroksi-radikala koji mogu jako oksidirati većinu djelatnih tvari uzrokujući nepredviđenu i nerealnu razgradnju. Stoga je ispitivanje oksidacijske razgradnje pimavanserina provedeno pri sobnoj temperaturu (< 30 °C, u mraku).

Slika 32. Zeneth® *in silico* predikcija puteva razgradnje pimavanserina (Prilog P1)

Rezultati prisilne razgradnje pimavanserina prikazani su u **Tablici 23** kao i bilanca mase. Prema definiciji opisanoj u ICH smjernicama Q2 (R1), bilanca mase je postupak zbrajanja dobivenog sadržaja i količine razgradnih produkata (% sadržaja API-ja + % onečišćenja + % razgradnih produkata). Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 23**, zaključeno je da količina nastalih razgradnih produkata odgovara smanjenju sadržaja ljekovite tvari.

Za usporedbu rezultata, analiziran je i netretirani uzorak pimavanserin ljekovite djelatne tvari koji je sadržavao 0,06 % onečišćenja A i 0,09 % onečišćenja B.

Tablica 23: Rezultati studije prisilne razgradnje pimavanserina

Uvjet razgradnje	Razgradni produkti	Udio onečišćenja (%)*	Sadržaj (%)	Bilanca mase (%)
Netretirani	-	0,06 % Imp A 0,09 % Imp B	99,8	100,0
Kisela hidroliza	DP-1 (RRT 0,37)	0,06 % Imp A 0,10 % Imp B 0,15 % DP-1	99,6	99,9
Bazična hidroliza	DP-1 (RRT 0,37)	0,07 % Imp A 0,10 % Imp B 0,16 % DP-1	99,6	99,9
Oksidativna razgradnja	DP-2 (RRT 0,57)	0,06 % Imp A 0,10 % Imp B 12,02 % DP-2	86,1	98,3
Fotolitička razgradnja				
(a) pimavanserin kao čvrsta tvar	-	0,07 % Imp A 0,10 % Imp B	99,7	99,9
(b) pimavanserin u otopini	-	0,08 % Imp A 0,10 % Imp B	99,6	99,9
Termička razgradnja (80 °C)	-	0,06 % Imp A 0,09 % Imp B	99,7	99,9

Također, provjerena je spektralna čistoća pika prilikom studije prisilne razgradnje koristeći DAD detektor. Očitane su vrijednosti čistoće kuta (engl. *purity angle*) i poklapanja kuta (engl. *match angle*) i uspoređene su s odgovarajućim kriterijima (engl. *purity treshold*, *match treshold*). Vrijednost *purity angle* i *purity treshold* uzoraka prisilne razgradnje direktno govore o homogenosti samog pika, dok *match angle* i *match treshold* služe za potvrdu identifikacije (**Tablica 24**).

Budući da je *purity angle* vrijednost manja od *purity treshold*, pik pimavanserina i njegovih onečišćenja mogu se smatrati spektralno čistim.

Tablica 24: Studija prisilne razgradnje pimavanserina – spektralna čistoća pika

Uvjeti razgradnje	<i>Purity Angle</i>	<i>Match Angle</i>	<i>Purity Treshold</i>	<i>Match Treshold</i>
Pimavanserin (bez razgradnje)	0,035	0,005	0,266	1,022
Kisela hidroliza	0,046	0,019	0,050	0,035
Bazična hidroliza	0,032	0,005	0,042	0,032
Oksidativna razgradnja	0,041	0,010	0,054	0,037

4.2.1. Kinetika oksidativne razgradnje pimavanserin lijekovite djelatne tvari

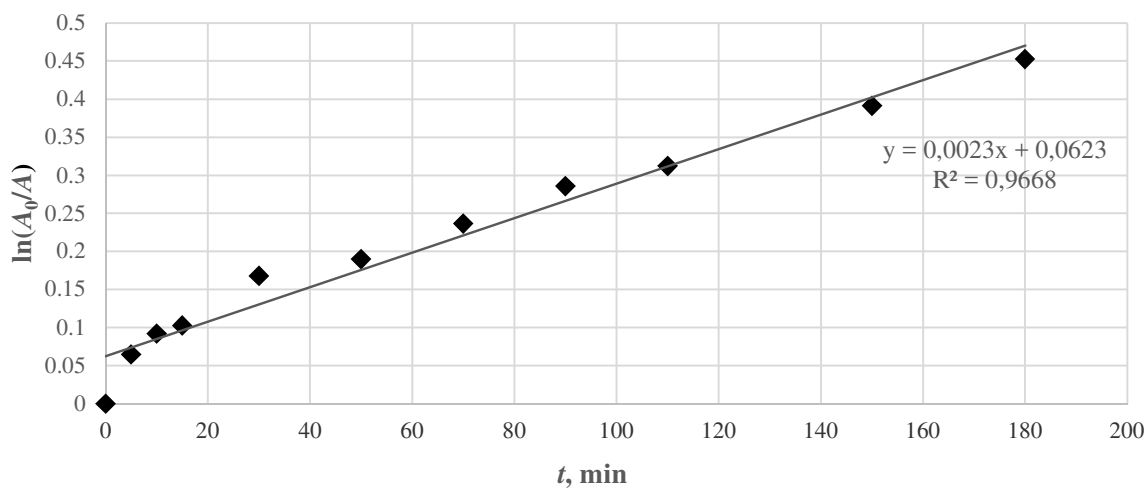
Zbog značajne razgradnje pimavanserina koja je nastala u jakim oksidacijskim uvjetima, ali i iz razloga što su oksidacijske reakcije jedan od najčešćih mehanizama razgradnje lijekovite tvari, ispitana je i kinetika oksidativne razgradnje.

Rezultati su pokazali da razgradnja pimavanserina prati kinetiku reakcije prvog reda opisanu jednadžbom (30), koja pretpostavlja smanjenje koncentracije ispitivanog spoja s vremenom:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (30)$$

gdje je A_0 površina pika pimavanserina u nultom vremenu, A je površina pika pimavanserina u određenom vremenu (t), a k (min^{-1}) je konstanta brzine razgradnje. Vremena poluraspada ($t_{1/2}$) izračunata su prema izrazu:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (31)$$



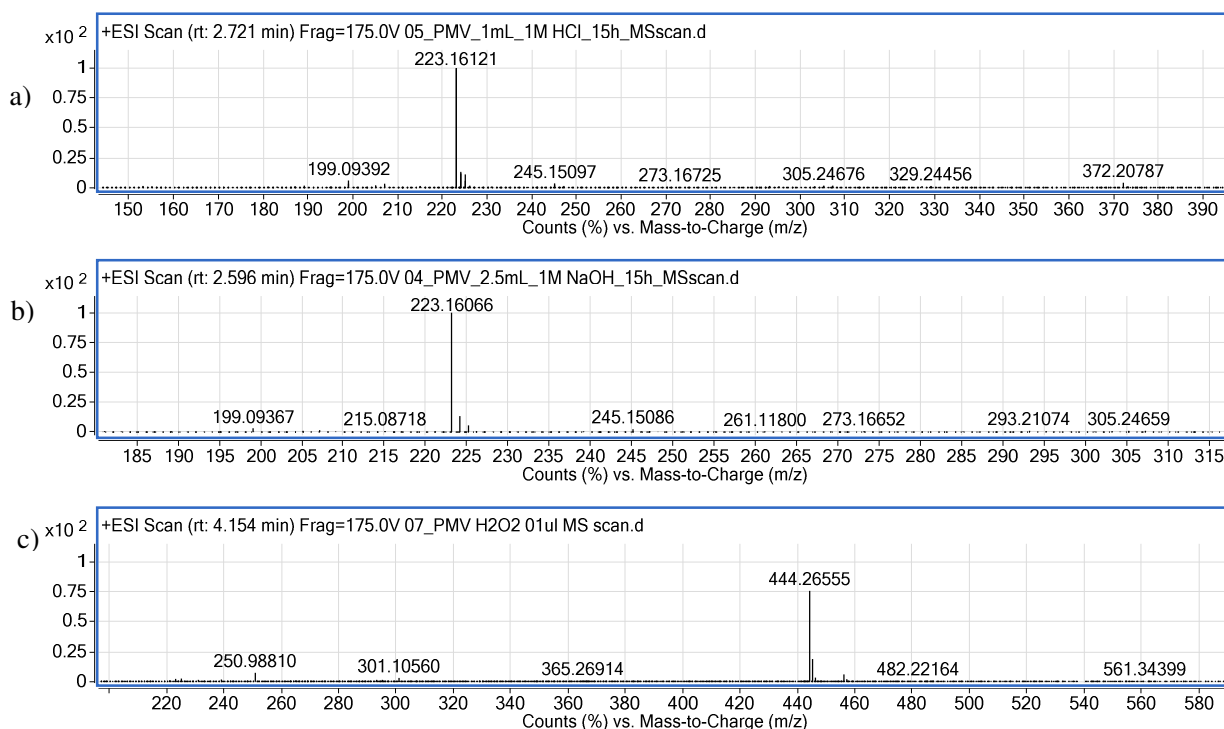
Slika 33. Kinetika oksidativne razgradnje pimavanserina

Koristeći jednadžbe (30) i (31) moguće je izračunati konstantu brzine oksidativnog raspada pimavanserina, koja iznosi $k = 0,0023 \text{ min}^{-1}$, što za posljedicu ima iznimno kratko vrijeme oksidativnog poluraspada od svega 301,4 min. U oksidativnim uvjetima, u periodu od pet sati, dolazi do poluraspada pimavanserin djelatne tvari.

Analizom tretirane otopine pimavanserina nakon 24 h utvrđena je potpuna razgradnja molekule pimavanserina. Glavni razgradni produkt pimavanserin djelatne tvari je DP-2 (RRT 0,57).

4.2.2. Identifikacija i strukturna karakterizacija razgradnih produkata

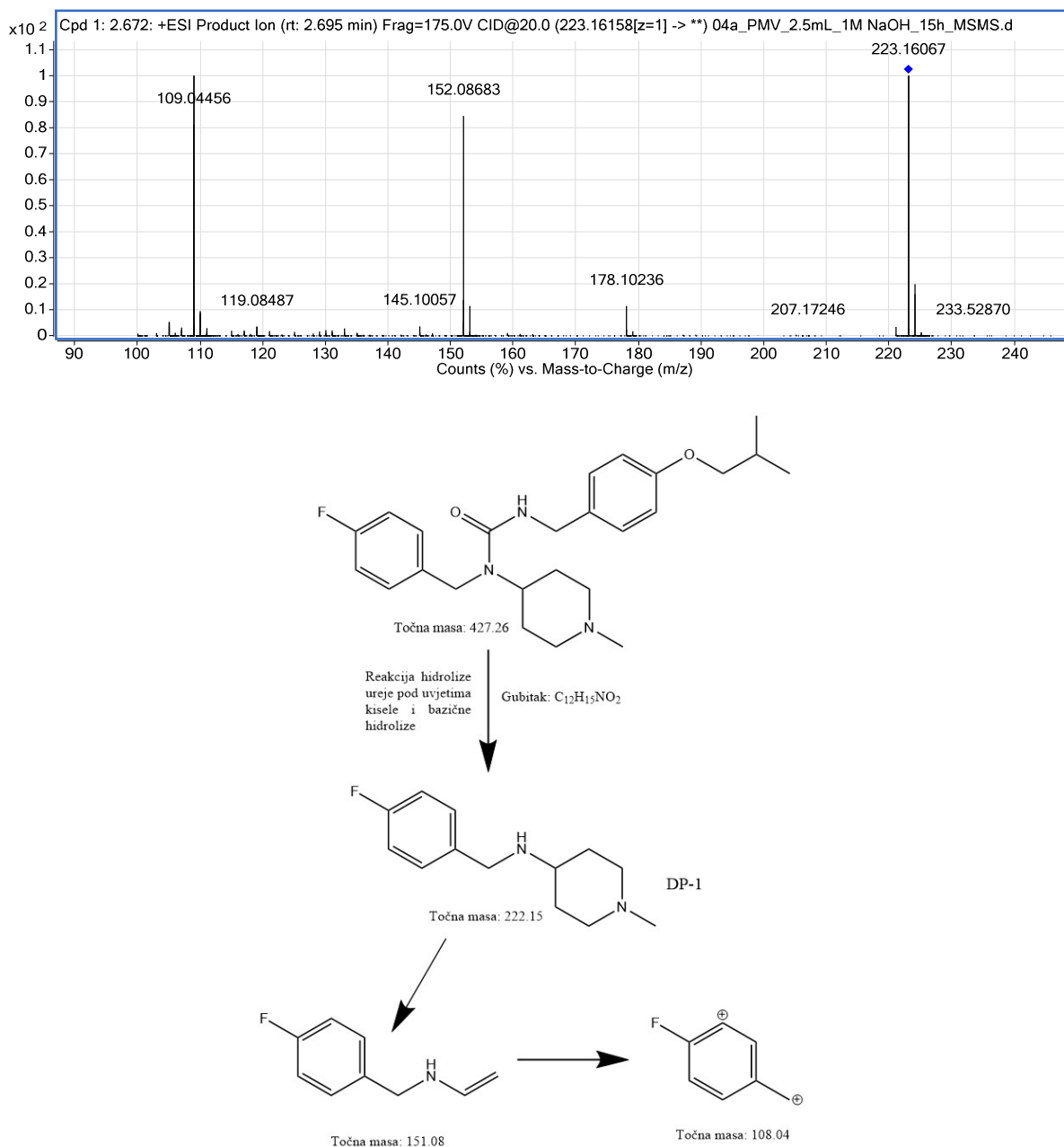
Produkti razgradnje okarakterizirani su i strukturno razjašnjeni pomoću UHPLC-MS analize. Analizom dobivenih spektara masa (Slika 34) utvrđeno je da su potencijalni produkti razgradnje DP-1 odnosno *N*-(4-fluorbenzil)-1-metilpiperidin-4-amin (aminsko onečišćenje) i DP-2 odnosno 4-(1-(4-fluorbenzil)-3-(4-izobutoksibenzil)ureido)piperidin-1-olat (*N*-oksid).



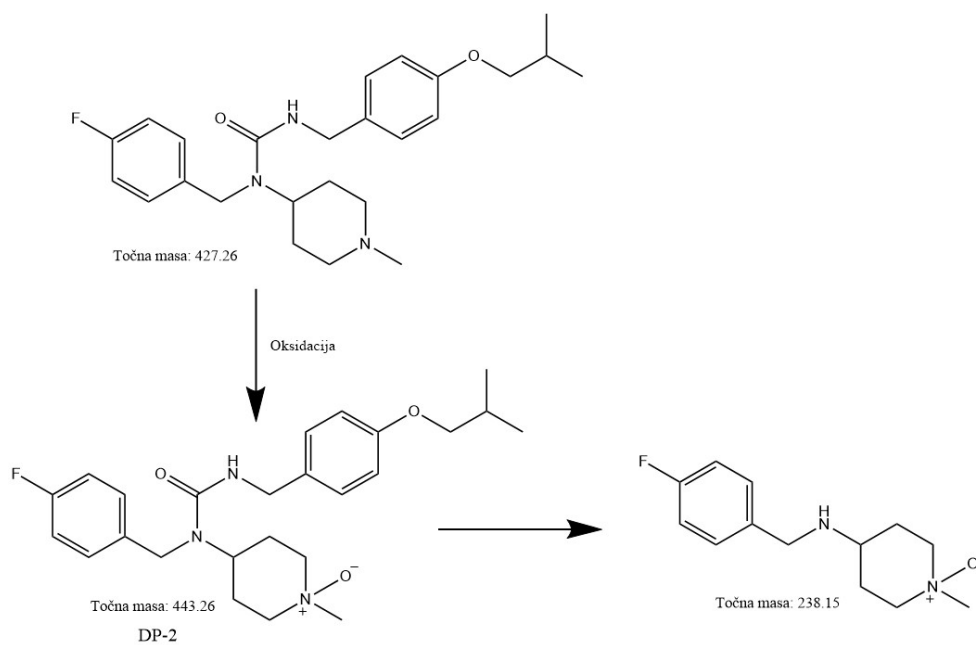
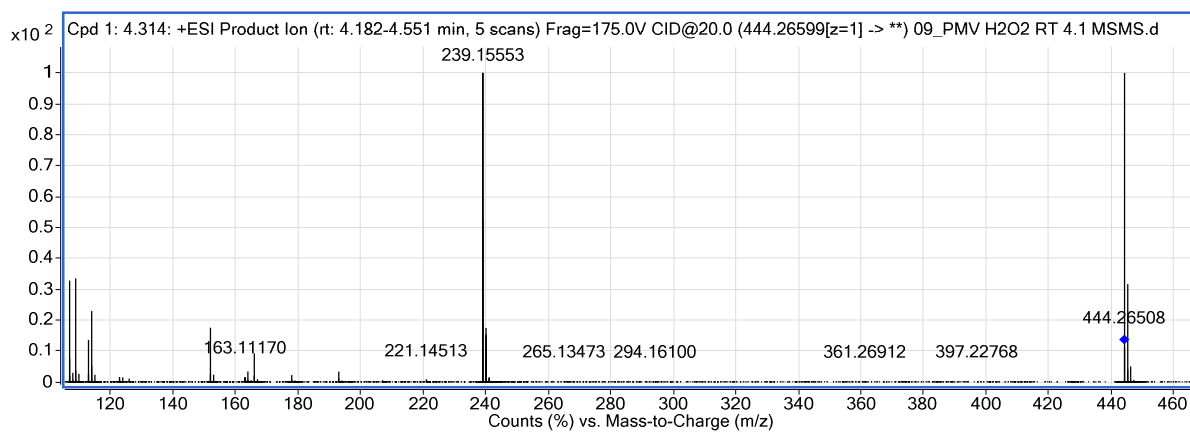
Slika 34. Spektar masa razgradnog produkta DP-1 (m/z 223,16 $[M+H]^+$, RRT 0,37) nastalog u uvjetima (a) kisele hidrolize (1 M HCl, 15 h) i (b) bazične hidrolize (1 M NaOH, 15 h), te razgradnog produkta DP-2 (m/z 444,26 $[M+H]^+$, RRT 0,57) nastalog u uvjetima (c) oksidativne razgradnje (30 % v/v H_2O_2).

Karakterizacija i identifikacija nastalih razgradnih produkata provedena je na temelju dobivenih MS i MS/MS spektara primjenom spektrometrije masa visoke razlučivosti (UHPLC-QTOF), kao i na temelju predviđenih puteva prisilne razgradnje dobivenih pomoću računalnog programa Zeneth[®], te su predloženi putevi razgradnje pimavanserina i strukture nastalih produkata razgradnje. Tijekom ispitivanja fragmentacijskih mehanizama razgradnih produkata, uočeno je da protonirani produkti DP-1 i DP-2 podliježu reakciji pregradnje tijekom disocijacija izazvanih srazom u uvjetima pozitivne ionizacije elektroraspršenjem.

Nakon prikupljanja MS/MS podataka i analize spektra, predloženi su putevi fragmentacije za DP-1 i DP-2 a koji su prikazani na **Slikama 35** i **36**. Predložene strukture detektiranih produkata razgradnje pimvanserina prikazane su u **Tablici 25**.

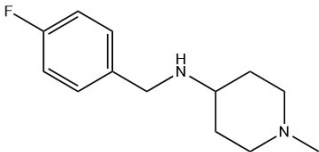
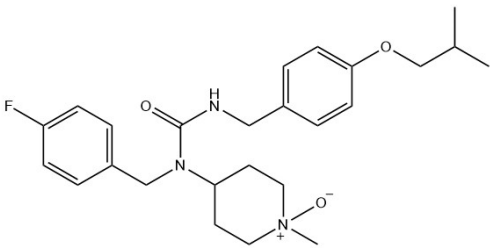


Slika 35. Fragmentacijski (MS/MS) spektar razgradnog produkta DP-1 dobiven primjenom 20 eV energije sraza (CID@20 eV) i predloženi put fragmentacije



Slika 36. Fragmentacijski (MS/MS) spektar razgradnog produkta DP-2 dobiven primjenom 20 eV energije sraza (CID@20 eV) i predloženi put fragmentacije

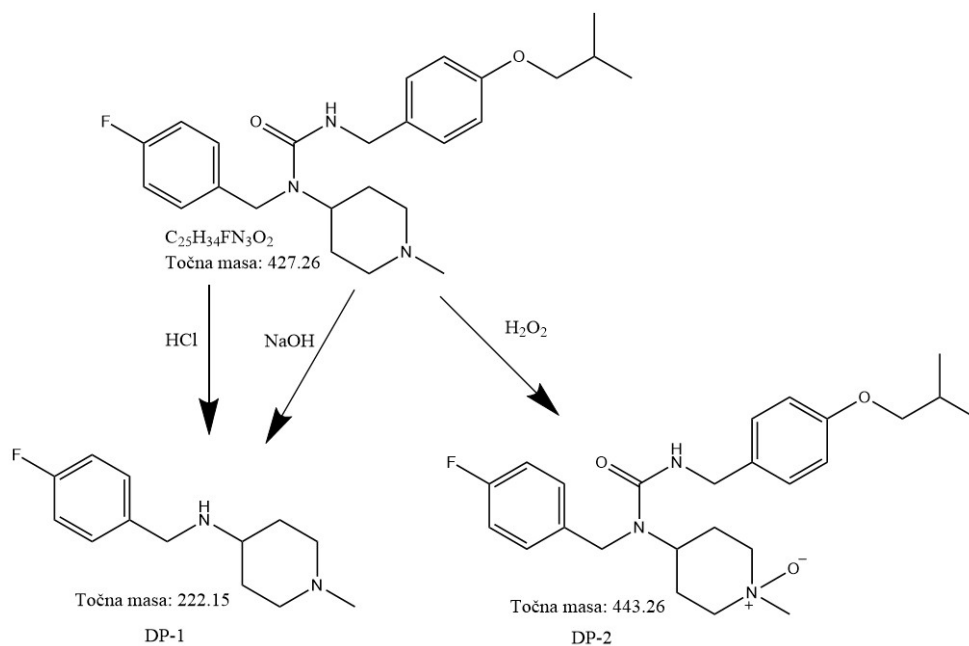
Tablica 25: Kemijske strukture detektiranih produkata razgradnje pimavanserina

Uvjeti razgradnje	Razgradni produkt	Strukturna formula	Molekulska formula, M_r
Kisela i bazična hidroliza	DP-1 (<i>N</i> -(4-fluorbenzil)-1-metilpiperidin-4-amin)		$C_{38}H_{53}F_2N_5O_3$ 222,30
Oksidacija	DP-2 (4-(1-(4-fluorbenzil)-3-(4-izobutoksibenzil)ureido)piperidin-1-olat; <i>N</i> -oksid)		$C_{25}H_{34}FN_3O_3$ 443,56

Rezultati eksperimentalnih testova prisilne razgradnje pokazuju da identificirani produkt razgradnje DP-1 (**Slika 35**, kiseli i bazični uvjeti) odgovara *in silico* predviđenom produktu razgradnje D4 (**Slika 32**), dok DP-2 (**Slika 36**, oksidacija) odgovara produktu D1 (**Slika 32**).

Ostali *in silico* predviđeni razgradni produkti nisu detektirani u provedenoj studiji prisilne razgradnje (**Prilog P1-P4**).

Najveći stupanj razgradnje primijećen je pri razgradnji u jakim oksidacijskim uvjetima. Predloženi put razgradnje pimavanserina pri kiseljoj, bazičnoj i oksidativnoj razgradnji prikazan je na **Slici 37**. Pretraživanjem literature utvrđeno je da spojevi DP-1 i DP-2 do sada nisu opisani kao produkti razgradnje pimavanserina.



Slika 37. Predloženi putevi razgradnje pimavanserina pri kiseljoj, bazičnoj i oksidativnoj razgradnji

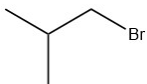
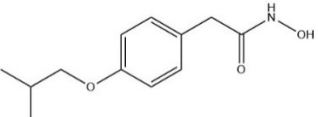
4.3. Metode za kvantifikaciju potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u pimavanserin lijekovitoj djelatnoj tvari

Prema ICH smjernicama opisanim u poglavlju M7 [10] dozvoljene količine potencijalno genotoksičnih onečišćenja mogu se izračunati prema izrazu formuli (1). Preporučena dnevna doza NUPLAZIDA sadrži 34 mg/dan pimavanserin slobodne baze [2], a što odgovara dnevnoj dozi od 40 mg/dan pimavanserin hemitartrata. Uzimajući u obzir dostupne podatke o dnevnim dozama, ali i podatke o TTC prihvatljivom unosu genotoksičnih onečišćenja koji iznosi 1,5 µg/dan kod lijekova za dugotrajno liječenje (**Tablica 4**), moguće je izračunati prihvatljivu granicu udjela genotoksičnih onečišćenja u pimavanserin djelatnoj tvari:

$$\text{Granični udio} = \frac{1,5 \mu\text{g/dan}}{0,04 \text{ g/dan}} = 37,5 \mu\text{g/g} = 37,5 \text{ ppm}$$

Na temelju provedene *in silico* evaluacije struktura korištenih polaznih materijala, intermedijera, reagensa i sporednih produkata postupka sinteze, izdvojene su dvije potencijalno genotoksične molekule koje su prikazane u **Tablici 26**.

Tablica 26: Potencijalna genotoksična onečišćenja

Oznaka	IUPAC naziv	Klasifikacija prema Müller-u [97]	Strukturna formula	Molekulska formula	Molekulska masa
IMP-1	Izobutil-bromid	Klasa II		C ₄ H ₉ Br	137,02 g/mol
IMP-2	<i>N</i> -hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamid	Klasa III		C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	223,27 g/mol

Tijekom ovog ispitivanja, za potrebe lakšeg označavanja, korištene su sljedeće oznake potencijalno genotoksičnih onečišćenja: IMP-1 za izobutil-bromid te IMP-2 za *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamid. Na temelju klasifikacije prema Mülleru [97], navedena onečišćenja pridružena su jednoj od pet klasa opisanih u poglavlju **2.3**.

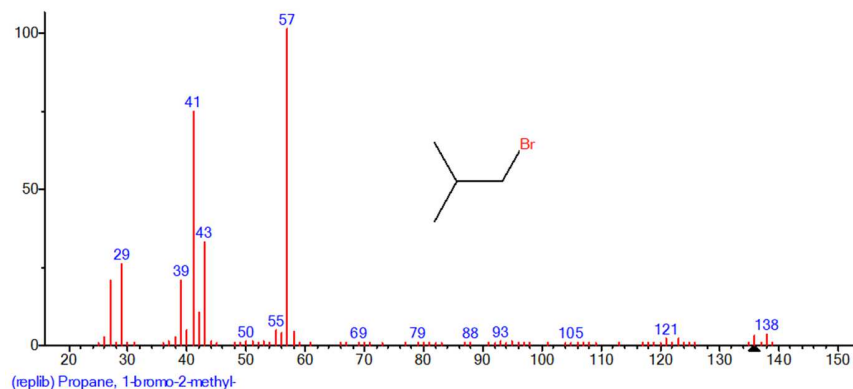
IMP-1 je potencijalni alkilirajući agens te je pridružen klasi II, kao poznati mutagen s nepoznatim kancerogenim potencijalom, dok je IMP-2 pridružen klasi III kao alarmantna struktura koja nije povezana sa strukturom pimavanserin lijekovite djelatne tvari. Stoga je preporučena kontrola ovih onečišćenja u lijekovitoj djelatnoj tvari na ili ispod izračunatog prihvatljivog udjela (37,5 ppm).

Na temelju podataka o potencijalnoj toksičnosti procesnih i razgradnih onečišćenja, razvijene su i validirane visokoosjetljive analitičke metode za njihovu kontrolu i kvantifikaciju na niskim koncentracijama, reda veličine ppm. Međutim, kako su tijekom ovog istraživanja korištene visokoosjetljive metode vezane sa spektrometrom masa koje omogućavaju određivanje niskih koncentracija analita, postavljena je još stroža granica specifikacije. Kao granica prihvatljivosti definiran je specifikacijski limit od 10 ppm u odnosu na nominalnu (radnu) koncentraciju lijekovite djelatne tvari. S obzirom na definiranu granicu specifikacije, kao granica kvantifikacije (LOQ) odabrana je koncentracija od 3 ppm u odnosu na nominalnu (radnu) koncentraciju djelatne tvari za svako pojedino potencijalno genotoksično onečišćenje.

4.3.1. Ispitivanje metode za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnog onečišćenja izobutil-bromida (IMP-1)

Prvi korak tijekom ispitivanja prikladne metode za kvantifikaciju izobutil-bromida u komercijalno proizvedenom pimavanserinu temeljio se na ispitivanju topljivosti uzorka pimavanserin hemitartrata (PMVhTA) u acetonitrilu, diklormetanu, 2-propanolu, acetonu, *n*-heksanu, *n*-heptanu, *N*-metil-2-pirolidonu (NMP), dimetil-sulfoksidu (DMSO) i metanolu. Ispitivanjem topljivosti utvrđena je netopljivost uzorka pimavanserina (koncentracije 20 mg/mL) u acetonitrilu, 2-propanolu, acetonu, *n*-heksanu i *n*-heptanu. Dodavanjem navedenih otapala otopina se zamuti, a sam uzorak se nakon kraćeg stajanja istaloži na dnu odmjerne tikvice. Uzorak koncentracije 20 mg/mL u potpunosti je otopljen dodavanjem diklormetana kao otapala.

Tijekom analize potencijalnog genotoksičnog onečišćenja IMP-1 na spektrometru masa praćen je ion 57,10 Da (Slika 38).

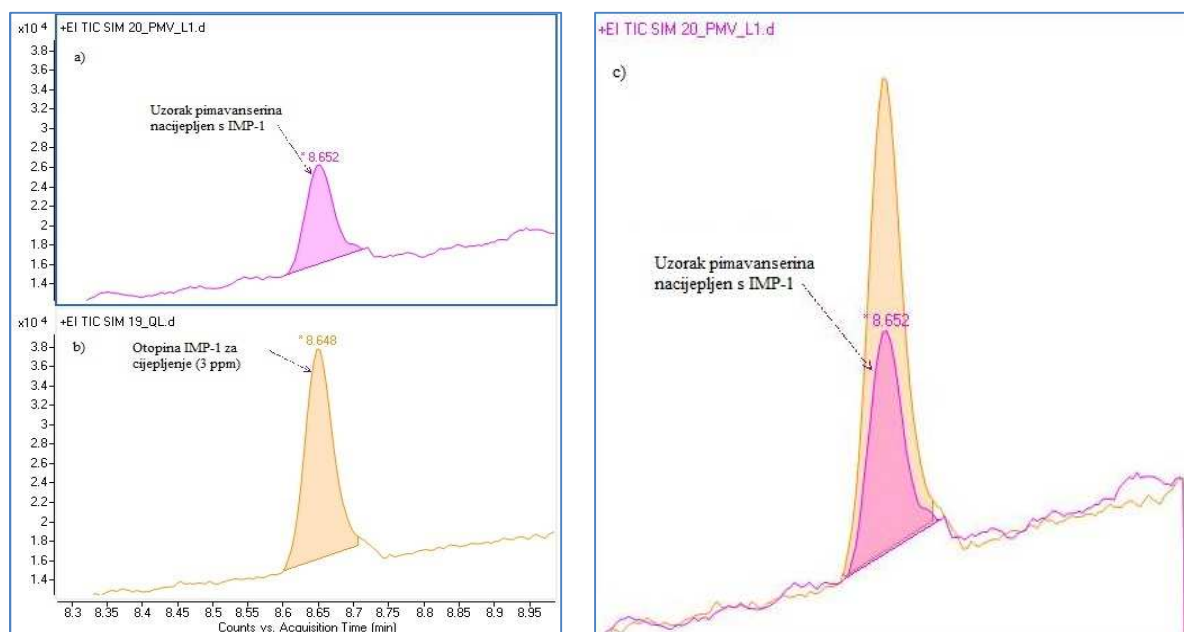


Slika 38. GC-MS spektar izobutil-bromida (IMP-1) (Preuzeto iz NIST[®] GC-MS spektralne baze podataka)

Također je ispitana mogućnost primjene metode uzorkovanja para iznad tekućina ili krutina (engl. *headspace sampling*, HS). Kod ovakvog statičkog *headspace* injektiranja uzorak se drži dovoljno dugo na određenoj temperaturi dok se ne uspostavi ravnoteža između plinovite i krute/tekuće faze, nakon čega slijedi analiza plinovite faze koja sadrži analit koji se pomoću plina nosioca uvodi u kolonu plinskog kromatografa [98]. Primijenjeni kromatografski uvjeti *headspace* analize prikazani su u **Prilogu P5**.

Analizom otopina uzoraka u DMSO naciepljenih sa standardom IMP-1 pri kuhanju u *headspace* pećnici ($T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$) nije dobiveno zadovoljavajuće iskorištenje (**Slika 39**).

Visoke temperature zagrijavanja naciepljenih uzoraka uzrokovale su loše iskorištenje primijenjene metode, a nije ostvarena niti zadovoljavajuća ponovljivost rezultata. Zbog izrazite oscilacije u veličini pikova analita (IMP-1) zaključeno je da ne dolazi do ekstrakcije IMP-1 u prisutnosti pimvanserina uzorka što je uzrokovalo narušenu ponovljivost i loše iskorištenje, te je primjena *headspace* metode odbačena.



Slika 39. Kromatogrami dobiveni GC-MS *headspace* analizom: a) kromatogram otopine naciepljenog uzorka pimavanserina s IMP-1; b) kromatogram otopine standarda IMP-1 i c) preklopljeni kromatogrami

Kao pogodna metoda odabrana je metoda direktnog injektiranja, uz *split* način rada (*split ratio* 10:1) zbog visoke koncentracije uzorka. Ovim načinom injektiranja unosi se samo jedan dio uzorka (0,5–5 %), dok se ostatak ispušta. Kao pogodno otapalo za pripremu uzorka odabran je diklormetan. Kromatografski uvjeti primjenjene GC-MS metode mogu se pronaći u **Tablici 27**.

Tablica 27: Kromatografski parametri primijenjene GC-MS metode

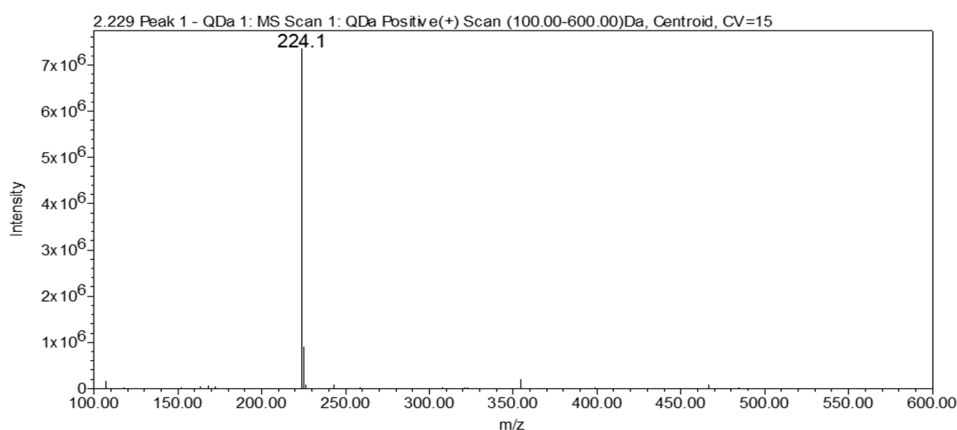
Kolona	Restek Rtx-5 Amine; 30 m × 250 μm × 1 μm		
Plin nosilac	dušik		
Temperatura injektora	150 °C		
Temperatura kolone	40 °C		
Protok	1,5 mL/min		
Split ratio	10:1		
Temperaturni program	Brzina temperaturnog gradijenta / °C min⁻¹	Temperatura / °C	Trajanje / min
	/	42	3
	20	210	2
Vrijeme trajanja	13,4 min		
Detektor	Spektrometar masa		
Temperatura detektora	280 °C		
Volumen injektiranja	3 μL		
Diluent	diklormetan		

4.3.2. Ispitivanje metode za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnog onečišćenja *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamid (IMP-2)

Ispitana je topljivost uzorka pimavanserin hemitararata (PMVhTA) i onečišćenja IMP-2. Kao pogodno otapalo pokazala se smjesa acetonitrila i demineralizirane vode (acetonitril:voda = 50:50, v/v). Uzorci su analizirani LC-MS metodom u pozitivnom načinu rada uz korištenje ionizacije elektroraspršenjem. Dušik je korišten kao plin nosilac i kolizijski plin, a uvjeti na detektoru masa bili su sljedeći:

- napon ekstraktora: 3 V
- napon na kapilari: 3000 V
- temperatura plina: 350 °C
- protok plina: 50 L/h
- protok plina za formiranje kapljica (engl. *desolvation temperature*): 600 L/h
- temperatura plina za formiranje kapljica: 350 °C.

Za kvantifikaciju analita korištena je metoda odabranog molekuskog iona (engl. *selected ion reaction*, SIR) pri čemu je praćen protonirani molekulski ion 224,1 [M+H]⁺ (**Slika 40**).



Slika 40. Spektar mase *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamida (IMP-2)

Prilikom razvoja analitičke metode, optimizacijom gradijenta i sastava pokretne faze osigurano je da ne dolazi do koeluiranja onečišćenja s pikom glavne komponente. Kromatografski uvjeti primjenjene metode mogu se pronaći u **Tablici 28**.

Tablica 28: Kromatografski parametri primjenjene LC-MS metode

Kromatografska kolona	Phenomenex, LC Column 150 × 4,6 mm, Gemini 3 μm C18 110 Å			
Komponenta A	0,1% v/v HCOOH u vodi			
Komponenta B	0,1% v/v HCOOH u acetonitrilu			
Gradijent	Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	A %	B %
	-	0,500	100,0	0,0
	10,00	0,500	0,0	100,0
	11,00	0,500	100,0	0,0
	13,00	0,500	100,0	0,0
	20,00	0,500	0,0	100,0
	25,00	0,500	0,0	100,0
Volumen injektiranja	3 μL			
Protok	0,500 mL/min			
Detektor	Spektrometar masa (SQD)			
Temperatura kolone	40,0 °C			
Temperatura automatskog uzorkivača	20,0 °C			
Diluent	acetonitril:voda=1:1 (v/v)			

4.3.3. Validacija GC-MS i LC-MS metoda za kvantifikaciju potencijalno genotoksičnih onečišćenja

Validacija GC-MS i LC-MS metoda za kvantifikaciju genotoksičnih onečišćenja izobutil-bromida i *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamida provedena je prema ICH smjernicama Q2(R1) [29]. Ispitane su sljedeće izvedbene značajke: specifičnost, linearnost, granica detekcije i kvantifikacije, preciznost, točnost, stabilnost otopina i robusnost metode.

Specifičnost GC-MS i LC-MS metode za određivanje genotoksičnih onečišćenja pimavanserin djelatne tvari određena je u prisutnosti IMP-1 (izobutil-bromida) i IMP-2 (*N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamida). Specifičnost obje analitičke metode potvrđena je obzirom da se tijekom analize ne pojavljuju pikovi interferencija na mjestu eluiranja analita. Specifičnost je potvrđena usporedbom kromatograma slijepe probe, otopinom LOQ koncentracije (3 ppm), otopinom standarda (10 ppm), otopinom nenacijepljenog uzorka pimavanserin hemitararata, te uzorka naciepljenog s otopinom standarda. Kromatogrami ispitivanja specifičnosti analitičkih metoda prikazani su na slikama u prilogu (**Prilog P7 i P8**).

Linearnost primijenjene GC-MS metode za određivanje IMP-1 ispitana je u koncentracijskom rasponu 0,06–0,60 µg/mL što odgovara rasponu od 3–30 ppm nominalne (radne) koncentracije ispitivanog uzorka pimavanserin hemitararata (20 mg/mL). Ispitana je i linearnost LC-MS metode za IMP-2 u koncentracijskom rasponu 0,03–0,30 µg/mL, što odgovara rasponu od 3–30 ppm nominalne (radne) koncentracije ispitivanog uzorka pimavanserin hemitararata (10 mg/mL). Ispitivanjem linearnosti obje metode utvrđena je značajna korelacija površine pikova i odgovarajućih koncentracija analita, iskazano kao koeficijent determinacije koji je iznosio 0,9994 za IMP-1 te 0,9956 za IMP-2.

Granica detekcije (LOD) za oba genotoksična onečišćenja je potvrđena i iznosi 1,5 ppm, uz omjer signala i šuma >20. Također, potvrđena je i granica kvantifikacije (LOQ) od 3 ppm za oba onečišćenja uz iznos omjera signala i šuma >50.

Zadovoljeni su i kriteriji prihvatljivosti za izvedbene značajke točnost i preciznost rezultata mjerenja ispitivanim analitičkim metodama, a rezultati ispitivanja za obje metode nalaze se u **Tablici 29**.

Tablica 29: Rezultati validacije analitičkih metoda za određivanje potencijalno genotoksičnih onečišćenja

GC-MS IMP-1 (izobutil-bromida)			LC-MS IMP-2 (N-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamid)		
Linearnost					
Linearno područje	0,06–0,60 µg/mL		Linearno područje	0,03–0,30 µg/mL	
Koeficijent determinacije (R^2)	0,9994		Koeficijent determinacije (R^2)	0,9956	
Odsječak (a)	-481,26		Odsječak (a)	-16371	
Nagib (b)	$1,08 \cdot 10^6$		Nagib (b)	$5,0 \cdot 10^9$	
Odstupanje od linearnosti (iskorištenje, %)					
$\gamma = 0,06 \mu\text{g/mL}$ (3 ppm)	101,4 %		$\gamma = 0,03 \mu\text{g/mL}$ (3 ppm)	115,4 %	
$\gamma = 0,2 \mu\text{g/mL}$ (10 ppm)	99,1 %		$\gamma = 0,1 \mu\text{g/mL}$ (10 ppm)	104,3 %	
$\gamma = 0,3 \mu\text{g/mL}$ (15 ppm)	99,0 %		$\gamma = 0,15 \mu\text{g/mL}$ (15 ppm)	95,3 %	
$\gamma = 0,6 \mu\text{g/mL}$ (30 ppm)	100,0 %		$\gamma = 0,3 \mu\text{g/mL}$ (30 ppm)	99,3 %	
Granica kvantifikacije (LOQ = 3 ppm)					
6 priprema otopine ($\gamma = 0,06 \mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	1,7 %	6 priprema otopine ($\gamma = 0,03 \mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	2,9 %
S/N	> 10	183	S/N	> 10	55
Granica detekcije (LOD = 1,5 ppm)					
S/N	> 3	137	S/N	> 3	22
Ponovljivost (RSD, %)					
6 priprema nacijspljenog uzorka ($\gamma = 0,2 \mu\text{g/mL}$)	0,49 %		6 priprema nacijspljenog uzorka ($\gamma = 0,1 \mu\text{g/mL}$)	1,14 %	
Točnost (iskorištenje, %)					
$\gamma = 0,06 \mu\text{g/mL}$ (3 ppm)	100,9 %		$\gamma = 0,03 \mu\text{g/mL}$ (3 ppm)	94,2 %	
$\gamma = 0,2 \mu\text{g/mL}$ (10 ppm)	99,6 %		$\gamma = 0,1 \mu\text{g/mL}$ (10 ppm)	99,6 %	
$\gamma = 0,6 \mu\text{g/mL}$ (30 ppm)	97,4 %		$\gamma = 0,3 \mu\text{g/mL}$ (30 ppm)	108,6 %	

Stabilnost standardnih otopina IMP-1 (0,2 µg/mL) i IMP-2 (0,1µg/mL), te stabilnost nacijepljenog uzorka pimavanserin hemitararata ispitana je čuvanjem otopina u dobro zatvorenim volumetrijskim tikvicama na sobnoj temperaturi tijekom tri dana (72 h).

Pohranjene otopine su potom analizirane, te je zaključeno da je otopina IMP-1 stabilna bez značajne degradacije tijekom 72 h, a izračunati omjeri između inicijalnih površina pikova i površina pikova dobivenih injektiranjem istih otopina nakon tri dana bili su unutra 0,7–1,2 % relativne razlike. Dok ispitivanjem otopine IMP-2 površine pikova značajno su se smanjile što je rezultiralo relativnom razlikom većom od 30 % izračunatih omjera između inicijalnih površina pikova i površina pikova dobivenih injektiranjem istih otopina nakon 72 h.

Zbog utvrđene nestabilnosti otopine IMP-2, kod provođenja kvantitativnih analiza, potrebna je svježja priprema otopine koja će se analizirati unutar 24 h.

Ispitana je i robusnost razvijenih analitičkih metoda uz male, ali namjerne varijacije kromatografskih parametra. Kod ispitivanja robusnosti GC-MS metode utvrđeno je da male promjene kromatografskih parametra poput temperature kolone (38 i 42 °C), *split* omjera (5:1 i 15:1), protoka pokretne faze (1,0 i 2,0 mL/min) ne utječu na kvalitetu određivanja analita, te se može zaključiti da je metoda robusna na male promjene vrijednosti kromatografskih parametara.

Robusnost LC-MS metode ispitana je praćenjem utjecaja malih promjena u temperaturi kromatografske kolone (35 i 45 °C) i protoku pokretne faze (0,45 i 0,55 mL/min). Promjena protoka pokretne faze utjecala je jedino na pomake vremena zadržavanja ($t_r = 9,2$ min pri optimalnom protoku 0,5 mL/min, $t_r = 9,7$ min pri protoku 0,45 mL/min, $t_r = 8,8$ min pri protoku 0,55 mL/min), no nije utjecala na kvalitetu određivanja analita.

Slijedom provedenih validacija, može se potvrditi da su primjenjene GC-MS i LC-MS analitičke metode prikladne za određivanje potencijalnih genotoksičnih onečišćenja (IMP-1 i IMP-2) u pimavanserin lijekovitoj djelatnoj tvari u rutinskoj analizi i primjerene za kontrolu kvalitete pimavanserin lijekovite djelatne tvari.

4.4. Metoda za kvantifikaciju teških metala i elementnih onečišćenja

Zbog poznate sposobnosti metala da kataliziraju razgradnju ljekovite djelatne tvari, ali i zbog njihove potencijalne toksičnosti, praćenje i kontrola sadržaja takvih onečišćenja u intermedijerima, sirovinama i gotovim lijekovima također je važna aktivnost.

Prije donošenja ICH smjernice za elementna onečišćenja u farmaceutskim proizvodima, sadržaj metalnih onečišćenja određivan je prema postupcima opisanim u britanskoj i američkoj farmakopeji [99, 100] a prema kojima je ukupni sadržaj metalnih onečišćenja u ljekovitoj djelatnoj tvari mjeren reakcijama metala u uzorku i tioacetamidnog reagensa kojima dolazi do njihovog taloženja u obliku obojenih sulfida. Navedeni postupak je neselektivan i dugotrajan te ne pruža podatke o prisutnim teškim metalima [101]. Teški metali i elementna onečišćenja danas se najčešće analiziraju visokoosjetljivim vezanim sustavima induktivno spregnute plazme sa spektrometrom masa (ICP-MS). Prednost ove tehnike je jednostavna priprema i utrošak male količine uzorka, niske granice detekcije i kvantifikacije kao i mogućnost istovremene kvantifikacije širokog spektra elemenata u relativno kratkom vremenu [102-104].

Tijekom istraživanja ispitana je i validirana analitička metoda za kvantifikaciju elementnih onečišćenja primjenom vezanog sustava spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), a koja se može primijeniti u rutinskoj analizi.

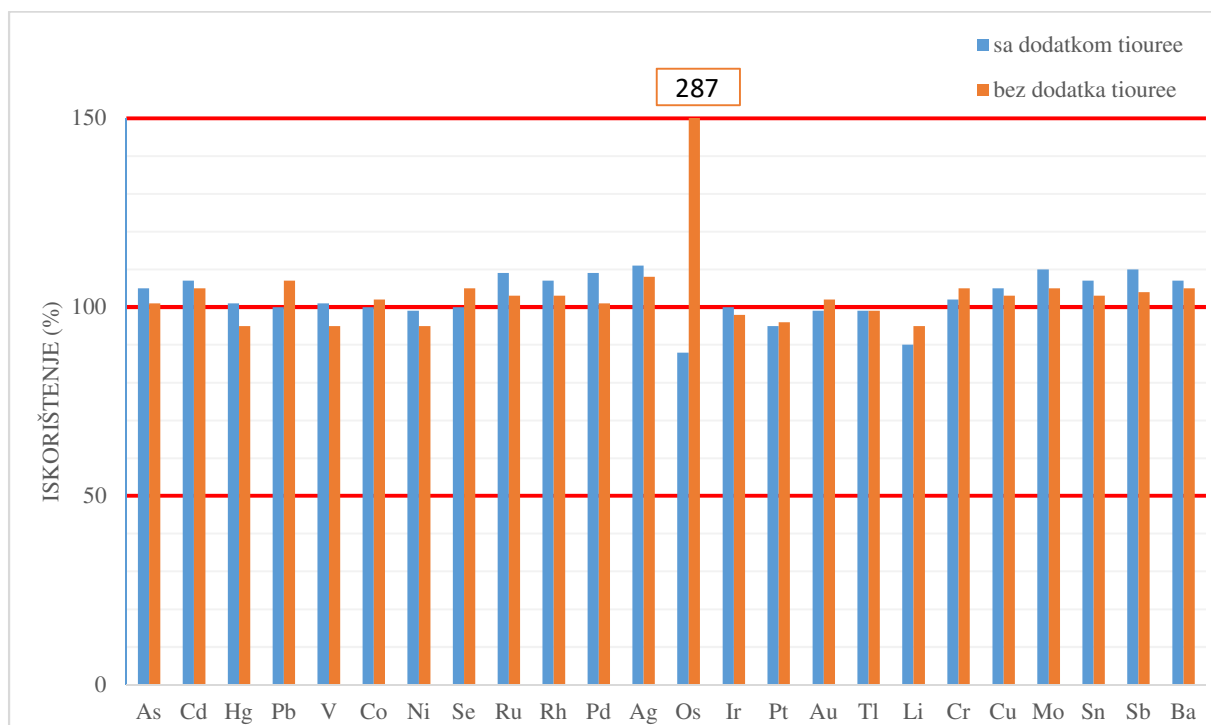
Priprema uzoraka je od osobite važnosti kod svake analize elemenata u tragovima čiji je udio u uzorku manji od 100 ppm. Stoga je prilikom ispitivanja i validacije metoda u ovom radu posebna pažnja pridana upravo pripremi uzorka. Za analizu je potrebno uzorak upotpunosti otopiti kako bi bio prikladan za analizu ICP-MS sustavom. Stoga su isprobane različite kombinacije kiselina i mikrovalne digestije pod povišenim tlakom i temperaturom. Mikrovalna digestija je idealna metoda za razaranje organskih matrica, a mikrovalni reaktor, koji se koristi za razaranje i pripremu uzoraka, prilagođen je radu s kiselinama u smislu otpornosti na njihove nagrizajuće i oksidirajuće učinke. Rad u zatvorenom sustavu pod visokim tlakom, osim što predstavlja siguran način pripreme, onemogućava eventualni gubitak hlapljivih elemenata u tragovima.

Na analizu elemenata u tragovima ICP-MS tehnikom mogu utjecati različite spektralne interferencije uzrokovane izobaričnim i poliatomnim interferencijama [105].

Utjecaj se očituje kao preklapanje spektralnih linija na određenim veličinama mjerenih omjera mase i naboja, što uzrokuje krivu procjenu prisutne količine pojedinog analita. Izobarične interferencije uključuju monoatomne specije istog omjera mase i naboja kao što su pojedini izotopi (npr. $^{58}\text{Fe}^+$ i $^{58}\text{Ni}^+$) ili neke višestruko nabijene vrste. Poliatomne interferencije mogu nastati zbog upotrebe argona kao plina nosica ili nečistoća koje su u njemu prisutne, od korištenih otapala ili kiselina, lužina, ili iz samog uzorka.

Također mogu biti uzrokovane reakcijom nekih analita međusobno ili s drugim specijama prisutnim u plazmi, što čini njihovo prepoznavanje iznimno složenim [106, 107].

Za optimizaciju metode, najprije je provedeno nekoliko preliminarnih analiza u kojima su snimani različiti izotopi analita u različitim načinima rada. Utjecaj interferencija uzrokovanih argonom kao plinom nosiocem uvelike se uklonio korištenjem helija kao kolizijskog plina za sve elemente mase od 40 do 80 m/z . Drugi izazov tijekom ispitivanja metode za istovremenu kvantifikaciju elemenata opisanih u ICH smjernici Q3D (**Tablica 3**) je upotreba jakih oksidansa za pripremu uzoraka ljekovite djelatne tvari. Jaki oksidacijski uvjeti koji se koriste u pripremi uzorka uzrokuju problem pri određivanju tragova osmija. Osmij se najčešće pojavljuje u farmaceutskim proizvodima kao ostatak korištenog katalizatora ili se može pronaći kao onečišćenje u katalizatorima na bazi nekih drugih metala [108]. U certificiranim referentnim otopinama standarda osmij se nalazi u obliku otopljenog $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$, odnosno $[\text{OsCl}_6]^{2-}$ u razrijeđenoj otopini klorovodične kiseline. Izlaganjem uzoraka jakim oksidacijskim uvjetima uz primjenu dušične kiseline, naročito uz povišenu temperaturu, stvara se jako hlapljiv i iznimno otrovan plin osmijevog tetraoksida (OsO_4) čija nestabilnost, ali i izrazita hlapljivost tijekom analize dovodi do lažno povišenih odgovora [109]. Kako bi se razvila sveobuhvatna metoda za analizu svih elemenata čija je kontrola propisana smjernicom ICH Q3D, uključujući i analizu osmija, bilo je potrebno ispitati i primijeniti jednostavnu i učinkovitu metodu stabilizacije osmija [110]. Pretraživanjem literature o karakterističnim kemijskim reakcijama osmija pronađen je podatak o reakcijama stvaranja stabilnog kompleksa osmijevog tetraoksida s tioureom pripremljenom u razrijeđenoj otopini klorovodične kiseline [111]. Provedena preliminarna ispitivanja, uz korištenje otopine za razrjeđivanje i pripremu uzorka koja sadrži 0,01 M tiureu pripremljenu u 2,5 % v/v HCl, potvrdila su višestruko poboljšanje rezultata analize (**Slika 41**) u odnosu na rezultate analiza u kojima se za razrjeđivanje uzoraka nakon mikrovalne digestije koristila samo 2,5 %-tna otopina klorovodične kiseline.



Slika 41. Usporedba iskorištenja razvijene ICP-MS metode za različite postupke pripreme uzorka pimavanserin lijekovite djelatne tvari

Ovakav pristup stvaranja stabilnog kompleksa osmijeovog tetraoksida s tiouream tijekom pripreme uzorka pimavanserin lijekovite djelatne tvari korišten je za provedbu validacijskih ispitivanja ICP-MS metode.

4.4.1. Validacija ICP-MS metode za kvantifikaciju teških metala i elementnih onečišćenja

Metoda za kvantifikaciju teških metala i drugih elementnih onečišćenja validirana je prema uputama opisanima u smjernici USP <233> [99]. Ispitane su sljedeće izvedbene značajke: specifičnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, preciznost, točnost, stabilnost otopina i robusnost metode. Svi kriteriji prihvatljivosti, koji su opisani u smjernici USP <233>, za ispitivane izvedbene značajke su zadovoljeni. Koncentracije ispitivanih elemenata u pojedinoj temeljnoj standardnoj otopini, a koje su korištene tijekom validacije primjenjene ICP-MS metode, prikazane su u tablicama u **Prilogu P9**. Validacijski rezultati predstavljeni su u **Tablici 30**, dok su kalibracijski pravci dobiveni ispitivanjem parametra linearnosti za svaki pojedini element prikazani u **Prilogu P10**.

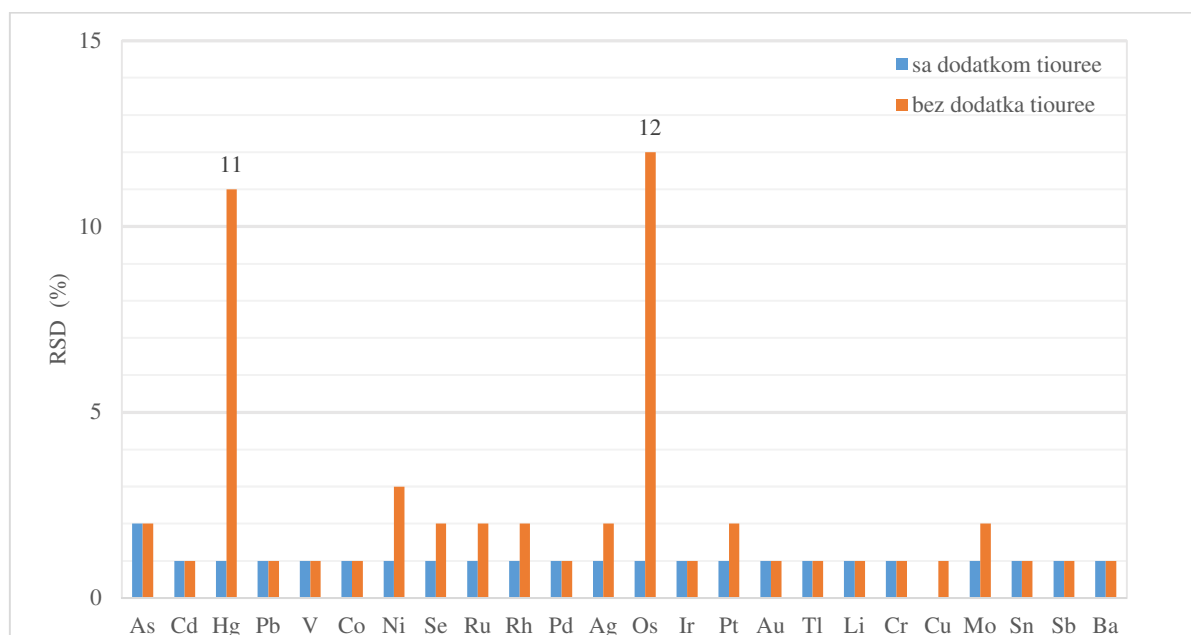
Tablica 30: Rezultati validacije ICP-MS metode za određivanje elementnih onečišćenja prema ICH Q3D

ICP-MS	Klasa 1				Klasa 2A			Klasa 2B				
	⁷⁵ As	¹¹¹ Cd	²⁰¹ Hg	²⁰⁸ Pb	⁵¹ V	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	⁷⁸ Se	¹⁰¹ Ru	¹⁰³ Rh	¹⁰⁵ Pd	¹⁰⁷ Ag
Linearnost												
Linearno područje (µg/g)	0,45–3	0,15–1	0,9–6	0,15–1	3–20	1,5–10	6–40	4,5–30	3–20	3–20	3–20	4,5–30
Koeficijent korelacije (<i>R</i>)	0,9998	0,9996	1,0000	0,9999	0,9999	1,0000	0,9999	0,9995	0,9994	0,9988	0,9995	0,9988
Odsječak (<i>a</i>)	0,0142	0,0024	0,0029	0,0745	0,0820	0,2307	0,0668	0,0006	0,0034	0,0187	0,0038	0,0078
Nagib (<i>b</i>)	6,0·10 ⁻⁴	1,2·10 ⁻⁵	1,0·10 ⁻⁴	6,9·10 ⁻⁴	1,9·10 ⁻²	3,1·10 ⁻⁴	7,0·10 ⁻³	2,2·10 ⁻⁴	2,1·10 ⁻⁵	1,4·10 ⁻⁵	6,9·10 ⁻⁵	7,4·10 ⁻⁴
Granica kvantifikacije (LOQ)	Iskorištenje (%)											
6 priprema LOQ otopine (30 % ICH Q3D)	105 %	107 %	101 %	100 %	101 %	100 %	99 %	100 %	109 %	107 %	109 %	111 %
Preciznost / Ponovljivost	RSD (%)											
6 priprema nacijspljenog uzorka	2 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
Međupreciznost	RSD (%)											
6 priprema nacijspljenog uzorka	2 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	3 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
Točnost	Iskorištenje (%)											
50 % ICH Q3D specifikacijske razine	103 %	106 %	101 %	101 %	99 %	102 %	99 %	102 %	107 %	106 %	108 %	110 %
100 % ICH Q3D specifikacijske razine	101 %	104 %	98 %	100 %	101 %	101 %	101 %	95 %	104 %	103 %	104 %	108 %
150 % ICH Q3D specifikacijske razine	101 %	102 %	97 %	99 %	100 %	101 %	100 %	96 %	101 %	100 %	101 %	107 %

Tablica 30: Rezultati validacije ICP-MS metode za određivanje elementnih onečišćenja prema ICH Q3D (nastavak)

ICP-MS	Klasa 2B					Klasa 3						
	¹⁸⁹ Os	¹⁹³ Ir	¹⁹⁵ Pt	¹⁹⁷ Au	²⁰⁵ Tl	⁷ Li	⁵² Cr	⁶³ Cu	⁹⁵ Mo	¹¹⁸ Sn	¹²¹ Sb	¹³⁷ Ba
Linearnost												
Linearno područje (µg/g)	3–20	3–20	3–20	3–20	0,24–1,6	16,5–110	330–2200	90–600	90–600	180–1200	36–240	42–280
Koeficijent korelacije (<i>R</i>)	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9988	1,0000	0,9999	0,9994	0,9996	0,9995	0,9993
Odsječak (a)	0,0113	0,0397	0,0142	0,0224	0,0511	0,0040	0,1165	0,1830	0,0030	0,0046	0,0063	0,0026
Nagib (b)	1,2·10 ⁻⁴	2,2·10 ⁻⁴	9,6·10 ⁻⁵	9,5·10 ⁻⁵	1,3·10 ⁻³	4,7·10 ⁻⁴	8,4·10 ⁻²	0,1094	2,7·10 ⁻⁴	3,3·10 ⁻³	2,1·10 ⁻³	4,1·10 ⁻⁵
Granica kvantifikacije (LOQ)	Iskorištenje (%)											
6 priprema LOQ otopine (30 % ICH Q3D)	88 %	100 %	95 %	99 %	99 %	90 %	102 %	105 %	110 %	107 %	110 %	107 %
Preciznost / Ponovljivost	RSD (%)											
6 priprema nacijspljenog uzorka	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	-	1 %	1 %	1 %	1 %
Međupreciznost	RSD (%)											
6 priprema nacijspljenog uzorka	3 %	2 %	2 %	1 %	2 %	2 %	1 %	1 %	2 %	1 %	1 %	2 %
Točnost	Iskorištenje (%)											
50 % ICH Q3D specifikacijske razine	89 %	101 %	95 %	100 %	100 %	96 %	102 %	105 %	108 %	105 %	108 %	106 %
100 % ICH Q3D specifikacijske razine	90 %	100 %	100 %	101 %	100 %	94 %	101 %	104 %	104 %	104 %	104 %	104 %
150 % ICH Q3D specifikacijske razine	87 %	100 %	99 %	100 %	99 %	102 %	101 %	101 %	102 %	102 %	103 %	101 %

Granica kvantifikacije (LOQ) za svaki pojedini ispitivani element postavljena je na 30 % specifikacijske razine predložene ICH Q3D smjernicom (**Tablica 3**). Također je ispitan i utjecaj pripreme uzorka s i bez dodatka tiouree na granice kvantifikacije za osmij i živu. Kada je priprema uzorka pimavanserin ljekovite djelatne tvari provedena bez dodatka tiouree, relativno standardno odstupanje rezultata šest uzastopnih mjerenja otopina s koncentracijama jednakim LOQ iznosilo je > 10% za osmij i za živu. Dodavanje tiouree kao kompleksirajućeg agensa značajno je poboljšalo rezultate ponovljivosti za osmij i živu, a što je prikazano na **Slici 42**.



Slika 42. Ispitivanje utjecaja dodatka tiouree na ponovljivost pri granici kvantifikacije

Granice kvantifikacije (LOQ) za svaki ispitivani element, primjenom ICP-MS tehnike, zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti. Najniže iskorištenje pri LOQ od svega 88 %, kao što je i očekivano, postignuto je za osmij, no dobiveni rezultat zadovoljava validacijske kriterije prihvatljivosti (70–150 %).

Tijekom provedbe validacije ispitana je i robusnost analitičke metode. Budući da je kritičan parametar analize elementnih onečišćenja upravo parametar pripreme uzoraka, ispitan je utjecaj malih temperaturnih varijacija mikrovalne digestije ($T = 230$ i 250 °C) uzoraka ljekovite djelatne tvari, te utjecaj koncentracije kiselina korištenih za razrjeđivanje uzorka nakon mikrovalne digestije.

Mikrovalna digestija uzorka u zatvorenom reaktoru predstavlja univerzalnu metodu pripreme uzoraka za analizu elementnih onečišćenja primjenom ICP-MS tehnike. Važna prednost ovakvog pristupa pripremi uzorka je zadržavanje lako hlapljivih elementa kao što su živa i osmij.

U slučaju osmija, provedba mikrovalne digestije uzorka pri višim temperaturama rada mikrovalnog reaktora pokazala se kao kritičan parametar. Ovakvi rezultati su i očekivani s obzirom na visoku hlapljivost osmijevog tetraoksida koji nastaje u dodiru s oksidirajućom dušičnom kiselinom. Stoga je važno obratiti pozornost na radne temperature mikrovalnog reaktora.

Male varijacije u koncentraciji dušične i perklorne kiseline, a koje su korištene za razaranje uzorka pimavanserin ljekovite djelatne tvar, nisu značajno utjecale na kvalitetu rezultata provedene analize.

Analitička metoda za kvantitativno određivanje elementnih onečišćenja, definiranih u ICH Q3D smjernici, validirana je ispitivanjem njenih glavnih izvedbenih značajki – linearnosti, granice kvantifikacije, točnosti, preciznosti (koja je uključila ponovljivost i međupreciznost) te robusnost. Svaka je od navedenih izvedbenih značajki zadovoljila kriterij prihvatljivosti te je stoga zaključeno da je metoda prikladna za primjenu u rutinskoj kontroli kvalitete ljekovite djelatne tvari. Validacijskim postupkom potvrđeno je da se primjenjenom ICP-MS metodom dobivaju točni i precizni rezultati unutar metodom definiranog radnog područja za svaki određivani element. Analizom komercijalno proizvedenog pimavanserina nije utvrđena prisutnost elementnih onečišćenja.

5. ZAKLJUČCI

- Razvijena je metoda za razdvajanje procesnih i degradacijskih onečišćenja pimavanserina prema načelima analitičke kvalitete osigurane dizanom (AQbD) kao strategije temeljene na procjeni rizika. Metoda je optimirana upotrebom računalnog programskog paketa DryLab i preliminarnih multivarijantnih eksperimenata. Multivarijantna analiza kritičnih parametara metode (trajanje gradijenta, pH pokretne faze i temperatura kolone) korištena je za određivanje radnog područja metode (MODR).

Određeni su optimalni eksperimentalni uvjeti provedbe metode: temperatura kolone 35 °C, pH 9,5 (vodena komponenta pokretne faze, A) i trajanje gradijenta $t_G = 10$ min. Provedena je potpuna validacija razvijene metode za kvantifikaciju organskih onečišćenja pimavanserina te je uspostavljena robusna strategija kontrole razvijene analitičke metode. AQbD pristup razvoju analitičkih metoda predstavlja učinkovit način poboljšanja učinkovitosti razvoja i kvalitete rezultata ispitivanja te ujedno smanjuje operativne troškove. Vrijeme potrebno za razvoj metode značajno je smanjeno korištenjem DryLab računalnog programa, a vizualizacija MODR-a omogućila je razvoj robusnije metode.

- Provedena je studija prisilne razgradnje, a produkti razgradnje identificirani su pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti (UHPLC-QTOF). Glavni razgradni produkti nastali su tijekom hidrolize (m/z 223,16 $[M+H]^+$ na RRT 0,37) i u uvjetima oksidativnog stresa (m/z 444,26 $[M+H]^+$ na RRT 0,57).
- Za ispitivanje prisutnosti potencijalno genotoksičnih onečišćenja (izobutil-bromida (IMP-1) i *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamid (IMP-2)) validirane su visokoosjetljive LC-MS i GC-MS metode prikladne za određivanje niskih koncentracija onečišćenja IMP-1 i IMP-2 u pimavanserin djelatnoj tvari. Validacijom je potvrđena linearnost metode u rasponu od 3–30 ppm od nominalne (radne) koncentracije uzorka pimavanserina, te su također potvrđene granice kvantifikacije (3 ppm, LOQ) ispitivanih metoda za određivanje potencijalno genotoksičnih onečišćenja pimavanserina.
- Ispitana je i prikladnost primjene ICP-MS tehnike za kvantitativno određivanje teških metala i elementnih onečišćenja (definiranih u ICH Q3D smjernici) u pimavanserin

ljekovitoj djelatnoj tvari. Priprema uzorka kritičan je parametar u analizi elementnih onečišćenja, stoga je potrebna pažljiva priprema i korištenje opreme, kemikalija, reagensa i certificiranih referentnih standarada visoke kvalitete i čistoće kako bi se spriječilo eventualno uvođenje interferencija u uzorak pripremljen za analizu. Upotrebom kolizijskog plina i odabirom pogodnih izotopa analita smanjuje se utjecaj prisutnih interferencija. Problem hlapljivosti osmijevog tetraoksida riješen je kompleksiranjem osmija s tioureom u otopini klorovodične kiseline. Ovim postupkom smanjen je gubitak osmija, te se postižu višestruko poboljšani rezultati u smislu točnosti i preciznosti. Validacijskim postupkom potvrđeno je da se ICP-MS tehnikom dobivaju specifični, točni i precizni rezultati unutar metodom definiranog radnog područja za svaki određivani element, a ispitivana metoda je prikladna za primjenu u rutinskoj kontroli kvalitete ljekovite djelatne tvari.

6. LITERATURA

- [1] M. P. Cruz, Pimavanserin (Nuplazid): A treatment for hallucinations and delusions associated with Parkinson's disease, *P&T* 42 (2017) 368–371. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28579723/> (pristup 8. siječnja 2021)
- [2] Nuplazid (pimavanserin) prescribing information, Acadia Pharmaceuticals Inc., San Diego, California, 2016. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/207318lbl.pdf (pristup 5. svibnja 2020)
- [3] S. Wang, Y. Wang, S. Gao, Y. Zhang, H. Wang, L. Zhao, K. Bi, S. Wang, X. Chen, Development of a UPLC–MS/MS method for determination of pimavanserin tartrate in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 406–10.
- [4] G. B. Koduri, H. B. Bollikolla, R. Dittakavi, S. Navuluri, Quantification of pimavanserin in bulk and tablet dosage form using a stability indicating high performance liquid chromatographic method, *Pharm. Sci.* 24 (2018) 291c297.
- [5] S. V. Saibaba, M. Sathish Kumar, B. Ramu, Pharmaceutical impurities and their characterization: A review, *Eur. J. Pharm. Med. Res.* 3 (5) (2016) 190–196.
- [6] B. Nigović, M. Sertić, Onečišćenja u lijekovima, *Farmaceutski glasnik*, 68 (2012) 77–88.
- [7] ICH Harmonised tripartite guideline. Impurities in new drug substances Q3A (R2) (Step 4), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2006.
- [8] F. Qiu, D. L. Norwood, Identification of pharmaceutical impurities, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 877–935.
- [9] ICH Harmonised tripartite guideline. Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R8) (Step 4), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2021.

- [10] ICH Harmonised tripartite guideline. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7(R1), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2018.
- [11] S. Mohamed, U. Sabita, S. Rajendra, D. Raman, Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods, *Glob. J. Pharm. Pharm. Sc.* 1(5) (2017) 555–575.
- [12] A. K. Basak, A.S.Raw, A.H. Al Hakim. S. Furness, N. I. Samaan, D.S. Gill, H. B. Patel, R. F. Powers, L. Yu, Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 64–72.
- [13] ICH Harmonised tripartite guideline. Impurities in New Drug Products Q3B (R2), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2006.
- [14] ICH Harmonised tripartite guideline. Guideline for elemental impurities Q3D (R1), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2019.
- [15] Guideline on the limits of genotoxic impurities, European Medicines Agency, 2006.
- [16] ICH Harmonised tripartite guideline. Pharmaceutical development Q8 (R2), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2009.
- [17] ICH Harmonised tripartite guideline. Quality Risk Management Q9, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- [18] ICH Harmonised tripartite guideline. Pharmaceutical Quality System Q10, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2008.
- [19] ICH Harmonised tripartite guideline. Development and Manufacture of Drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) Q11, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2012.

- [20] C. Hubert, P. Lebrun, S. Houari, E. Ziemons, E. Rozet, Ph. Hubert, Improvement of a stability indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing: A case of a learning process, *J. Pharm. Biom. Anal.* 88 (2014) 401–409.
- [21] S. Orlandini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Application of quality by design to the development of analytical separation methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 443–450.
- [22] R. Kormany, I. Molnar, H.-J. Rieger, Exploring better column selectivity choices in ultra-high performance liquid chromatography using Quality by Design principles, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 80 (2013) 79–88.
- [23] A. Zöldhegyi, H.-J. Rieger, I. Molnár, L. Fekhretdinova, Automated UHPLC separation of 10 pharmaceutical compounds using software-modeling, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 156 (2018) 379–388.
- [24] R. Deidda, H. T. Avohou, R. Baronti, P. L. Davolio, B. Pasquini, M. Del Bubba, C. Hubert, P. Hubert, S. Orlandini, S. Furlanetto, Analytical quality by design: Development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 166 (2019) 326–335.
- [25] I. Kasagić-Vujanović, B. Jančić-Stojanović, Quality by Design oriented development of hydrophilic interaction liquid chromatography method for the analysis of amitriptyline and its impurities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 173 (2019) 86–95.
- [26] B. Pasquini, S. Orlandini, S. Furlanetto, R. Gotti, M. Del Bubba, F. Boscaro, B. Bertaccini, M. Douša, G. Peraccini, Quality by Design as a risk-based strategy in pharmaceutical analysis: Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of nintedanib and its impurities, *J. Chrom. A* 1611 (2020) 460615.
- [27] P. Jackson, P. Borman, C. Campa, M. Chatfield, M. Godfrey, P. Hamilton, W. Hoyer, F. Norelli, R. Orr, T. Schonfield, Using the Analytical Target Profile to Drive the Analytical Method Lifecycle, *Anal. Chem.* 91 (2019) 2577–2585.

- [28] G. L. Reid, J. Morgado, K. Barnett, B. Harrington, J. Wang, J. Harwood, D. Fortin, Analytical Quality by Design (AQbD) in pharmaceutical development, *Am. Pharm. Rev.* 2013. https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/144191-Analytical-Quality-by-Design-AQbD-in-Pharmaceutical-Development/?__cf_chl_captcha_tk__=pmd_8hcSdbZwZ9dQKKIUvgH8AMpTz8DPMst3bfJT.UPbYoE-1635679982-0-gqNtZGzNA6WjcnBszQd9(pristup 31. listopada 2021)
- [29] ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 1995.
- [30] I. Molnár, H. J. Rieger, K. E. Monks, Aspects of the “Design Space” in high pressure liquid chromatography method Development, *J. Chrom. A* 1217 (2010) 3193–3200.
- [31] A. Dispas, H. T. Avohou, P. Lebrun, P. Hubert, C. Hubert, „Quality by Design“ approach for the analysis of impurities in pharmaceutical drug products and drug substances, *Trends Analyt. Chem.* 101 (2018) 24–33.
- [32] I. Martins Fukuda, C. Francini Fidelis Pinto, C. Santos Moreira, A. Morais Saviano, F. Rebello Lourenço, Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD), *Braz. J. Pharm. Sci.* 54 (2018).
- [33] J. N. Miller, J. C. Miller, R. D. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Ed. 7, Pearson Education Limited, Harlow, United Kingdom, 2018, str. 219–220.
- [34] M. Ukrainczyk, Planiranje pokusa u industriji, *Hr. čas. za preh. teh. bioteh. i nutr.* 5 (2010) 96–105.
- [35] Ł. Komsta, Y. Vander Heyden, J. Sherma (ur.), *Chemometrics in chromatography*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD, 2018, str. 3–21.
- [36] D.C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, John Wiley & Sons, Inc., 2001, 427–500.

- [37] D. B. Hibbert, Experimental design in chromatography: A tutorial review, *J. Chromatogr. B* 910 (2012) 2–13.
- [38] T. Tol, N. Kadam, N. Raotole, A Desai, G. Samanta, A simultaneous determination of related substances by high performance liquid chromatography in a drug product using quality by design approach, *J. Chromatogr. A* 1432 (2015) 26–38.
- [39] R. M. Krisko, K. McLaughlin, M. J. Koenigbauer, C. E. Lunte, Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 186–93.
- [40] I. Molnár, Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: Development of DryLab software, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 175–194.
- [41] C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *J. Chromatogr. A* 125 (1976) 129–156.
- [42] I. Molnár, H.-J. Rieger, K. E. Monks, Aspects of the „Design Space“ in high pressure liquid chromatography method development, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3193–3200.
- [43] J. Terzic, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, Aspekti primene Drylab softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda, *Arh. farm.* 64 (2014) 205–219.
- [44] R. Deidda, S. Orlandini, P. Hubert, C. Hubert, Risk based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 161 (2018) 110–121.
- [45] P. Borman, P. Nethercote, M. Chatfield, D. Thompson, K. Truman, The application of quality by design to analytical methods, *Pharm. Tech.* 31 (2012) 142–152.
- [46] C. Hubert, P. Lebrun, S. Houari, E. Ziemons, E. Rozet, P. Hubert, Improvement of a stability indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing: A case of a learning process, *J. Pharm. Biom. Anal.* 88 (2014) 401–409.

- [47] A. H. Schmidt, M. Stanic, I. Molnár, In silico robustness testing of a compendial HPLC purity method by using of a multidimensional design space build by chromatography modeling - Case study pramipexole, *J. Pharm. Biom. Anal.* 91 (2014) 97–107.
- [48] P. Nethercote, J. Ermer, Quality by Design for Analytical Methods: Implications for Method Validation and Transfer, *Pharm. Tech.* 36 (2012) 10.
<https://www.pharmtech.com/view/quality-design-analytical-methods-implications-method-validation-and-transfer> (pristup 25. kolovoza 2021)
- [49] M. Blessy, D. Ruchi Patel, N. Prajesh Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review, *J. Pharm. Anal.* 4 (2014) 159–165.
- [50] M. Zezula, M. Ruszczak, W. Maruszak, J. Zagrodzka, M. Chodynski, I. Dams, Development and validation of the stability indicating RP-UHPLC method for the determination of the chemical purity and assay of bimatoprost, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 174 (2019) 348–359.
- [51] P. R. Deshmukh, V. L. Gaikwad, P. K. Tamane, K. R. Mahadik, R. N. Purohit, Development of stability-indicating HPLC method and accelerated stability studies for osmotic and pulsatile tablet formulations of Clopidogrel Bisulfate, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 165 (2019) 346–356.
- [52] ICH harmonised tripartite guideline. Stability testing of new drug substances and drug products Q1A. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2015.
- [53] S. Singh, M. Bakshi, Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs, *Pharm. Tech.* 24 (2000) 1–14.
- [54] K. M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T. D Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (1) (2007) 29–37.
- [55] ICH harmonised tripartite guideline. Photostability Q1B. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2015.

- [56] A. D. C. Parenty, W. G. Button, M. A. Ott, An expert system to predict the forced degradation of organic molecules, *Mol. Pharmaceutics* 10(8) (2013) 2962–2974.
- [57] M. H. Kleinman, S. W. Baertschi, K. M. Alsante, D. L. Reid, M. D. Mowery, R. Shimanovich, C. Foti, W. K. Smith, D. W. Reynolds, M. Nefliu, M. A. Ott, In silico prediction of pharmaceutical degradation pathways: A benchmarking study, *Mol. Pharmaceutics* 11(11) (2014), 4179–4188.
- [58] M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* 65 (9-10) (2016), 471–482.
- [59] M. Kaštelan-Macan, M. Medić-Šarić, S. Turina, Plošna kromatografija, Farmaceutusko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006, str. 7–33.
- [60] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217–235.
- [61] M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, Mentor d.o.o., Zagreb, 2014, str. 97–99.
- [62] N. Radić, L. Kukoč Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 630–663.
- [63] M. W. Dong, HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2019, str. 16-44.
- [64] High Performance Liquid Chromatography. <https://chem.libretexts.org/@go/page/307> (pristup 31.listopada 2021)
- [65] Š. Ukić, T. Bolanča, Ionska kromatografija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2013.
- [66] J. J. van Deemter, E. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion & resistance to mass transfer or cause of non ideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1965) 271-289.
- [67] R. Lake, How do small particle size columns increase sample throughput? <https://www.restek.com/en/technical-literature-library/articles/how-do-small-particle-size-columns-increase-sample-throughput/> (pristup 5. kolovoza 2021)

- [68] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007, str. 3.
- [69] S. K. Bhardway, K. Dwivedi, D. D. Agarwal, A review: HPLC method development and validation, *Int. J. Anal. Bioanal. Chem* 5 (2015) 7–81.
- [70] J. W. Jorgenson, Capillary Liquid Chromatography at Ultrahigh Pressures, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 3 (2010) 129–150.
- [71] L. E. Blue, E. G. Franklin, J. M. Godinho, J. P. Grinias, K. M. Grinias, D. B. Lunn, S. M. Moore, Recent advances in capillary ultrahigh pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1523 (2017) 17–39.
- [72] S. Fekete, I. Kohler, S. Rudaz, D. Guillarme, Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 105–119.
- [73] D. Jain, P. K. Basniwal, Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 86 (2013) 11–35.
- [74] R. M. Patel, Stability indicated HPLC method development – A review, *Int. Reseach J. Pharm.* 2 (2011) 79–87.
- [75] I. Baranowska, S. Magiera, J. Baranowski, Clinical applications of fast liquid chromatography: a review on the analysis of cardiovascular drugs and their metabolites, *J. Chromatogr. B* 927 (2013) 54–79.
- [76] R. N. Xu, L. Fan, M. J. Rieser, T. A. El-Shourbagy, Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 342–355.
- [77] O. Coskun, Separation techniques: Chromatography, *North Clin Istan.* 3(2) (2016) 156–60.
- [78] Fundamental Guide to Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS), Shimadzu Corporation, 2020, str. 6–87.

- [79] O. D. Sparkman, Z. Penton, F. Kitson, Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide, 2. izdanje, Elsevier, Oxford, 2011, str. 18–79.
- [80] G. A. Eiceman, Instrumentation of Gas Chromatography: Introduction, objavljeno u Encyclopedia of analytical chemistry, Online, John Wiley & Sons, Inc., 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5505> (pristup 5. kolovoza 2021)
- [81] S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2009, str. 204, 207, 213, 215–218.
- [82] M. F. Carvalaho Silva, Application of ICP-MS in the optimisation of a new methodology for ^{68}Ga production in a PET dedicated cyclotron, doktorski rad, University of Coimbra, 2016. <http://hdl.handle.net/10316/32960> (pristup 10. kolovoza 2021)
- [83] S. J. Hill, Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2007.
- [84] E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry Principles and Applications, 3. izdanje, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2007, str. 1–10.
- [85] P. Novak, T. Jednačak, Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama. TIVA Tiskara, Varaždin, 2014, str. 78–89.
- [86] M. P. Balogh, The Mass Spectrometry Primer, Milford, Waters Corporation, 2009, 13, 32–34.
- [87] G. Siuzdak, An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology, 2. izdanje, MCC Press, San Diego, 2005.
- [88] M. K. Parr, B. Wüst, J. Teubel, J. F. Joseph, Splitless hyphenation of SFC with MS by APCI, APPI, and ESI exemplified by steroids as model compounds, *J. Chromatogr. B* 109 (2018) 67–78.
- [89] N. Galić, Elektroraspršenje – ionizacija u masenoj spektrometriji, *Kem. Ind.* 53 (2004) 117–123.
- [90] M. Rožman, Matrix-assisted laser desorption ionization, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 54 (2003) 19–28.

- [91] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina* 45 (2009) 218–232.
- [92] P. S. H. Wong, R. G. Cooks, Ion trap mass spectrometry, *Curr. Sep.* 16 (1997) 85–92.
- [93] J. Faktor, M. Dvorakova, J. Maryas, P. Bouchal, Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies, *Klin. Onkol.* 25 (2012) 2S70–2S77.
- [94] Time of Flight Mass Spectrometry. Technical overview, Agilent Technologies, USA, 2011. ISBN 5990-9207EN
- [95] Agilent 6540 UHD Quadrupole Time-of-Flight Accurate-Mass Mass Spectrometer, <https://www.creative-proteomics.com/support/agilent-6540-uhd-quadrupole-time-of-flight-accurate-mass-mass-spectrometer.htm> (pristup 21. kolovoza 2021)
- [96] A. D. C. Parenty, W. G. Button, M. A. Ott, An expert system to predict the forced degradation of organic molecules, *Mol. Pharmaceutics* 10(8) (2013) 2962–2974.
- [97] L. Müller, R.J. Mauthe, C. M. Riley, M. M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, J. DeGeorge, A. G. M. De Knaep, D. Ellison, J. A. Fagerland, R. Frank, B. Fritschel, S. Galloway, E. Harpur, C. D. N Humfrey, A. S. Jacks, N. Jagota, J. Mackinnon, G. Mohan, D. K. Ness, M. R. O'Donovan, M. D. Smith, G. Vudathala, L. Yotti, A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 44(3) (2006) 198–211.
- [98] A. Kremser, M. A. Jochmann, T. C. Schmidt, Systematic comparison of static and dynamic headspace sampling techniques for gas chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 408(24) (2016) 6567–6579.
- [99] Second supplement to USP37– NF32: General Chapter <233> “Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials – Procedures”, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2014.
- [100] European Medicines Agency: Telzir: EPAR – Scientific discussion, EMEA 2005.

- [101] T. Wang, J. Wu, R. Hartman, X. Jia, S. R. Egan, A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials, *J. Pharm. Biomed.* 23 (2000) 867–890.
- [102] N. Lewen, S. Mathew, M. Schenkenberger, T. Raglione, A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35(4) (2004) 739–752.
- [103] A. S. R. Murty, U. C. Kulshresta, T. Rao, M. V. N. Talluri, Determination of heavy metals in selected drug substances by inductively coupled plasma - Mass spectrometry, *Indian J. Chem. Technol.* 12 (2005) 229–231.
- [104] R. Nageswara, M. V. N. Kumar Talluri, An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43(1) (2007) 1–13.
- [105] R. C. Machado, C. D. B. Amaral, D. Schiavo, J. A. Nóbrega, A. R. A. Nogueira, Complex samples and spectral interferences in ICP-MS: Evaluation of tandem mass spectrometry for interference-free determination of cadmium, tin and platinum group elements, *Microchem. J.* 130 (2017) 271–275.
- [106] T.-S. Lum, K. Sze-Yin Leung, Strategies to overcome spectral interference in ICPMS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 1078–1088.
- [107] Reducing the Effects of Interferences in Quadrupole ICP-MS, <https://www.spectroscopyonline.com/view/reducing-effects-interferences-quadrupole-icp-ms> (pristup 26. kolovoza 2021)
- [108] R. V. Ottenbacher, E. P. Talsi, K. P. Bryliakov, Recent advances in catalytic asymmetric dihydroxylation of olefins. *Russ. Chem. Rev.* 88(11) (2019) 1094–1103.
- [109] Z. Marczenko, M. Balcerzak, E. Kloczko (ur.), *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*, Elsevier Science, 2000, str. 528.
- [110] C. Venzago, M. Popp, J. Kovac, A. Kunkela, Pharmacopeial requirements for elemental impurities: A novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel

sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilization. *J. Anal. At. Spectrom.* **7** (2013) 1125–1129.

[111] D. Sauerbrunn, E. B. Sandell, Photometric determination of osmium with thiourea after extraction of the tetroxide, *Anal. Chim. Acta* **9** (1953) 86–90.

7. PRILOZI

Prilog P1. *In silico* predviđanje razgradnje u jakim oksidativnim uvjetima

C:\Users\vpetrusevska\Desktop\Pimavanserin oxidation.rtf

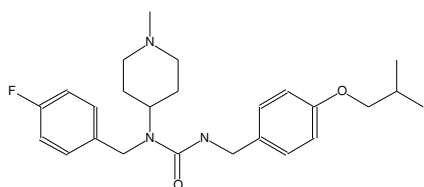
Program Settings and Processing Constraints

User name:	-
Date created:	23. svibanj 2019.
Program version:	Zeneth_7.1.3
Filename of knowledge base:	C:\Users\Public\Lhasa Limited\Zeneth KB 2018_1_0\Application\Z2018.1.0.mdb
Knowledge base version:	Zeneth7.0.0_01_12_2017
Knowledge base last modified date:	1. prosinac 2017.
Testing against:	All transformations
Absolute reasoning:	On
Likelihood at least:	Likely
Pathway likelihood:	Multiplied step likelihood
Relative reasoning:	By Level
Relative reasoning level(s):	Top level
Physical State:	Not specified
Condition set:	A
Temperature:	20°C
pH:	7
Water:	Off
Oxygen:	On
Metal:	On
Radical initiator:	On
Peroxide:	On
Light:	Off
Perceive tautomers:	Off
Hydrogen options:	Perceive implicit and explicit hydrogens
Grow only from labelled degradants:	Off
Allow the query compound to react on its own:	Yes
Allow a degradant to react with itself:	No
Allow the query compound to react with itself and with degradants:	No
Maximum monomer count:	Off
Maximum total number of degradants:	400
Maximum number of steps in a pathway:	2
Autosave results (ZNT file):	Off
Autosave results directory:	Not applicable
Name field:	Not specified
Apply display filters:	Yes
Filter on chemical formula:	Off
Filter on exact mass:	Off
Filter on mass difference:	Off
Mass tolerance:	Not applicable
Show Duplicates:	Yes
Intermediates:	Show All

Submitted Compound(s)

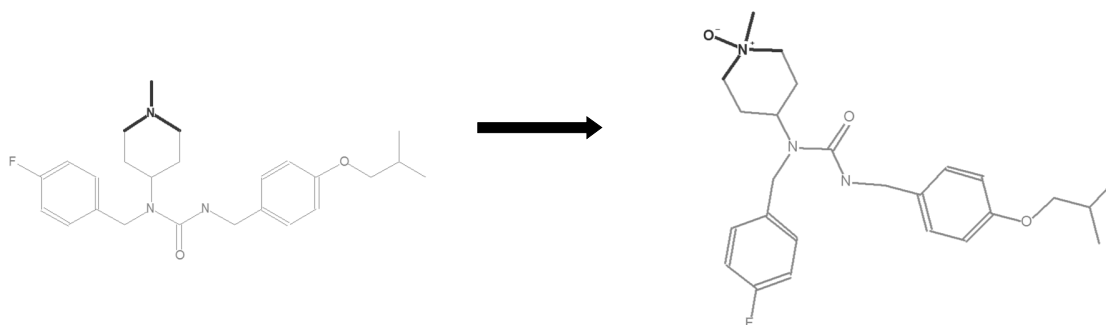
[Q]:	Pimavanserin.mol
Formula:	C ₂₅ H ₃₄ FN ₃ O ₂
Average mass:	427.564 Calculated by Zeneth
Exact mass:	427.26351 Calculated by Zeneth

[Q] Pimavanserin.mol:



Lhasa Predictions

001 N-Oxidation of aliphatic tertiary amine



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

D1

Structure name: 97\001\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₃

Gain: O **Loss:** None

Average mass: 443.563

Exact mass: 443.25842

Mass difference: 15.99491

Absolute Reasoning

[transformation 001 products] is LIKELY (Step likelihood)

[transformation 001] is [CERTAIN]

[any oxidant] is [CERTAIN]

[likelihood with pH profile 10] is [PLAUSIBLE]

[conditions: oxygen] is [CERTAIN]

[conditions: peroxide] is [CERTAIN]

[6 < pH <= 8] is [CERTAIN]

pH is 7. User entered

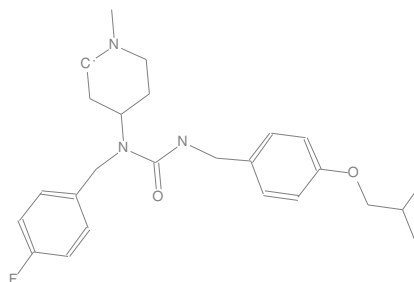
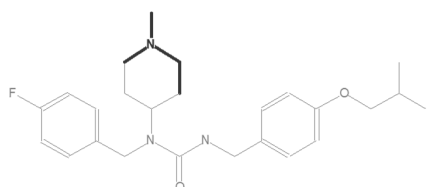
The step likelihood of this transformation is LIKELY

The pathway likelihood of this degradant (D1) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

159 Oxidation of tertiary amine to amide



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

I1r

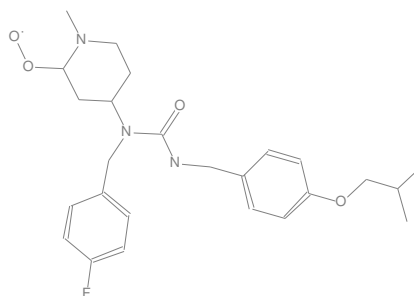
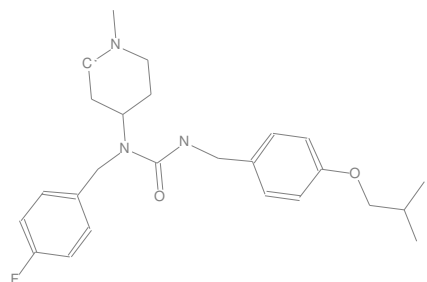
Structure name: 97\159\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I1r

Structure name: 97\159\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I2r

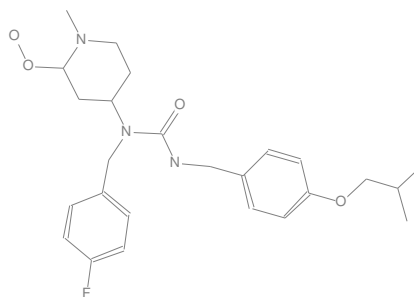
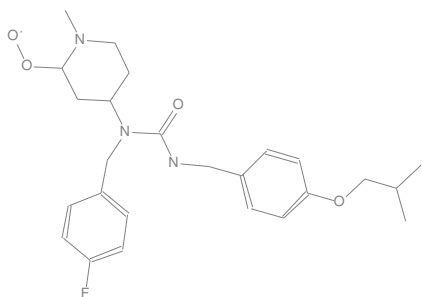
Structure name: 97\159\1_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I2r

Structure name: 97\159\1_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200

I3o

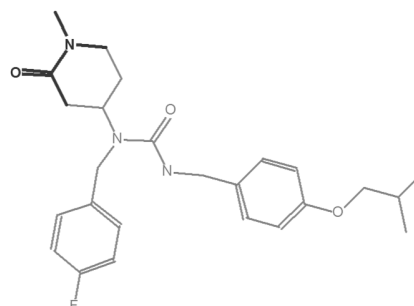
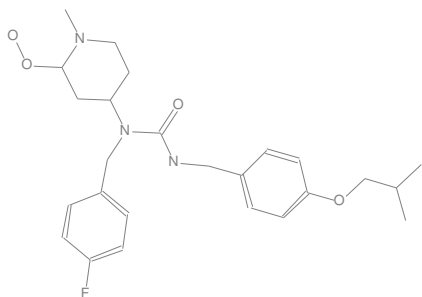
Structure name: 97\159\1_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I3o

Structure name: 97\159\1_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982

D2

Structure name: 97\159\1_4.mol

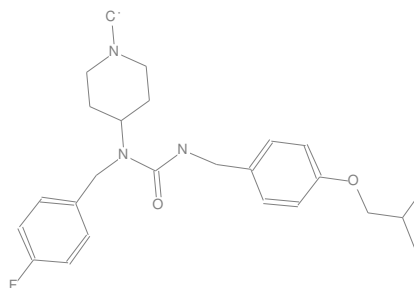
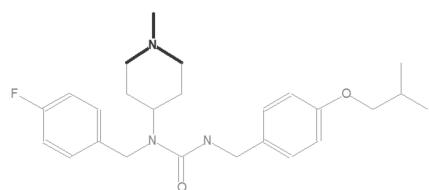
Formula: C₂₅H₃₂FN₃O₃

Gain: O **Loss:** H₂

Average mass: 441.547

Exact mass: 441.24277

Mass difference: 13.97926



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

I4r

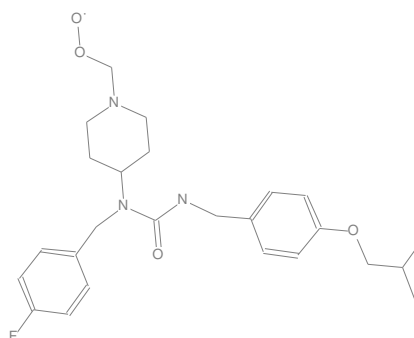
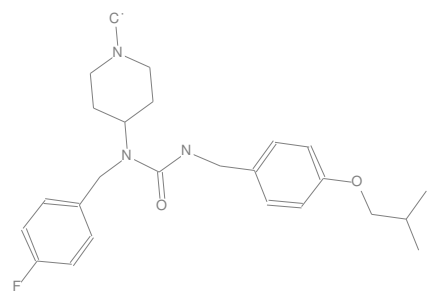
Structure name: 97\159\2_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I4r

Structure name: 97\159\2_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I5r

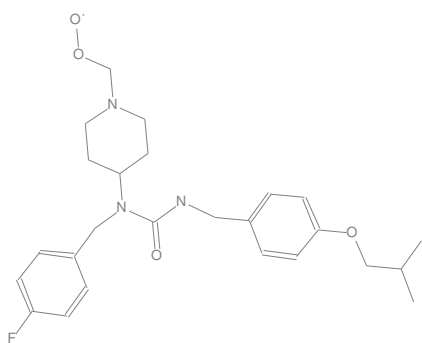
Structure name: 97\159\2_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I5r

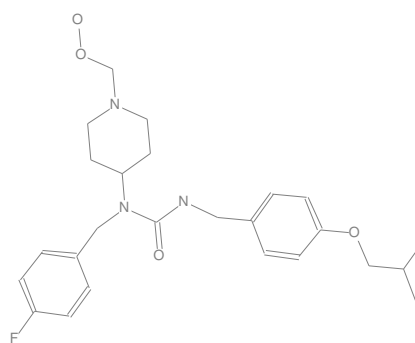
Structure name: 97\159\2_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I60

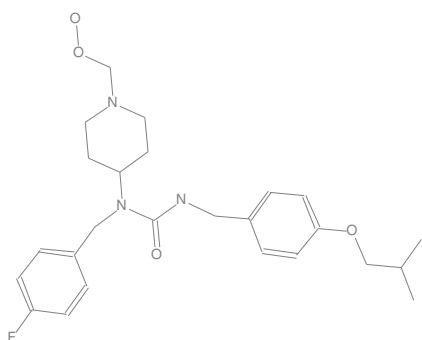
Structure name: 97\159\2_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I60

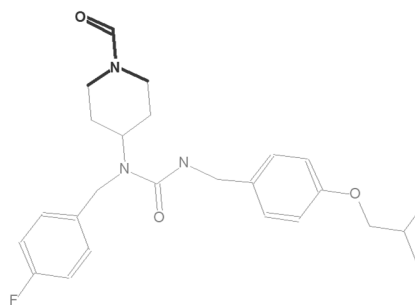
Structure name: 97\159\2_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



D3

Structure name: 97\159\2_4.mol

Formula: C₂₅H₃₂FN₃O₃

Gain: O **Loss:** H₂

Average mass: 441.547

Exact mass: 441.24277

Mass difference: 13.97926

Absolute Reasoning

[transformation 159 products] is LIKELY (Step likelihood)

[transformation 159] is [CERTAIN]

[conditions: oxygen and radical] is [CERTAIN]

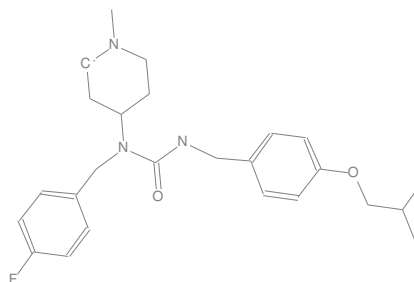
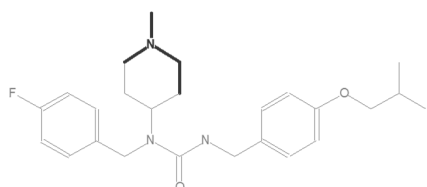
The step likelihood of this transformation is LIKELY

The pathway likelihood of these degradants (D2 and D3) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

180 Oxidation of tertiary amine to hemiaminal



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

I7r

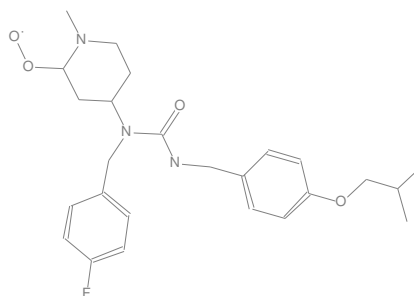
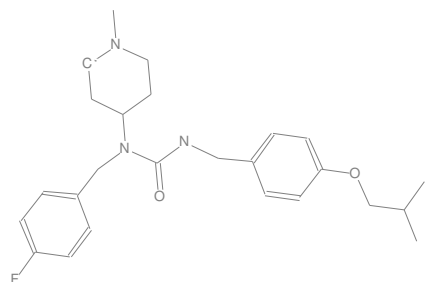
Structure name: 97\180\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I7r

Structure name: 97\180\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I8r

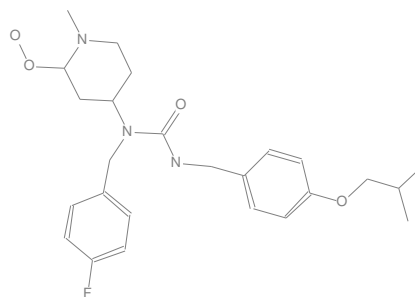
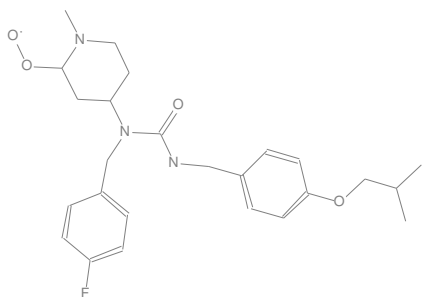
Structure name: 97\180\1_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I8r

Structure name: 97\180\1_2.mol

Formula: $C_{25}H_{33}FN_3O_4$

Gain: O_2 Loss: H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200

I9o

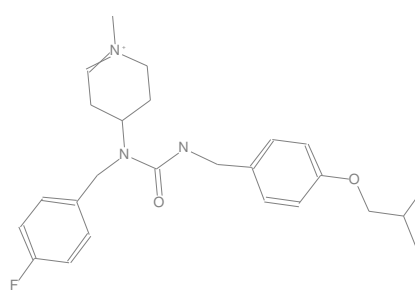
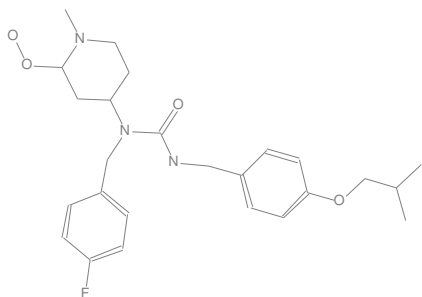
Structure name: 97\180\1_3.mol

Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_4$

Gain: O_2 Loss: None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I9o

Structure name: 97\180\1_3.mol

Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_4$

Gain: O_2 Loss: None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982

I10o

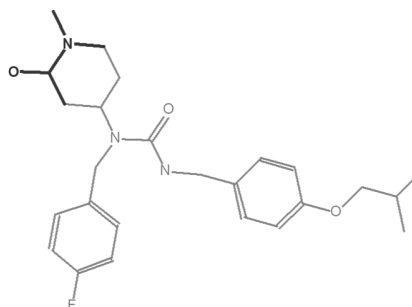
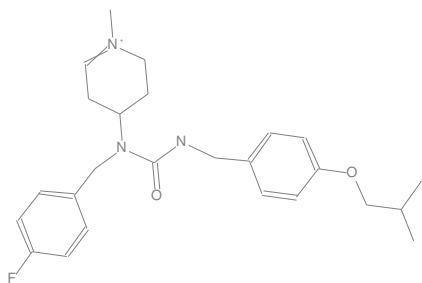
Structure name: 97\180\1_4.mol

Formula: $C_{25}H_{33}FN_3O_2$

Gain: None Loss: H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I10o

Structure name: 97\180\1_4.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

D4

Structure name: 97\180\1_5.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₃

Gain: O **Loss:** None

Average mass: 443.563

Exact mass: 443.25842

Mass difference: 15.99491

Absolute Reasoning

[transformation 180 products] is LIKELY (Step likelihood)

[transformation 180] is [CERTAIN]

[conditions: oxygen and radical] is [CERTAIN]

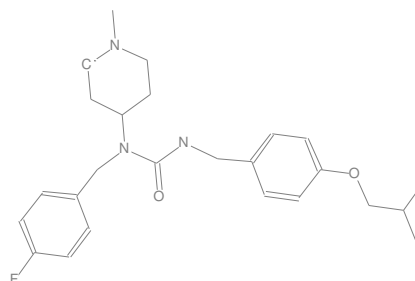
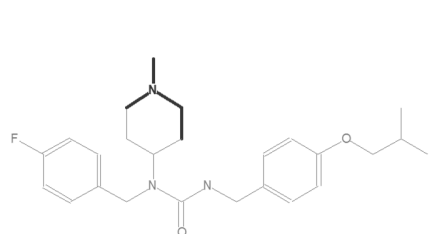
The step likelihood of this transformation is LIKELY

The pathway likelihood of this degradant (D4) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

293 Oxidation of tertiary amine to enamine



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

I11r

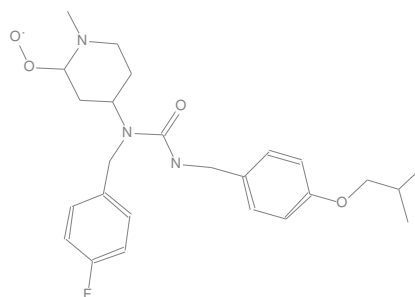
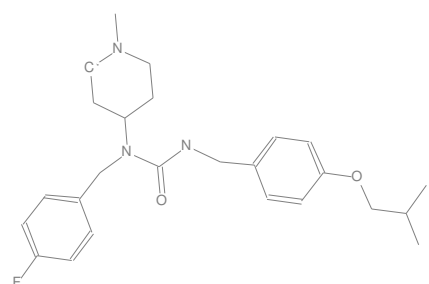
Structure name: 97\293\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I11r

Structure name: 97\293\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I12r

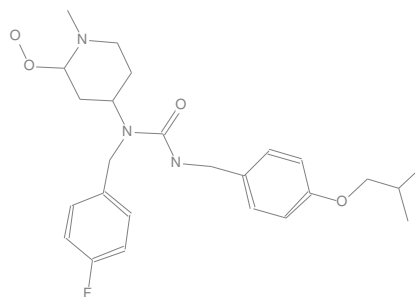
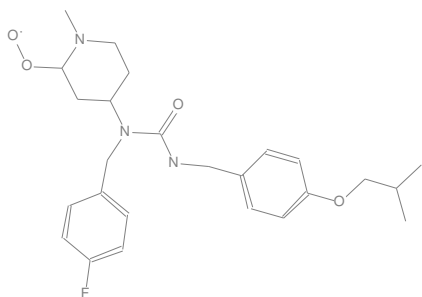
Structure name: 97\293\1_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I12r

Structure name: 97\293\1_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200

I13o

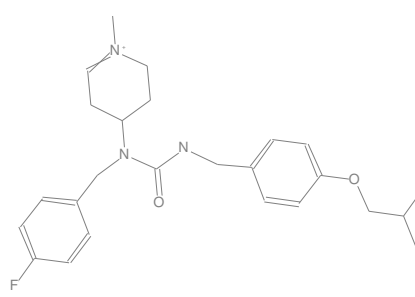
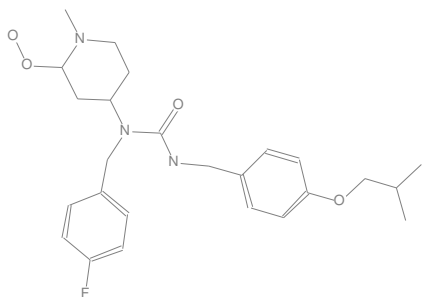
Structure name: 97\293\1_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I13o

Structure name: 97\293\1_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982

I14o

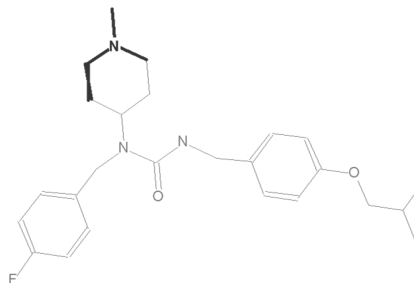
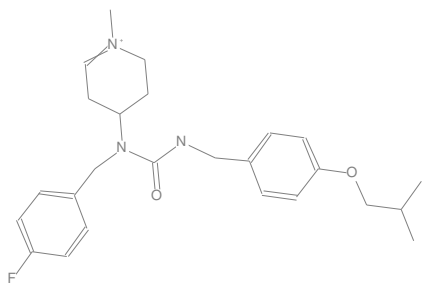
Structure name: 97\293\1_4.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I14o

Structure name: 97\293\1_4.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

D5

Structure name: 97\293\1_5.mol

Formula: C₂₅H₃₂FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H₂

Average mass: 425.548

Exact mass: 425.24786

Mass difference: -2.01565

Absolute Reasoning

[transformation 293 products] is LIKELY (Step likelihood)

[transformation 293] is [CERTAIN]

[conditions: oxygen and radical] is [CERTAIN]

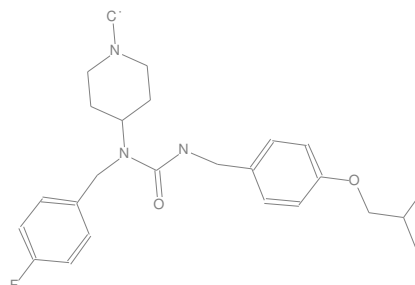
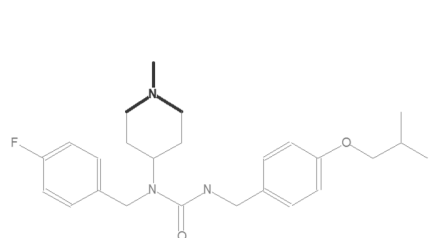
The step likelihood of this transformation is LIKELY

The pathway likelihood of this degradant (D5) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

412 Oxidative N-dealkylation of tertiary amine



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

I15r

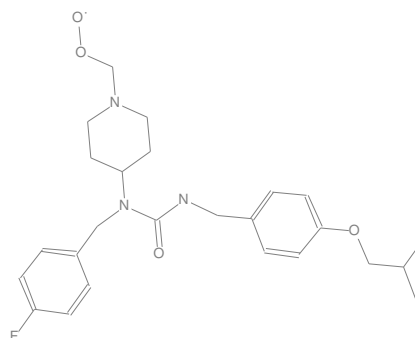
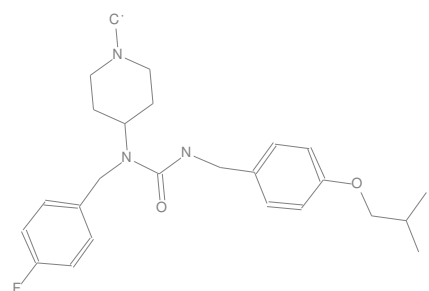
Structure name: 97\412\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I15r

Structure name: 97\412\1_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I16r

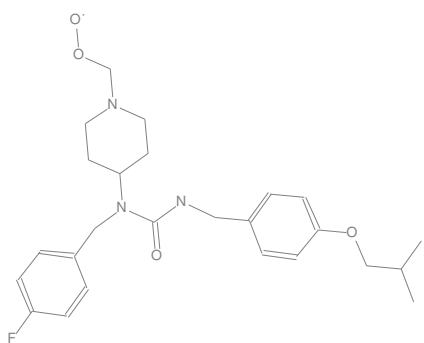
Structure name: 97\412\1_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I16r

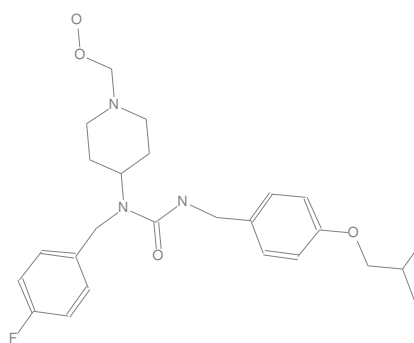
Structure name: 97\412\1_2.mol

Formula: $C_{25}H_{33}FN_3O_4$

Gain: O_2 Loss: H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I17o

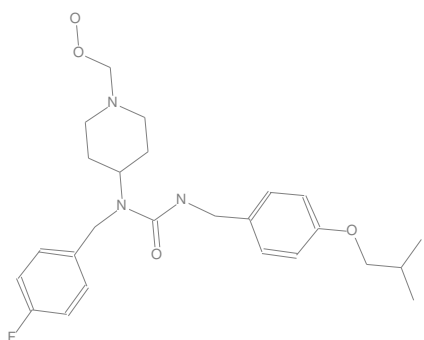
Structure name: 97\412\1_3.mol

Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_4$

Gain: O_2 Loss: None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I17o

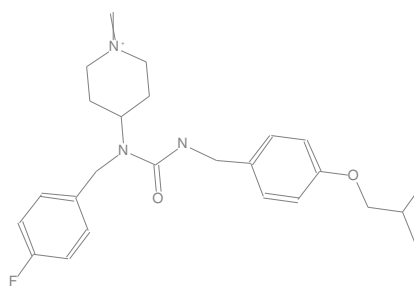
Structure name: 97\412\1_3.mol

Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_4$

Gain: O_2 Loss: None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I18o

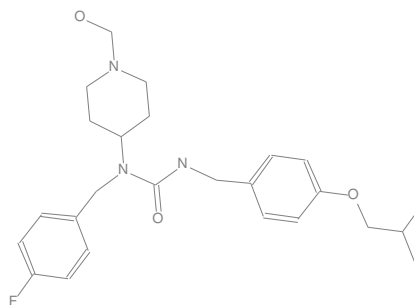
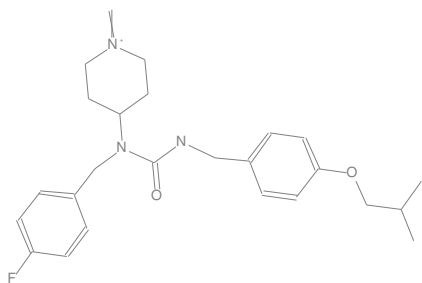
Structure name: 97\412\1_4.mol

Formula: $C_{25}H_{33}FN_3O_2$

Gain: None Loss: H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I18o

Structure name: 97\412\1_4.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I19o

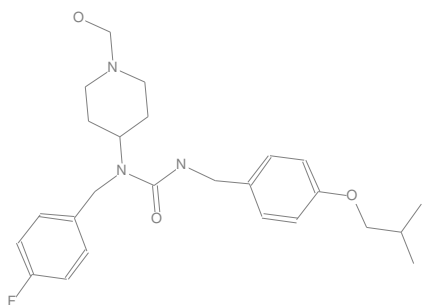
Structure name: 97\412\1_5.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₃

Gain: O **Loss:** None

Exact mass: 443.25842

Mass difference: 15.99491



I19o

Structure name: 97\412\1_5.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₃

Gain: O **Loss:** None

Exact mass: 443.25842

Mass difference: 15.99491

D6

Structure name: 97\412\1_6.mol

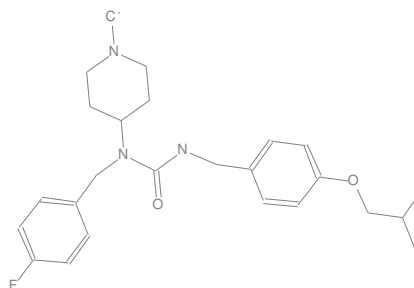
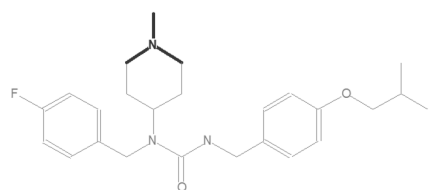
Formula: CH₂O

Gain: None **Loss:** C₂₄H₃₂FN₃O

Average mass: 30.026

Exact mass: 30.01056

Mass difference: -397.25295



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

I20r

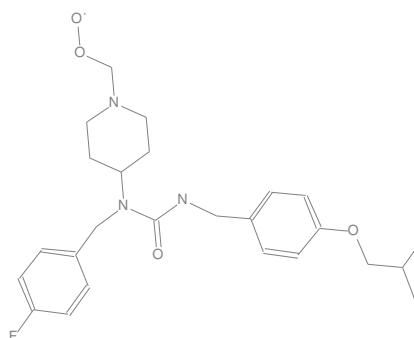
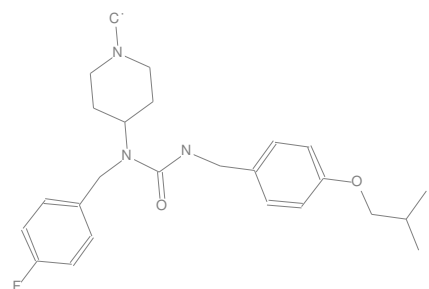
Structure name: 97\412\2_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I20r

Structure name: 97\412\2_1.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I21r

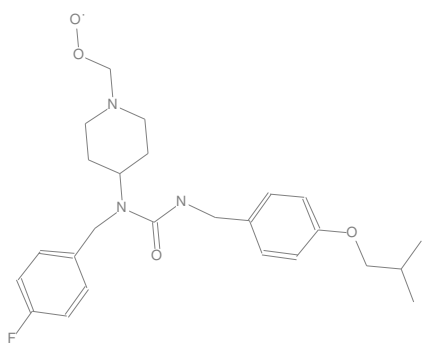
Structure name: 97\412\2_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I21r

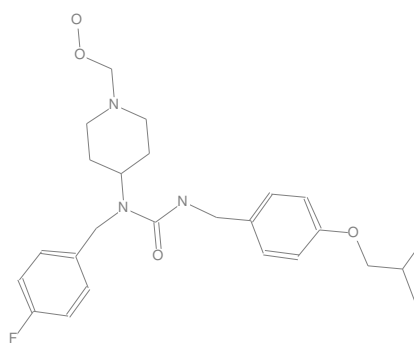
Structure name: 97\412\2_2.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** H

Exact mass: 458.24551

Mass difference: 30.98200



I22o

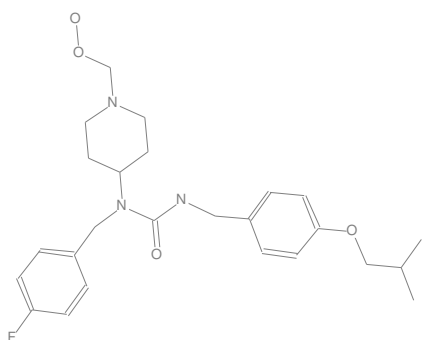
Structure name: 97\412\2_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I22o

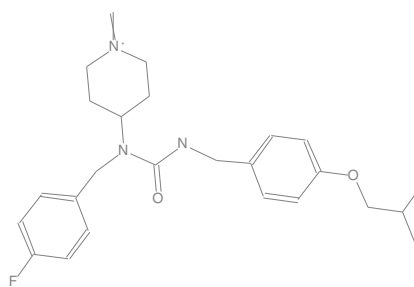
Structure name: 97\412\2_3.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₄

Gain: O₂ **Loss:** None

Exact mass: 459.25333

Mass difference: 31.98982



I23o

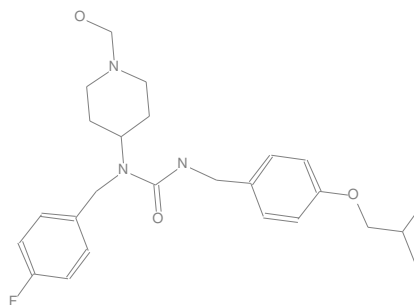
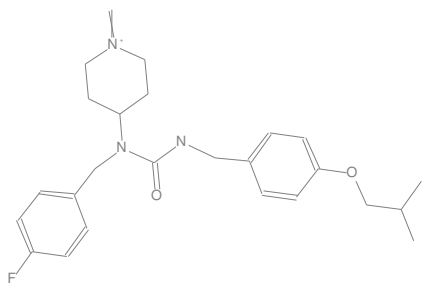
Structure name: 97\412\2_4.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783



I23o

Structure name: 97\412\2_4.mol

Formula: C₂₅H₃₃FN₃O₂

Gain: None **Loss:** H

Exact mass: 426.25568

Mass difference: -1.00783

I24o

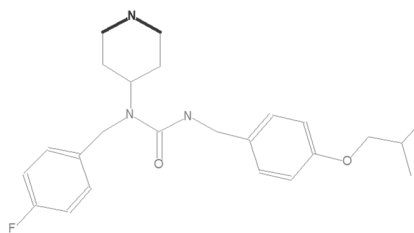
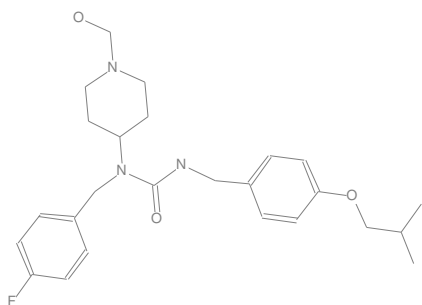
Structure name: 97\412\2_5.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₃

Gain: O **Loss:** None

Exact mass: 443.25842

Mass difference: 15.99491



I24o

Structure name: 97\412\2_5.mol

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₃

Gain: O **Loss:** None

Exact mass: 443.25842

Mass difference: 15.99491

D7

Structure name: 97\412\2_6.mol

Formula: C₂₄H₃₂FN₃O₂

Gain: None **Loss:** CH₂

Average mass: 413.537

Exact mass: 413.24786

Mass difference: -14.01565

Absolute Reasoning

[transformation 412 products] is LIKELY (Step likelihood)

[transformation 412] is [CERTAIN]

[conditions: oxygen and radical] is [CERTAIN]

The step likelihood of this transformation is LIKELY

The pathway likelihood of these degradants (D6 and D7) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

032 Oxidation of aldehyde



D6

Structure name: 97\412\1_6.mol

Formula: CH₂O

Gain: None **Loss:** C₂₄H₃₂FN₃O

Average mass: 30.026

Exact mass: 30.01056

Mass difference: -397.25295

D8

Structure name: 97\412\032\1_1.mol

Formula: CH₂O₂

Gain: None **Loss:** C₂₄H₃₂FN₃

Average mass: 46.025

Exact mass: 46.00548

Mass difference: -381.25803

Absolute Reasoning

[transformation 032 products] is VERY LIKELY (Step likelihood)

[transformation 032] is [CERTAIN]

[any oxidant] is [CERTAIN]

[conditions: oxygen] is [CERTAIN]

[conditions: peroxide] is [CERTAIN]

The pathway likelihood of the parent (D6) is LIKELY

The step likelihood of this transformation is VERY LIKELY

The pathway likelihood of this degradant (D8) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

Prilog P2. *In silico* predviđanje razgradnje u uvjetima kisele hidrolize

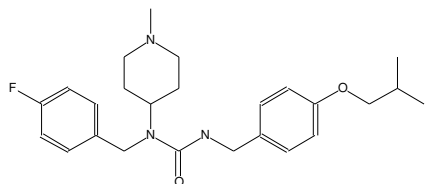
Program Settings and Processing Constraints

User name:	-
Date created:	23. svibanj 2019.
Program version:	Zeneth_7.1.3
Filename of knowledge base:	C:\Users\Public\Lhasa Limited\Zeneth KB 2018_1_0\Application\Z2018.1.0.mdb
Knowledge base version:	Zeneth7.0.0_01_12_2017
Knowledge base last modified date:	1. prosinac 2017.
Testing against:	All transformations
Absolute reasoning:	On
Likelihood at least:	Likely
Pathway likelihood:	Multiplied step likelihood
Relative reasoning:	By Level
Relative reasoning level(s):	Top level
Physical State:	Not specified
Condition set:	A
Temperature:	20°C
pH:	2
Water:	On
Oxygen:	Off
Metal:	Off
Radical initiator:	Off
Peroxide:	Off
Light:	Off
Perceive tautomers:	Off
Hydrogen options:	Perceive implicit and explicit hydrogens
Grow only from labelled degradants:	Off
Allow the query compound to react on its own:	Yes
Allow a degradant to react with itself:	No
Allow the query compound to react with itself and with degradants:	No
Maximum monomer count:	Off
Maximum total number of degradants:	400
Maximum number of steps in a pathway:	2
Autosave results (ZNT file):	Off
Autosave results directory:	Not applicable
Name field:	Not specified
Apply display filters:	Yes
Filter on chemical formula:	Off
Filter on exact mass:	Off
Filter on mass difference:	Off
Mass tolerance:	Not applicable
Show Duplicates:	Yes
Intermediates:	Show All

Submitted Compound(s)

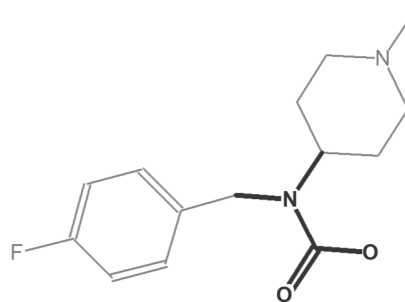
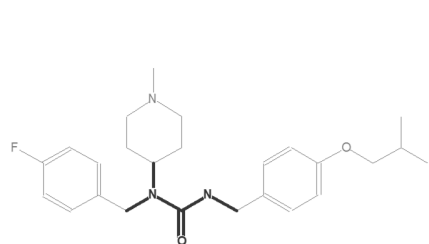
[Q]:	Pimavanserin.mol
Formula:	C ₂₅ H ₃₄ FN ₃ O ₂
Average mass:	427.564 Calculated by Zeneth
Exact mass:	427.26351 Calculated by Zeneth

[Q] Pimavanserin.mol:



Lhasa Predictions

017 Hydrolysis of urea



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

D1

Structure name: 98\017\1_1.mol

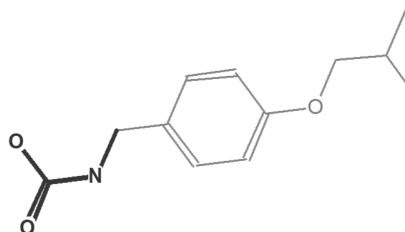
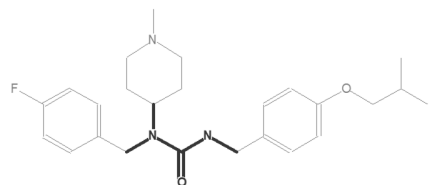
Formula: C₁₄H₁₉FN₂O₂

Gain: None **Loss:** C₁₁H₁₅N

Average mass: 266.316

Exact mass: 266.14306

Mass difference: -161.12045



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

D2

Structure name: 98\017\2_1.mol

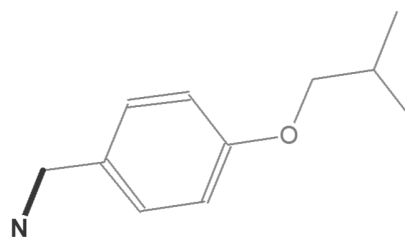
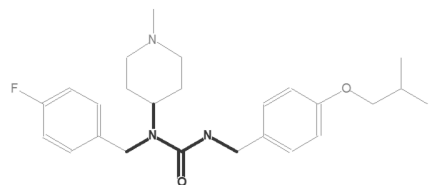
Formula: C₁₂H₁₇NO₃

Gain: O **Loss:** C₁₃H₁₇FN₂

Average mass: 223.272

Exact mass: 223.12084

Mass difference: -204.14267



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

D3 = D3

Structure name: 98\017\3_1.mol

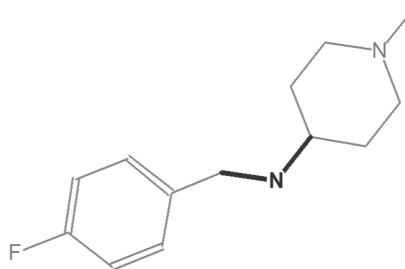
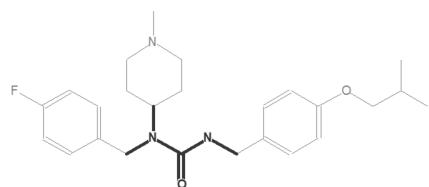
Formula: C₁₁H₁₇NO

Gain: None **Loss:** C₁₄H₁₇FN₂O

Average mass: 179.263

Exact mass: 179.13101

Mass difference: -248.13250



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

D4 = D4

Structure name: 98\017\4_1.mol

Formula: C₁₃H₁₉FN₂

Gain: None **Loss:** C₁₂H₁₅NO₂

Average mass: 222.307

Exact mass: 222.15323

Mass difference: -205.11028

Absolute Reasoning

[transformation 017 products] is VERY LIKELY (Step likelihood)

[transformation 017] is [CERTAIN]

[conditions: water] is [CERTAIN]

[pH < 4] is [CERTAIN]

pH is 2. User entered

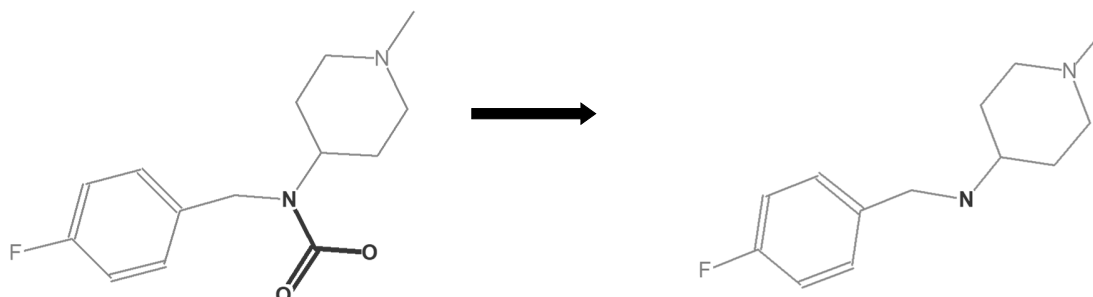
The step likelihood of this transformation is VERY LIKELY

The pathway likelihood of these degradants (D1, D2, D3 and D4) is VERY LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

019 Decarboxylation of carbamic acid or thio-analogue



D1

Structure name: 98\017\1_1.mol

Formula: C₁₄H₁₉FN₂O₂

Gain: None **Loss:** C₁₁H₁₅N

Average mass: 266.316

Exact mass: 266.14306

Mass difference: -161.12045

D5 = D4

Structure name: 98\017\019\1_1.mol

Formula: C₁₃H₁₉FN₂

Gain: None **Loss:** C₁₂H₁₅NO₂

Average mass: 222.307

Exact mass: 222.15323

Mass difference: -205.11028

Absolute Reasoning

[transformation 019 products] is CERTAIN (Step likelihood)

[transformation 019] is [CERTAIN]

The pathway likelihood of the parent (D1) is VERY LIKELY

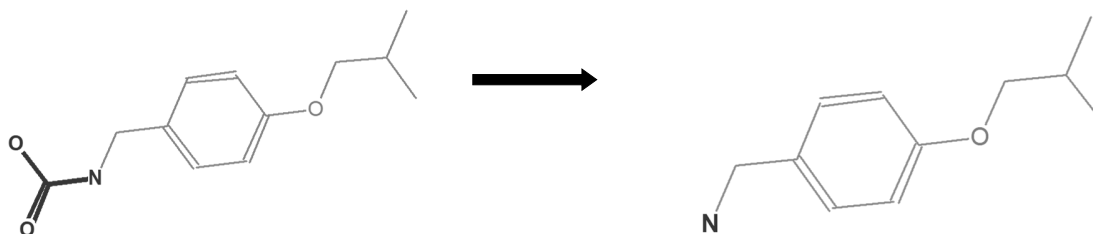
The step likelihood of this transformation is CERTAIN

The pathway likelihood of this degradant (D5) is VERY LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

019 Decarboxylation of carbamic acid or thio-analogue



D2

Structure name: 98\017\2_1.mol

Formula: C₁₂H₁₇NO₃

Gain: O **Loss:** C₁₃H₁₇FN₂

Average mass: 223.272

Exact mass: 223.12084

Mass difference: -204.14267

D6 = D3

Structure name: 98\017\019\2_1.mol

Formula: C₁₁H₁₇NO

Gain: None **Loss:** C₁₄H₁₇FN₂O

Average mass: 179.263

Exact mass: 179.13101

Mass difference: -248.13250

Absolute Reasoning

[transformation 019 products] is CERTAIN (Step likelihood)

[transformation 019] is [CERTAIN]

The pathway likelihood of the parent (D2) is VERY LIKELY

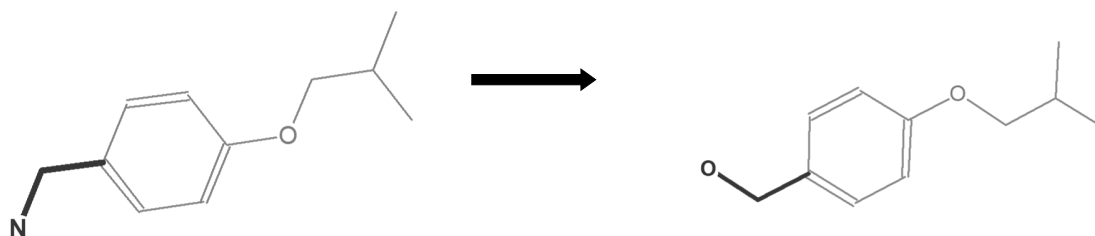
The step likelihood of this transformation is CERTAIN

The pathway likelihood of this degradant (D6) is VERY LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

110 Hydrolysis of amine



D3 = D3

Structure name: 98\017\3_1.mol

Formula: C₁₁H₁₇NO

Gain: None **Loss:** C₁₄H₁₇FN₂O

Average mass: 179.263

Exact mass: 179.13101

Mass difference: -248.13250

D7

Structure name: 98\017\110\1_1.mol

Formula: C₁₁H₁₆O₂

Gain: None **Loss:** C₁₄H₁₈FN₃

Average mass: 180.247

Exact mass: 180.11503

Mass difference: -247.14848

Absolute Reasoning

[transformation 110 products] is VERY LIKELY (Step likelihood)

[transformation 110] is [CERTAIN]

[conditions: water] is [CERTAIN]

[pH < 4] is [CERTAIN]

pH is 2. User entered

The pathway likelihood of the parent (D3) is VERY LIKELY

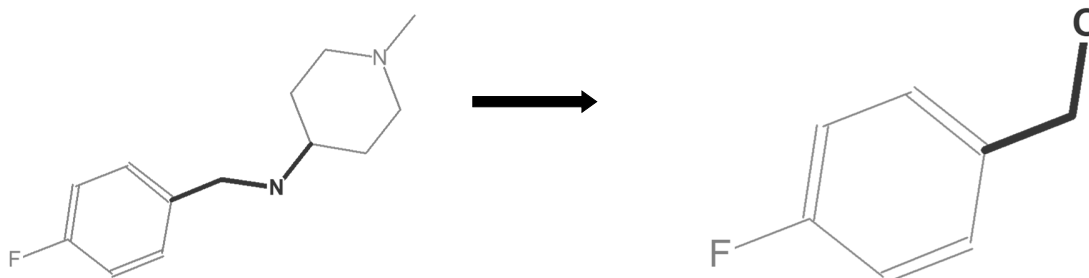
The step likelihood of this transformation is VERY LIKELY

The pathway likelihood of this degradant (D7) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

110 Hydrolysis of amine



D4 = D4

Structure name: 98\017\4_1.mol

Formula: C₁₃H₁₉FN₂

Gain: None **Loss:** C₁₂H₁₅NO₂

Average mass: 222.307

Exact mass: 222.15323

Mass difference: -205.11028

D8

Structure name: 98\017\110\2_1.mol

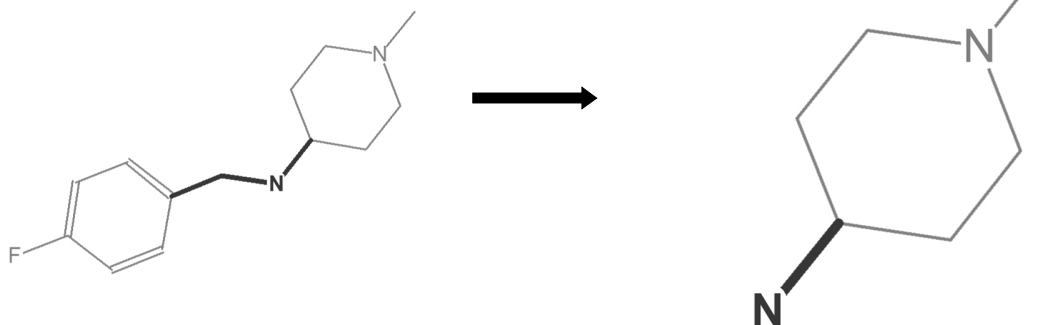
Formula: C₇H₇FO

Gain: None **Loss:** C₁₈H₂₇N₃O

Average mass: 126.13

Exact mass: 126.04809

Mass difference: -301.21542



D4 = D4

Structure name: 98\017\4_1.mol

Formula: C₁₃H₁₉FN₂

Gain: None **Loss:** C₁₂H₁₅NO₂

Average mass: 222.307

Exact mass: 222.15323

Mass difference: -205.11028

D9

Structure name: 98\017\110\3_1.mol

Formula: C₆H₁₄N₂

Gain: None **Loss:** C₁₉H₂₀FNO₂

Average mass: 114.192

Exact mass: 114.1157

Mass difference: -313.1478

Absolute Reasoning

[transformation 110 products] is VERY LIKELY (Step likelihood)

[transformation 110] is [CERTAIN]

[conditions: water] is [CERTAIN]

[pH < 4] is [CERTAIN]

pH is 2. User entered

The pathway likelihood of the parent (D4) is VERY LIKELY
The step likelihood of this transformation is VERY LIKELY
The pathway likelihood of these degradants (D8 and D9) is LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

Prilog P3. *In silico* predviđanje razgradnje u uvjetima bazične hidrolize

Program Settings and Processing Constraints

User name:	-
Date created:	23. svibanj 2019.
Program version:	Zeneth_7.1.3
Filename of knowledge base:	C:\Users\Public\Lhasa Limited\Zeneth KB 2018_1_0\Application\Z2018.1.0.mdb
Knowledge base version:	Zeneth7.0.0_01_12_2017
Knowledge base last modified date:	1. prosinac 2017.
Testing against:	All transformations
Absolute reasoning:	On
Likelihood at least:	Likely
Pathway likelihood:	Multiplied step likelihood
Relative reasoning:	By Level
Relative reasoning level(s):	Top level
Physical State:	Not specified
Condition set:	A
Temperature:	20°C
pH:	12
Water:	On
Oxygen:	Off
Metal:	Off
Radical initiator:	Off
Peroxide:	Off
Light:	Off
Perceive tautomers:	Off
Hydrogen options:	Perceive implicit and explicit hydrogens
Grow only from labelled degradants:	Off
Allow the query compound to react on its own:	Yes
Allow a degradant to react with itself:	No
Allow the query compound to react with itself and with degradants:	No
Maximum monomer count:	Off
Maximum total number of degradants:	400
Maximum number of steps in a pathway:	2
Autosave results (ZNT file):	Off
Autosave results directory:	Not applicable
Name field:	Not specified
Apply display filters:	Yes
Filter on chemical formula:	Off
Filter on exact mass:	Off
Filter on mass difference:	Off
Mass tolerance:	Not applicable
Show Duplicates:	Yes

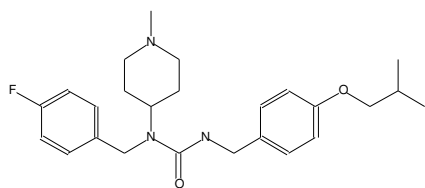
Intermediates:

Show All

Submitted Compound(s)

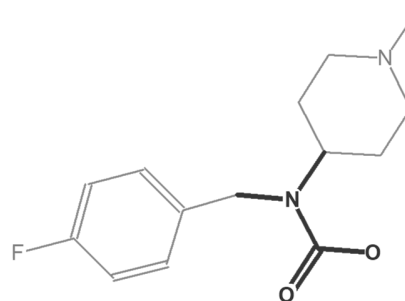
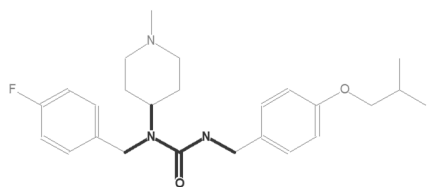
[Q]: Pimavanserin.mol
Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_2$
Average mass: 427.564 Calculated by Zeneth
Exact mass: 427.26351 Calculated by Zeneth

[Q] Pimavanserin.mol:



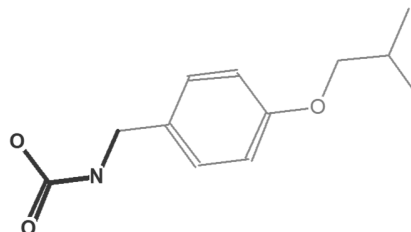
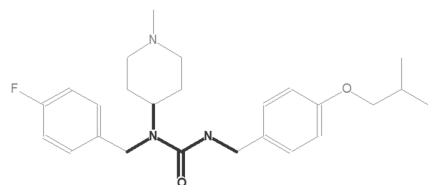
Lhasa Predictions

017 Hydrolysis of urea



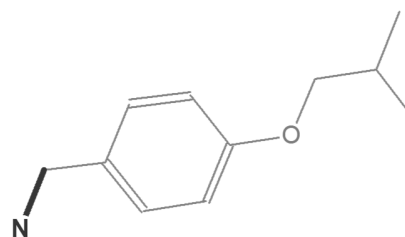
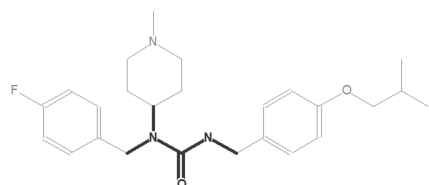
Q
Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_2$
Average mass: 427.564
Exact mass: 427.26351

D1
Structure name: 99\017\1_1.mol
Formula: $C_{14}H_{19}FN_2O_2$
Gain: None Loss: $C_{11}H_{15}N$
Average mass: 266.316
Exact mass: 266.14306
Mass difference: -161.12045



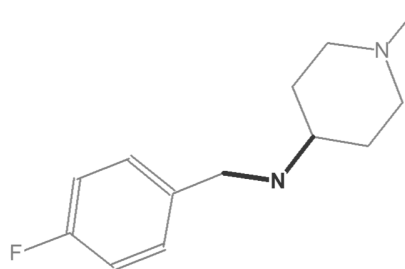
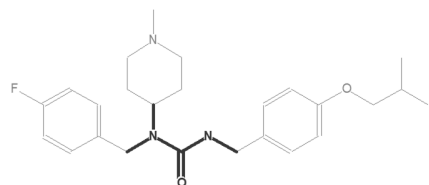
Q
Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_2$
Average mass: 427.564
Exact mass: 427.26351

D2
Structure name: 99\017\2_1.mol
Formula: $C_{12}H_{17}NO_3$
Gain: O **Loss:** $C_{13}H_{17}FN_2$
Average mass: 223.272
Exact mass: 223.12084
Mass difference: -204.14267



Q
Formula: $C_{25}H_{34}FN_3O_2$
Average mass: 427.564
Exact mass: 427.26351

D3 = D3
Structure name: 99\017\3_1.mol
Formula: $C_{11}H_{17}NO$
Gain: None **Loss:** $C_{14}H_{17}FN_2O$
Average mass: 179.263
Exact mass: 179.13101
Mass difference: -248.13250



Q

Formula: C₂₅H₃₄FN₃O₂

Average mass: 427.564

Exact mass: 427.26351

D4 = D4

Structure name: 99\017\4_1.mol

Formula: C₁₃H₁₉FN₂

Gain: None **Loss:** C₁₂H₁₅NO₂

Average mass: 222.307

Exact mass: 222.15323

Mass difference: -205.11028

Absolute Reasoning

[transformation 017 products] is VERY LIKELY (Step likelihood)

[transformation 017] is [CERTAIN]

[conditions: water] is [CERTAIN]

[pH > 10] is [CERTAIN]

pH is 12. User entered

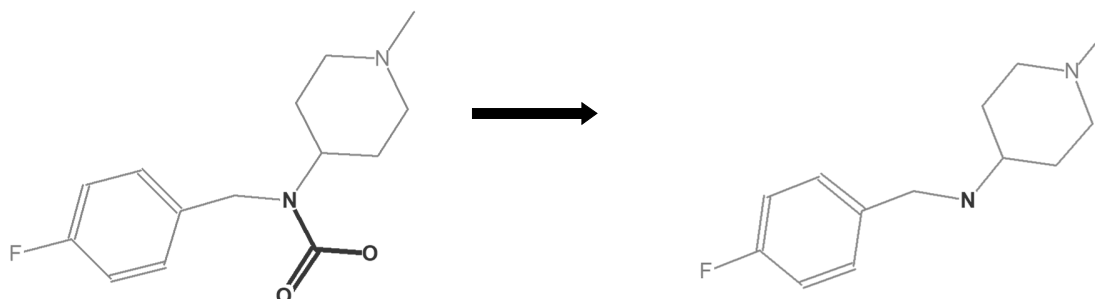
The step likelihood of this transformation is VERY LIKELY

The pathway likelihood of these degradants (D1, D2, D3 and D4) is VERY LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

019 Decarboxylation of carbamic acid or thio-analogue



D1

Structure name: 99\017\1_1.mol

Formula: C₁₄H₁₉FN₂O₂

Gain: None **Loss:** C₁₁H₁₅N

Average mass: 266.316

Exact mass: 266.14306

Mass difference: -161.12045

D5 = D4

Structure name: 99\017\019\1_1.mol

Formula: C₁₃H₁₉FN₂

Gain: None **Loss:** C₁₂H₁₅NO₂

Average mass: 222.307

Exact mass: 222.15323

Mass difference: -205.11028

Absolute Reasoning

[transformation 019 products] is CERTAIN (Step likelihood)

[transformation 019] is [CERTAIN]

The pathway likelihood of the parent (D1) is VERY LIKELY

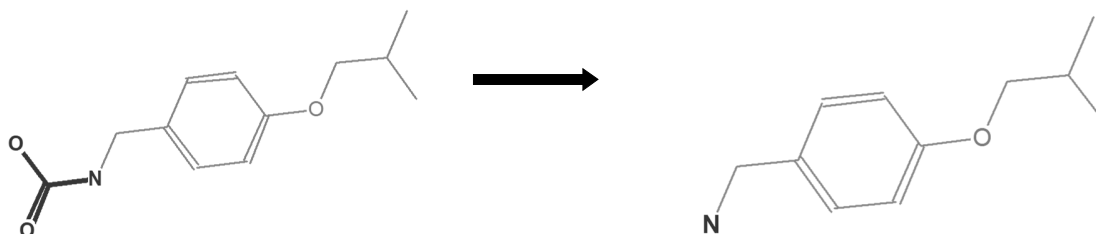
The step likelihood of this transformation is CERTAIN

The pathway likelihood of this degradant (D5) is VERY LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

019 Decarboxylation of carbamic acid or thio-analogue



D2

Structure name: 99\017\2_1.mol

Formula: C₁₂H₁₇NO₃

Gain: O **Loss:** C₁₃H₁₇FN₂

Average mass: 223.272

Exact mass: 223.12084

Mass difference: -204.14267

D6 = D3

Structure name: 99\017\019\2_1.mol

Formula: C₁₁H₁₇NO

Gain: None **Loss:** C₁₄H₁₇FN₂O

Average mass: 179.263

Exact mass: 179.13101

Mass difference: -248.13250

Absolute Reasoning

[transformation 019 products] is CERTAIN (Step likelihood)

[transformation 019] is [CERTAIN]

The pathway likelihood of the parent (D2) is VERY LIKELY

The step likelihood of this transformation is CERTAIN

The pathway likelihood of this degradant (D6) is VERY LIKELY

Relative Reasoning

No relative reasoning

Prilog P4. *In silico* predviđanje fotolitičke razgradnje

Program Settings and Processing Constraints

User name:	-
Date created:	23. svibanj 2019.
Program version:	Zeneth_7.1.3
Filename of knowledge base:	C:\Users\Public\Lhasa Limited\Zeneth KB 2018_1_0\Application\Z2018.1.0.mdb
Knowledge base version:	Zeneth7.0.0_01_12_2017
Knowledge base last modified date:	1. prosinac 2017.
Testing against:	All transformations
Absolute reasoning:	On
Likelihood at least:	Likely
Pathway likelihood:	Multiplied step likelihood
Relative reasoning:	By Level
Relative reasoning level(s):	Top level
Physical State:	Not specified
Condition set:	A
Temperature:	20°C
pH:	7
Water:	On
Oxygen:	Off
Metal:	Off
Radical initiator:	Off
Peroxide:	Off
Light:	On
Perceive tautomers:	Off
Hydrogen options:	Perceive implicit and explicit hydrogens
Grow only from labelled degradants:	Off
Allow the query compound to react on its own:	Yes
Allow a degradant to react with itself:	No
Allow the query compound to react with itself and with degradants:	No
Maximum monomer count:	Off
Maximum total number of degradants:	400
Maximum number of steps in a pathway:	2
Autosave results (ZNT file):	Off
Autosave results directory:	Not applicable
Name field:	Not specified
Apply display filters:	Yes
Filter on chemical formula:	Off
Filter on exact mass:	Off
Filter on mass difference:	Off
Mass tolerance:	Not applicable
Show Duplicates:	Yes
Intermediates:	Show All

Submitted Compound(s)

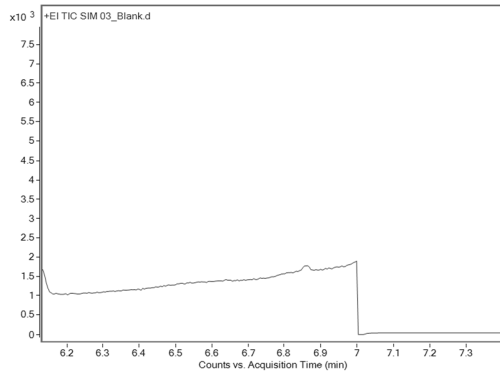
[Q]:	Pimavanserin.mol
Formula:	C ₂₅ H ₃₄ FN ₃ O ₂
Average mass:	427.564 Calculated by Zeneth
Exact mass:	427.26351 Calculated by Zeneth

Lhasa Predictions Nothing to report

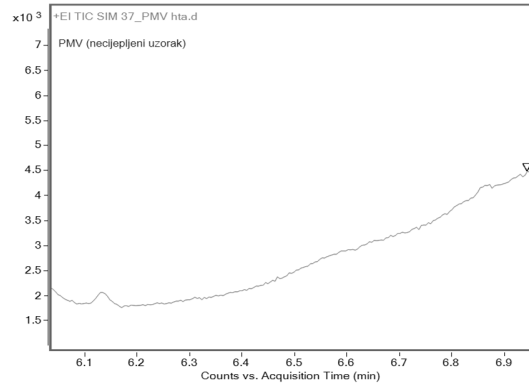
Prilog P5. GC-MS metode za kvantifikaciju izobutil-bromida (IMP-1): kromatografski uvjeti *headspace* metode

Kolona	Restek Rtx-5 Amine; 30 m × 250 μm × 1 μm		
Plin nosilac	dušik		
Temperatura injektora	150 °C		
Protok	1,5 mL/min		
Split ratio	10:1		
Temperaturni program	Brzina temperaturnog gradijenta / °C min⁻¹	Temperatura / °C	Trajanje / min
	/	42	3
	20	210	2
Vrijeme trajanja	13,4 min		
Detektor	Spektrometar masa		
Temperatura detektora	280 °C		
Diluent	dimetil sulfoksid		
Uvjeti statičkog <i>headspace</i> injektiranja			
Temperatura <i>headspace</i> pećnice	120 °C		
Temperatura petlje	130 °C		
Vrijeme punjenja petlje	0,02 min		
Vrijeme uspostave ravnoteže u petlji	0,30 min		
Temperatura transfer linije	140 °C		
Trešnja	Niska		
Volumen injektiranja	1,0 mL		
Vrijeme uravnoteženja (kuhanja) viala	15,00 min		

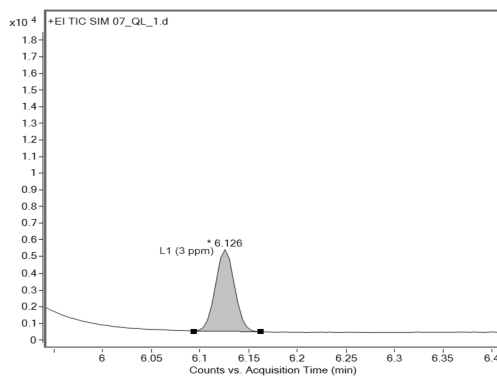
Prilog P7. Kromatogrami ispitivanja specifičnosti razvijene GC-MS metode za kvantifikaciju izobutil-bromida (IMP-1)



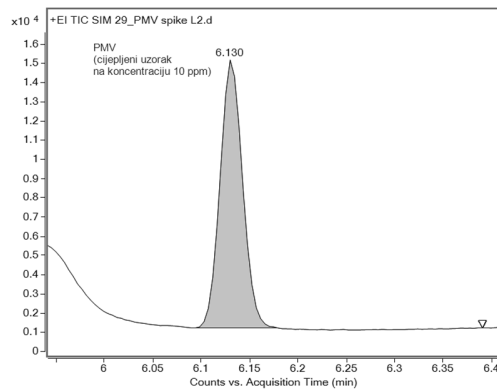
Slika P7.1. Kromatogram slijepe probe (diklormetan)



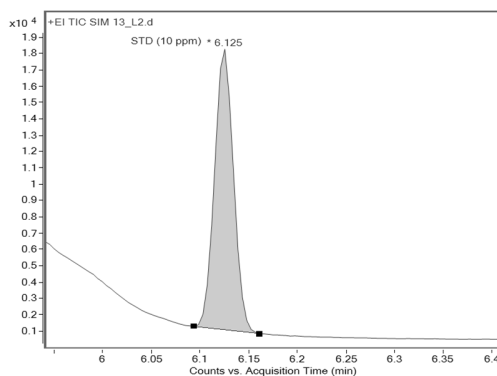
Slika P7.4. Kromatogram otopine necijepljenog PMV uzorka



Slika P7.2. Kromatogram otopine IMP-1 (0,06 µg/mL) korištene za određivanje granice kvantifikacije

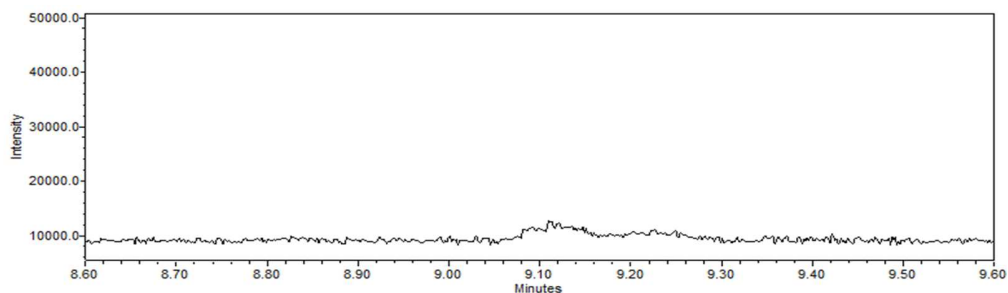


Slika P7.5. Kromatogram otopine pimavanserina (40 mg/mL) cijepljenog uzorka s 0,2 µg/mL IMP-1 (10 ppm u odnosu na nominalnu (radnu) koncentraciju PMV uzorka)

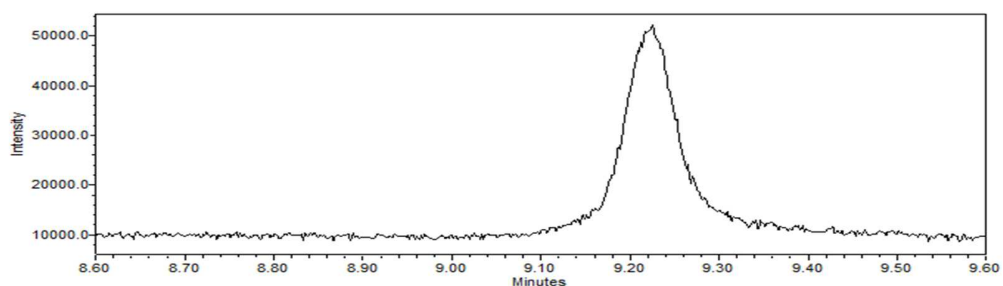


Slika P7.3. Kromatogram otopine IMP-1 (0,2 µg/mL)

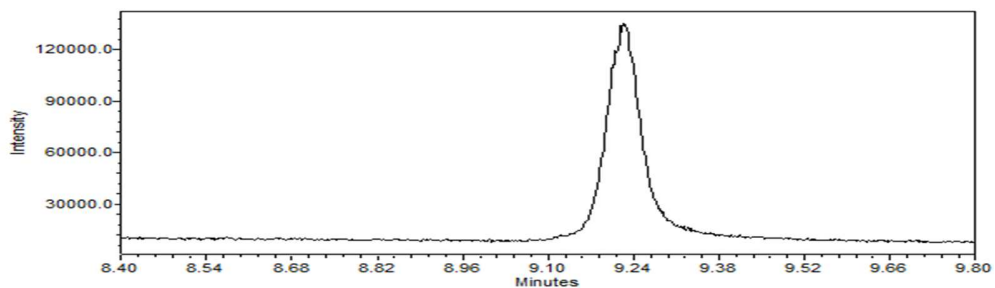
Prilog P8. Kromatogrami ispitivanja specifičnosti razvijene LC-MS metode za kvantifikaciju *N*-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)acetamida (IMP-2)



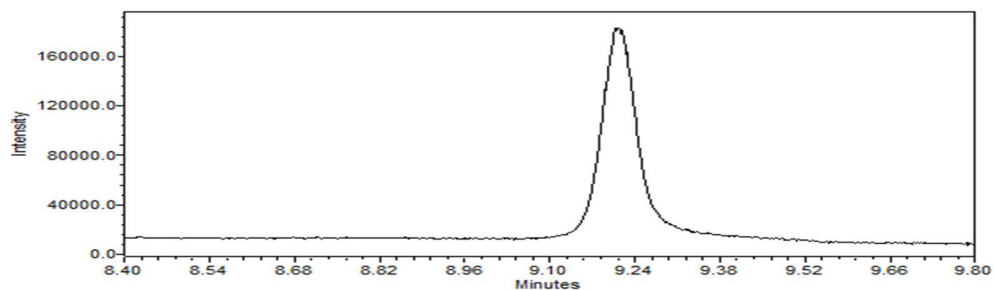
Slika P8.1. Kromatogram slijepe probe



Slika P8.2. Kromatogram otopine IMP-2 (0,03 µg/mL) korištene za određivanje granice kvantifikacije



Slika P8.3. Kromatogram otopineIMP -2 (0,1 µg/mL)



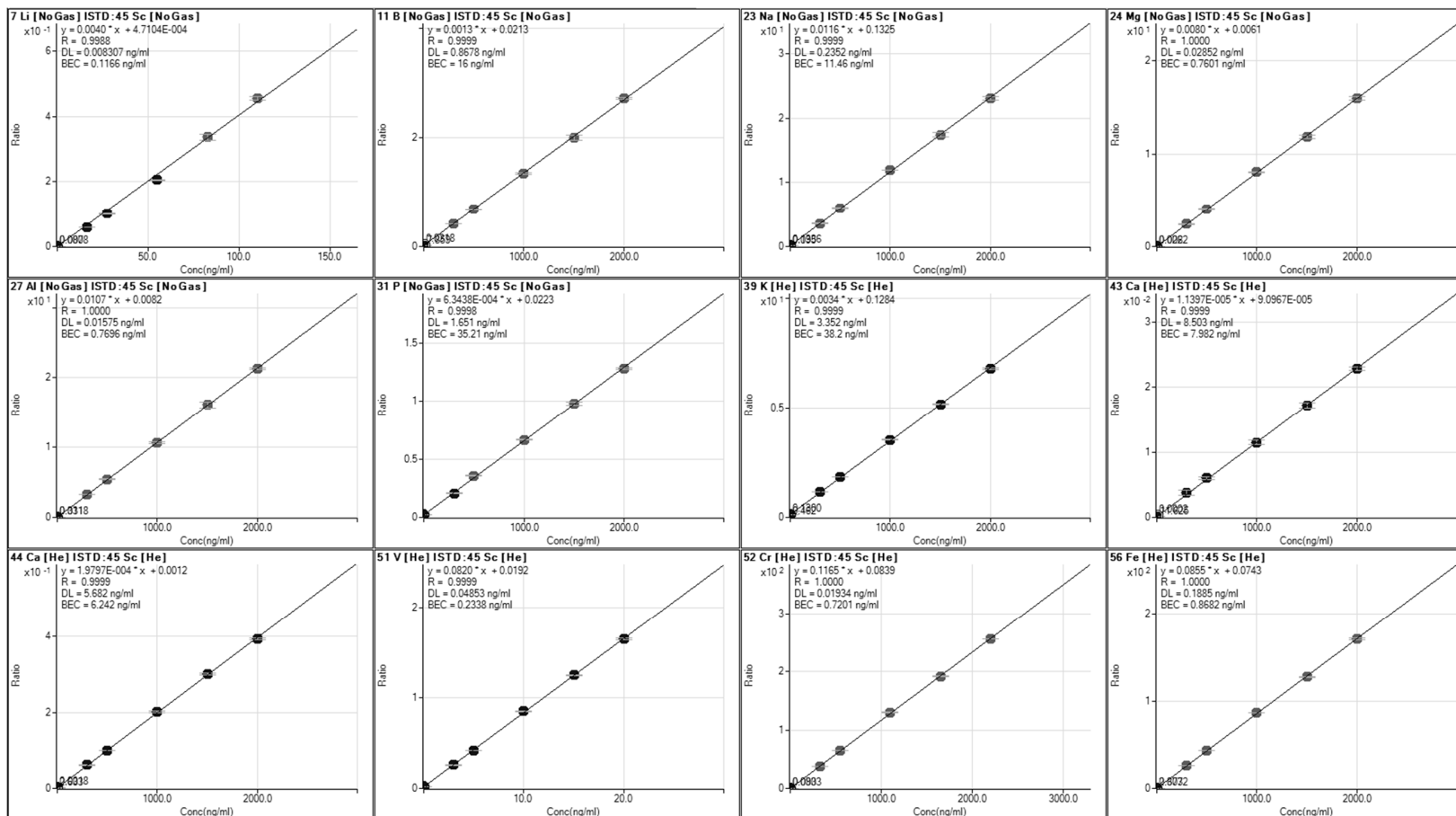
Slika P8.4. Kromatogram otopine pimavanserina (20 mg/mL) cijepljenog uzorka s 0,1 µg/mL IMP-1 (10 ppm u odnosu na nominalnu (radnu) koncentraciju PMV uzorka)

Prilog P9. Validacija ICP-MS metode za određivanje elementnih onečišćenja - koncentracije elemenata u temeljnim standardnim otopinama (TSO)

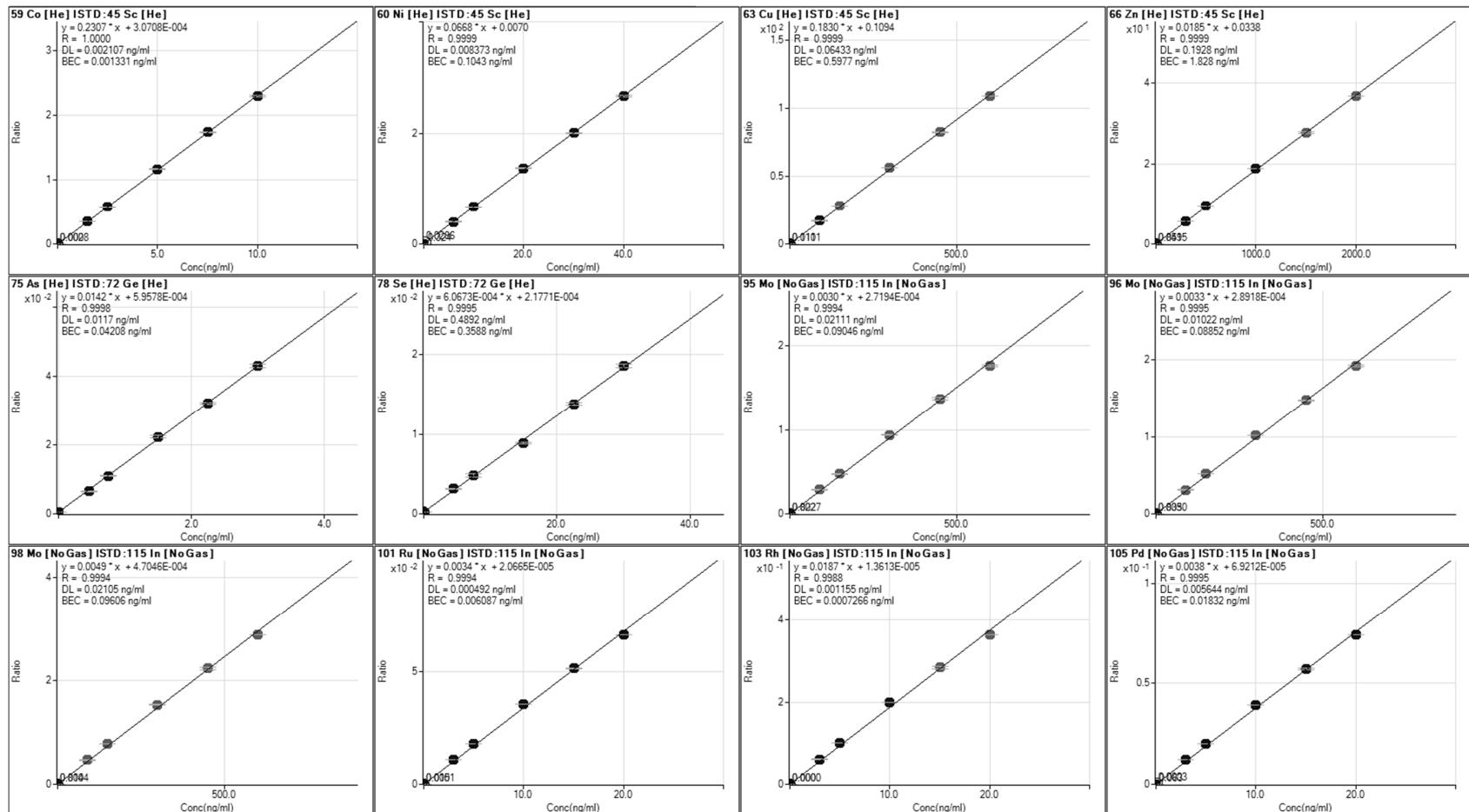
TSO 1		
Element	V (aliquot certificiranog referentnog standarda) (μL)	γ (μg/ml)
Cd	500	0,1
Pb	500	0,1
Co	50	1
Tl	800	0,16
Ag	150	3
As	1500	0,3
Ni	200	4
Se	150	3
Sb	1200	24
Cu	300	60
Li	550	11
Sn	600	120
Cr	1100	220
Mo	300	60
Ba	140	28
Rh	100	2
V	100	2
Au	100	2

TSO 2		
Element	V (aliquot certificiranog referentnog standarda) (μL)	γ (μg/ml)
Hg	30	0,6
Pd	100	2
Ir	100	2
Pt	100	2
Ru	100	2
Os	100	2

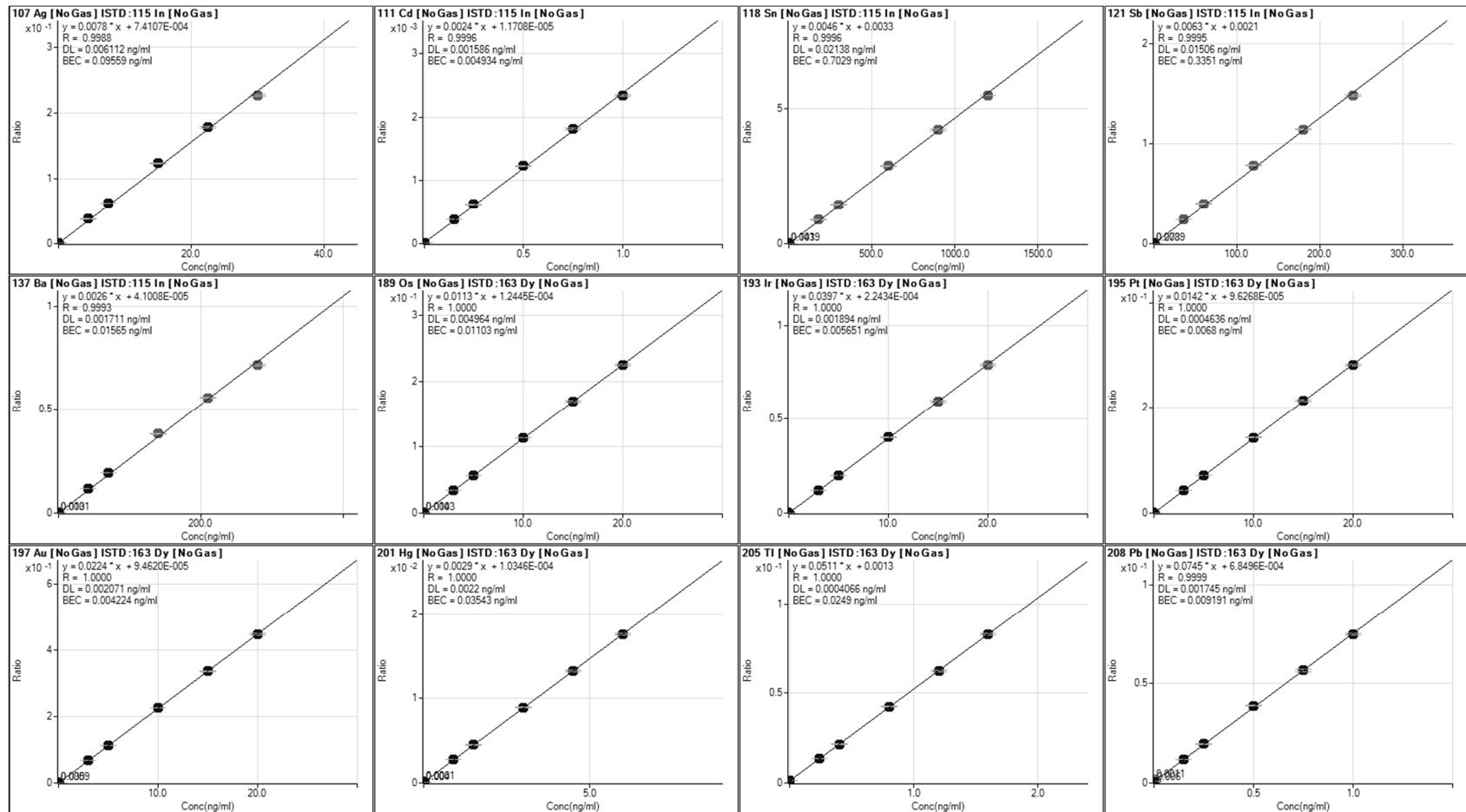
Prilog P10. Validacija ICP-MS metode za određivanje elementnih onečišćenja: ispitivanje linearnosti



Slika P10.1. Kalibracijski pravci ispitivanih elementnih onečišćenja dobiveni primjenom ICP-MS tehnike



Slika P10.2. Kalibracijski pravci ispitivanih elementnih onečišćenja dobiveni primjenom ICP-MS tehnike



Slika P10.3. Kalibracijski pravci ispitivanih elementnih onečišćenja dobiveni primjenom ICP-MS tehnike

ŽIVOTOPIS

Irena Radić [REDACTED] Godine 2005. završava Prirodoslovnu-matematičku gimnaziju u Metkoviću. Iste godine upisuje Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, gdje je 2011. stekla zvanje magistre inženjerke kemijskog inženjerstva izradivši diplomski rad po nazivom „Razvoj i vrednovanje metode određivanja askorbinske kiseline primjenom protočne analize injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Njegomira Radića. Dobitnica je Rektorove nagrade u akad. god. 2005./2006., te Dekanove nagrade u akad. god. 2009./2010. za izvanredne rezultate postignute tijekom studija. Godine 2012. zapošljava se u PLIVI - Istraživanje i razvoj, odjel Analitike istraživanja i razvoja ljekovitih djelatnih tvari (Teva API), a od prosinca 2018. zaposlena je na radnom mjestu više voditeljice grupe u Analitici istraživanja i razvoja. Godine 2019. upisuje sveučilišni znanstveni poslijediplomski doktorski studij Kemijsko inženjerstvo i primijenjena kemija u okviru kojega izrađuje doktorski rad pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić. Rezultate svojih dosadašnjih istraživanja prikazala je u tri znanstvena rada objavljena u časopisima citiranim u bazi *Web of Science Core Collection* (WoSCC). Aktivno je sudjelovala na jedanaest međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova s posterskim priopćenjima.

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA:

1. I. Radić, M. Runje, S. Babić, Development of an analytical method for the determination of pimavanserin and its impurities applying analytical quality by design principles as a risk-based strategy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 201 (2021), 114091. doi:10.1016/j.jpba.2021.114091
2. I. Radić, M. Runje, M. Cvetnić, M. Halužan, M. Jeličić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, V. Prevarić, Š. Ukić, T. Bolanča, Validation of the ICP-MS method for determination of trace elements provided by ICH Q3D guideline in fosamprenavir calcium, *KUI* 70 (2021), 11-12; 701-709. doi:10.15255/KUI.2021.004
3. A. Gaggero, B. Jurišić Dukovski, I. Radić, I. Šagud, I. Škorić, D. Cinčić, M. Jug, Co-grinding with surfactants as a new approach to enhance in vitro dissolution of praziquantel, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 189 (2020), 113494–113494. doi:10.1016/j.jpba.2020.113494