

Razvoj i validacija analitičkih metoda za određivanje potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u pimavanserin ljekovitoj djelatnoj tvari

Boričević, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:164918>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-20**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marta Boričević

**RAZVOJ I VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE
POTENCIJALNIH GENOTOKSIČNIH ONEČIŠĆENJA U PIMAVANSERIN
LJEKOVITOJ DJELATNOJ TVARI**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Martina Biošić

Zagreb, srpanj 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Analitike istraživanja i razvoja Pliva, Prilaz b. Filipovića 25, Zagreb, pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić i neposrednim vodstvom mag. ing. cheming. Irene Radić u sklopu Sveučilišnog diplomskog studija kemije i inženjerstva materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na pruženoj prilici, razumijevanju te stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.

Također se zahvaljujem mag. ing. cheming. Ireni Radić na povjerenju, susretljivosti, pruženoj pomoći i prenesenom znanju.

Hvala i cijelom timu na nesebičnoj pomoći, korisnim savjetima i prijateljskoj atmosferi u laboratoriju tijekom izrade ovog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji i prijateljima na ljubavi i velikoj podršci tijekom studija te vjeri u moj uspjeh.

SAŽETAK

Pimavanserin je farmaceutik koji se koristi za liječenje halucinacija i zabluda kod psihoze povezane s Parkinsonovom bolešću. Potencijalna onečišćenja u ljekovitoj djelatnoj tvari mogu nastati tijekom procesa proizvodnje ili skladištenjem gotovog lijeka. Također, onečišćenja mogu imati genotoksični učinak, stoga je vrlo važna njihova kontrola. Svrha ovog rada je razviti i validirati analitičke metode kako bi se pouzdano mogla odrediti potencijalna genotoksična onečišćenja u pimavanserin ljekovitoj djelatnoj tvari. Tekućinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa (LC-MS) i plinska kromatografija vezana sa spektrometrijom masa (GC-MS) spregnute su metode koje su korištene u ovom radu. Tijekom validacije analitičkih metoda ispitani su sljedeći parametri: specifičnost, linearnost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, ponovljivost, stabilnost otopine te robusnost.

Ključne riječi: pimavanserin, genotoksična onečišćenja, LC-MS, GC-MS, validacija analitičke metode

SUMMARY

Pimavanserin is a pharmaceutical used to treat hallucinations and delusions in psychosis associated with Parkinson's disease. Potential impurities in the drug active substance may occur during the manufacturing process or storage of the finished drug. Also, impurities can have a genotoxic effect, so their control is very important. The purpose of this study is to develop and validate analytical methods in order to reliably determine potential genotoxic impurities in pimavanserin drug active substance. Liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) are the combined methods used in this work. During the validation of the analytical methods, the following parameters were examined: specificity, linearity, accuracy, limit of detection, limit of quantification, repeatability, stability of the solution, and robustness.

Keywords: pimavanserin, genotoxic impurities, LC-MS, GC-MS, validation of analytical method

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Pimavanserin.....	2
2.2. Onečišćenja u farmaceuticima	3
2.3. Genotoksičnost	4
2.3.1. Važnost ispitivanja genotoksičnosti.....	6
2.3.2. Kontrola genotoksičnih onečišćenja	6
2.4. Spregnute analitičke tehnike	8
2.4.1. Tekućinska kromatografija – spektrometrija masa.....	9
2.4.2. Plinska kromatografija – spektrometrija masa	10
2.5. Detektori.....	13
2.5.1. Spektrometar masa	14
2.5.2. Plameno-ionizacijski detektor	17
2.5.3. Detektor s nizom fotodioda (eng. <i>Photodiode Array Detector</i> – PDA ili <i>Diode array detector</i> - DAD)	17
2.6. Validacija analitičkih metoda	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Materijali	21
3.1.1. Kemikalije.....	21
3.1.2. Pimavanserin i potencijalna genotoksična onečišćenja.....	22
3.2. Instrumenti	23
3.2.1. Analitička vaga.....	23
3.2.2. Plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa	23
3.2.3. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa	25
3.3. Metode rada	26
3.3.1. Razvoj GC-MS metode	26
3.3.1.1. Priprema otopina	29
3.3.1.2. Priprema otopina onečišćenja IMP-1 za provjeru linearnosti i odstupanja od linearnosti analitičke metode	29
3.3.1.3. Priprema otopina za određivanje granice kvantifikacije i detekcije	30
3.3.1.4. Priprema otopina za provjeru ponovljivosti	31
3.3.1.5. Priprema otopina za provjeru točnosti metode	31
3.3.1.6. Priprema otopina za provjeru stabilnost	32
3.3.1.7. Ispitivanje robusnosti.....	32
3.3.2. Razvoj LC-MS metode	32

3.3.2.1. Priprema otopina	34
3.3.2.2. Priprema otopina onečišćenja IMP-2 za provjeru linearnosti i odstupanja od linearnosti analitičke metode	34
3.3.2.3. Priprema otopina za provjeru ponovljivosti	35
3.3.2.4. Priprema otopina za provjeru točnosti metode	35
3.3.2.5. Priprema otopina za provjeru stabilnosti.....	36
3.3.2.6. Ispitivanje robusnosti.....	36
4. REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1. Validacija GC-MS metode	38
4.1.1. Specifičnost	38
4.1.2. Linearnost	41
4.1.3. Odstupanje od linearnosti analitičke metode.....	43
4.1.4. Ispitivanje ponovljivosti	44
4.1.5. Točnost	44
4.1.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	49
4.1.7. Stabilnost otopine	50
4.1.8. Robusnost	50
4.2. Validacija LC-MS metode.....	58
4.2.1. Specifičnost	58
4.2.2. Linearnost	60
4.2.3. Odstupanje od linearnosti analitičke metode.....	62
4.2.4. Ispitivanje ponovljivosti	63
4.2.5. Točnost	63
4.2.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	68
4.2.7. Stabilnost otopine	68
4.2.8. Robusnost	69
4.3. Sažetak rezultata	75
5. ZAKLJUČAK.....	76
6. LITERATURA.....	77

1. UVOD

Onečišćenja su neželjene tvari u lijekovima koje mogu utjecati na učinkovitost i sigurnost farmaceutskih proizvoda, čak i u vrlo malim količinama. Sigurnost farmaceutskog proizvoda ovisi o toksikološkim svojstvima aktivne tvari, kao i o svojstvima onečišćenja koja mogu nastati u procesu proizvodnje, kroz uporabu ili skladištenjem lijeka. Stoga su identifikacija, kvantifikacija i kontrola onečišćenja u lijekovima važni dijelovi razvoja lijekova za dobivanje odobrenja za stavljanje na tržište. Posebno je važna kontrola genotoksičnih onečišćenja, koja mogu oštetiti DNA i uzrokovati mutacije, te definirati njihov prihvatljiv unos ovisno o učestalosti njihovog konzumiranja. Regulatorna tijela u cijelom svijetu zahtijevaju podatke o genotoksičnom potencijalu novih lijekova, kao dio postupka procjene sigurnosti. Primjenom vezanih separacijskih i spektrometrijskih tehnika moguće je razviti analitičke metode za identifikaciju i kvantitativno određivanje onečišćenja u ljekovitoj djelatnoj tvari.

2. TEORIJSKI DIO

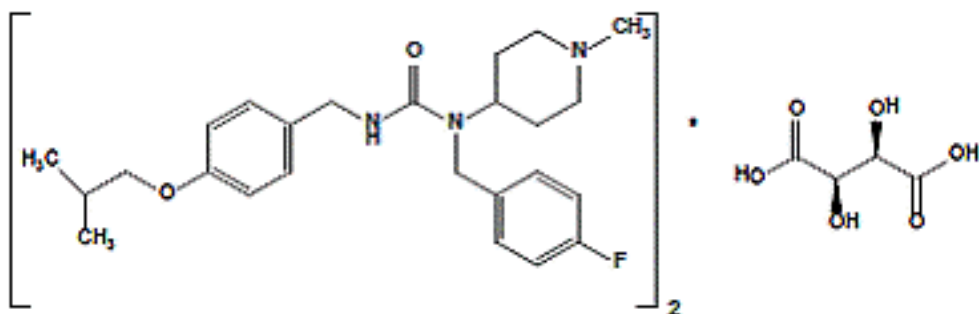
2.1. Pimavanserin

Pimavanserin (Slika 1) je atipični antipsihotik koji je poznat i pod trgovačkim nazivom Nuplazid. Razvila ga je biofarmaceutska tvrtka *Acadia Pharmaceuticals*. U Nuplazidu je prisutan kao sol pimavanserin tartarat IUPAC naziva (2R,3R)-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. Njegova molekulska formula je $(C_{25}H_{34}FN_3O_2)_2 \cdot C_4H_6O_6$, a molekulska masa mu iznosi 1005,20 (sol tartarata) [1].

Godine 2016. Američka agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) odobrila je pimavanserin kao prvi atipični antipsihotik koji ne uzrokuje klinički značajan antagonizam dopaminergičkih, adrenergičnih, histaminergičkih ili muskarinskih receptora. To je prvi lijek koji je indiciran za liječenje halucinacija i zabluda kod psihoze povezane s Parkinsonovom bolešću. Iako je točan mehanizam djelovanja pimavanserina nepoznat, teoretizirana je kombinacija inverznog djelovanja agonista i antagonista na serotoninске 2A receptore (5-HT_{2A}) i, u manjoj mjeri, na 5-HT_{2C} receptore [1].

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. Iako se čini da je pimavanserin siguran i dobro se podnosi kod pacijenata s Parkinsonovom bolešću, propisivači trebaju biti svjesni mogućih štetnih učinaka, uključujući produljenje QT intervala i potencijal da uzrokuje paradoksalno pogoršanje psihoze. Potrebna su dodatna klinička ispitivanja kako bi se utvrdila dugoročna sigurnost i djelotvornost pimavanserina te kako bi se utvrdilo je li učinkovit u liječenju psihoza povezanih s neurološkim poremećajima koji nisu Parkinsonova bolest [1].



Slika 1. Kemijska struktura pimavanserina [1]

2.2. Onečišćenja u farmaceuticima

Neželjene kemikalije prisutne u lijekovima, za koje se smatra da su nečistoće, mogu utjecati na učinkovitost i sigurnost farmaceutskih proizvoda, čak i u vrlo malim količinama. Godine 1994. međunarodna regulatorna tijela kao što su ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za primjenu kod ljudi), FDA i EMA (*European Medicines Agency*, Europska agencija za lijekove) odredila su određene propise za onečišćenja u farmaceutskim proizvodima, a posebno za genotoksična onečišćenja koja mogu izazvati mutagenezu i kancerogenezu kod ljudi [2].

Prema smjernicama ICH, onečišćenje je svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar ili svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u proizvodu. Onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Ona se u ljekovitu tvar mogu unijeti polaznim sirovinama, mogu nastati kao međuprodukti u složenom proizvodnom postupku ljekovite tvari te skladištenjem gotovog lijeka. Također, onečišćenja mogu biti i produkti razgradnje ljekovite tvari djelovanjem svjetla, temperature, prisutnosti vode ili promjenom pH [3].

U Europskoj farmakopeji onečišćenja se još dijele na specificirana onečišćenja i ostala onečišćenja koja se mogu dokazati. Specificirana onečišćenja su stvarna, a mogu biti identificirana i neidentificirana. Identificirana onečišćenja imaju karakteriziranu kemijsku strukturu, dok su neidentificirana onečišćenja definirana isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvima, poput kromatografskog vremena zadržavanja. Ostala onečišćenja koja se mogu dokazati su potencijalna, nisu detektirana niti u jednom ispitivanom uzorku, ali su ograničena ispitivanjima u Europskoj farmakopeji, jer se zna da mogu nastati u proizvodnom postupku ili uskladištenjem, a mogu, ili ne moraju, trenutno biti prisutna u ljekovitoj tvari [3].

Za odvajanje pojedinih sastavnica ljekovite tvari i njezinih onečišćenja koriste se pouzdane separacijske i spektrometrijske tehnike. No, za postizanje što boljih rezultata i uvida u strukturu onečišćenja koristi se kombinacija ovih tehnika, kao što su: tekućinska kromatografija – spektrometrija masa (eng. *liquid chromatography – mass spectrometry*, LC-

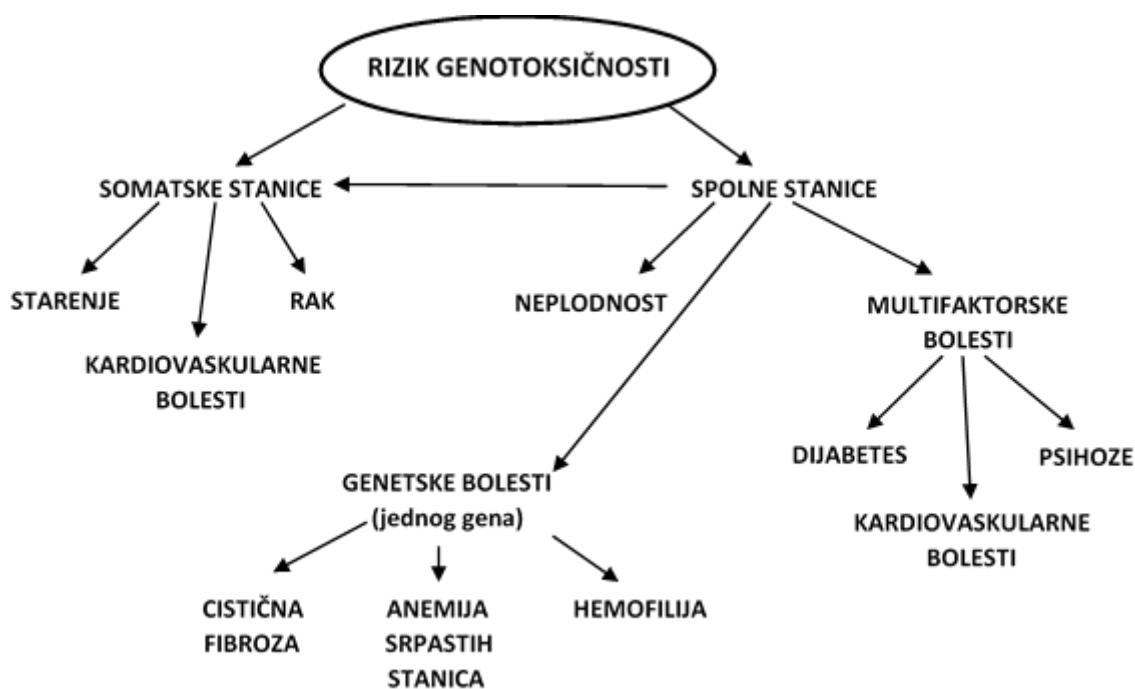
MS i LC-MS/MS) i plinska kromatografija – spektrometrija masa (eng. *gas chromatography – mass spectrometry*, GC-MS) [3].

2.3. Genotoksičnost

Genotoksičnost se u genetici definira kao razorni učinak na genetski materijal stanice (DNA, RNA) koji utječe na njezin integritet. Tvari koje imaju svojstvo genotoksičnosti nazivaju se genotoksini [4]. Razlikuju se fizikalni i kemijski genotoksini. Fizikalnim genotoksinima priprada γ -zračenje te UV-zračenje, a kemijski genotoksini se dijele na organske i anorganske [5]. Često se genotoksičnost i mutagenost koriste kao sinonimi. Naime, mutagenost je sposobnost izazivanja mutacija, dok genotoksično djelovanje ne mora uvijek dovesti do mutacije [6]. Svi su mutageni genotoksični, međutim sve genotoksične tvari nisu mutagene. Ovisno o učincima, genotoksini se mogu podijeliti u sljedeće kategorije:

- Kancerogeni (agensi koji uzrokuju rak)
- Mutageni (agensi koji uzrokuju mutacije)
- Teratogeni (agensi koji uzrokuju urođenu manu) [7].

Spontane ili inducirane mutacije mogu uzrokovati bolesti i poremećaje promjenama DNA spolnih ili somatskih stanica. Genetsko oštećenje spolnih stanica uzrokuje nasljedne bolesti (Downov sindrom, hemofilija, anemija srpastih stanica i dr.), neplodnost, teratogene i druge učinke. Dok oštećenje genetskog materijala somatskih stanica može dovesti do karcinoma ili ateroskleroze, te poremećaja poput teratogeneze ili starenja (Slika 2) [6].



Slika 2. Rizik genotoksičnosti [7]

Mutacije mogu biti u bilo kojem obliku, što može uključivati umnožavanje, umetanje ili brisanje genetskih podataka [7]. Genotoksični učinak može se podijeliti na oštećenja kromosoma i oštećenja gena. Oštećenja gena podrazumijevaju manje promjene slijeda baza u DNA, tj. jednog ili nekoliko parova baza, dok oštećenja kromosoma nastaju brisanjem nekoliko susjednih gena, inverzijom gena na kromosomu ili izmjenom većih dijelova između različitih kromosoma. Oštećenja kromosoma somatskih stanica obično dovode do smrti stanice tijekom diobe, dok oštećenja kromosoma spolnih stanica sprječavaju oplodnju ili uzrokuju ranu smrt ploda [6].

Stanice imaju sposobnost zaštite od takvih potencijalno smrtonosnih ili mutagenih genotoksičnih učinaka mnogim postupcima popravljanja, pa mnogi genotoksični učinci ne postaju vidljivi kao mutacije. Međutim, sposobnost oštećenja genoma pokazatelj je potencijalne mutagenosti. Stoga, neke metode kojima se ispituje genotoksičnost možda neće pružiti izravne dokaze nasljedne mutacije [4].

2.3.1. Važnost ispitivanja genotoksičnosti

Kao dio postupka procjene sigurnosti, regulatorna tijela širom svijeta zahtijevaju informacije o genotoksičnom potencijalu novih lijekova. Studije genotoksičnosti mogu se definirati kao različiti *in vitro* i *in vivo* testovi osmišljeni da identificiraju 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. Identifikacija genotoksičnih tvari pomaže nam da razumijemo mehanizam mutacije i genotoksičnosti, čime nam otvara put da bolje spriječimo učestalost istog [7].

2.3.2. Kontrola genotoksičnih onečišćenja

Onečišćenja koja su prisutna na niskim razinama potencijalno mogu prouzročiti oštećenje DNA što dovodi do mutacija i stoga potencijalno uzrokuje karcinom. Ova vrsta mutagenog kancerogena obično se otkriva pomoću već spomenutog testa bakterijske reverzne mutacije. Ostale vrste genotoksikanata koji nisu mutageni obično imaju pragovne mehanizme te ne predstavljaju kancerogeni rizik za ljude na razini koja je obično prisutna kao nečistoća [8].

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 [9]. Prag toksikološke zabrinutosti (eng. *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. Procjena opasnosti uključuje početnu analizu stvarnih i potencijalnih nečistoća pretraživanjem baze podataka i literature za kancerogenost i bakterijsku mutagenost kako bi ih se klasificiralo u sljedeće klase [8]:

1. Klasa - poznati mutageni kancerogeni
2. Klasa - poznati mutageni s nepoznatim kancerogenim potencijalom
3. Klasa - upozoravajuća struktura, koja nije povezana sa strukturom ljekovite tvari; nema podataka o mutagenosti

4. Klasa - upozoravajuća struktura, upozorenje u ljekovitoj tvari ili spojevima povezanim s ljekovitom tvari koji su testirani i koji nisu mutageni

5. Klasa - nema strukturnih upozorenja ili upozoravajuće strukture s dovoljno podataka koji pokazuju nedostatak mutagenosti ili kancerogenosti

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 2 i 3) [8].

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 koncentracije (ppm) genotoksične nečistoće u ljekovitoj tvari dobivenoj iz TTC-a mogu se izračunati na temelju očekivane dnevne doze za pacijenta pomoću sljedeće jednadžbe [9]:

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

Standardne procjene rizika poznatih kancerogena pretpostavljaju da se rizik od karcinoma povećava kao funkcija kumulativne doze. Stoga bi rizik od kontinuirane niske doze tijekom života bio jednak riziku od raka povezanom s identičnom kumulativnom izloženosti koja je u prosjeku kraća. Da bi se riješila izloženost mutagenim nečistoćama 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 x 25,550 dana = 38,3 mg) ravnomjerno raspoređuje na ukupan broj dana izlaganja tijekom kraćeg životnog vijeka (LTL). To omogućava veći dnevni unos mutagenih nečistoća nego što bi to bio slučaj za cjeloživotno izlaganje, a i dalje održava usporedivu razinu rizika za svakodnevne i nesvakodnevne režime liječenja (Tablica 1) [8].

Tablica 1. Prikaz prihvatljivih dnevnih unosa za pojedinačne nečistoće

Trajanje liječenja	< 1 mjesec	>1 - 12 mjeseci	>1 – 10 godina	>10 godina do doživotno
Dnevni unos [$\mu\text{g}/\text{dan}$]	120	20	10	1,5

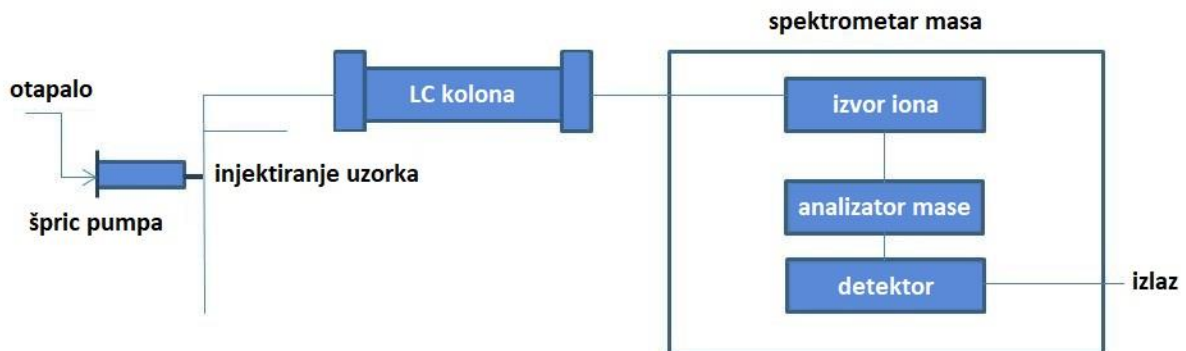
2.4. Spregnute analitičke tehnike

Napredak u kemiji i tehnologiji čini nove tehnike dostupnijima i proširuje upotrebu postojećih. Kombiniranje postojećih tehnika kombiniraju se njihove prednosti što omogućuje razvoj analitičkih metoda znatno većih mogućnosti u separaciji i identifikaciji analita. Odvajanje smjesa kromatografskim postupcima središnji je dio analitičke i preparativne kemije. Udruživanjem kromatografskih tehnika sa spektrometrijskim čini nekoliko moćnih analitičkih tehnika. Kromatografija daje čiste ili gotovo čiste frakcije kemijskih komponenata u smjesi, a spektrometrija daje selektivne informacije za identifikaciju pomoću standarda ili baze spektara. Prije nekoliko desetljeća, Hirschfield je uveo pojam "povezivanje" kako bi označio kombinaciju tehnika razdvajanja i jedne ili više tehnika spektrometrijske detekcije. Danas su takve kombinirane tehnike poznate kao spregnute tehnike [10].

Posljednjih godina, spregnute metode dobivaju sve veću pažnju kao glavno sredstvo za rješavanje složenih analitičkih problema. Snaga kombiniranja tehnika odvajanja sa spektrometrijskim tehnikama dokazana je tijekom godina i za kvantitativnu i za kvalitativnu analizu nepoznatih spojeva u složenim uzorcima. Primjeri spregnutih tehnika su GC-MS, LC-MS, GC-IR, LC-NMR, LC-IR, CE-MS, ICP-MS itd [11]. Prednosti spregnutih tehnika su: kraće vrijeme analize, viši stupanj automatizacije, kraće trajanje analize, bolja ponovljivost, smanjenje onečišćenja jer je to zatvoreni sustav te pojačana kombinirana selektivnost, a time i viši stupanj informacija [10].

2.4.1. Tekućinska kromatografija – spektrometrija masa

Kombinirana tehnika MS-a i LC-a (odnosno HPLC-a) poznata je pod nazivom LC-MS (Slika 3) [12]. LC-MS snažna je analitička tehnika s vrlo visokom osjetljivošću i specifičnošću. Tekućinskom kromatografijom (LC) provodi se odvajanje komponenata, a zatim se eluenti uzorka iz LC-a prenose u spektrometar masa (MS) gdje se provodi detekcija, identifikacija i određivanje m/z vrijednosti komponenata. LC-MS koristi se za određivanje farmaceutskih tvari, intermedijera i njihovih srodnih spojeva za kvantitativnu i kvalitativnu svrhu. Također se koristi u osnovnim istraživanjima, agrokemijskim, forenzičkim laboratorijima i prehrambenoj industriji [13].



Slika 3. Shematski prikaz LC-MS [12]

Tekućinskom kromatografijom izvodi se analiza većinom polarnih analita razdvajanjem ciljanog analita na kromatografskoj koloni i detekcijom istog uz pomoć pogodne tehnike detekcije. Tekućinski kromatograf sastoji se od sustava za dobavu pokretne faze (pumpe), injekcijskog sustava, kućišta za kolonu te detektora [14].

Pumpa je izrađena od materijala koji je inertan prema otapalima ili bilo kojem miješanom sastavu vodenog pufera i organskih otapala. Postoje tri vrste pumpi: klipne pumpe, špric pumpe i pumpe s konstantnim tlakom [13].

Injekcijski sustav služi za unos uzorka, a sastoji se od injekcijskog ventila (ručni ili automatski), automatskog uzorkivača (eng. *autosampler*) koji može biti termostatan, zatim od injekcijske igle i graduirane injekcije ili pumpe, te kapilare određenog volumena [14].

Kolona se nalazi u kućištu koje može biti termostatorano ili netermostatorano s mogućnošću detekcije propuštanja tekućine. Nepokretna faza nalazi se u koloni i sastoji se od silicijevog dioksida u kombinaciji s ugljikovim lancem. Prema tome, kolone nose oznake po vrsti nepokretne faze (C18, C8, C4, NH₂, Ph-NH₂, CN, grafitna, SiO₂, gel-propusna itd.). Kolone mogu biti različitih duljina od oko 50 mm do 300 mm (Slika 4) [13,14].

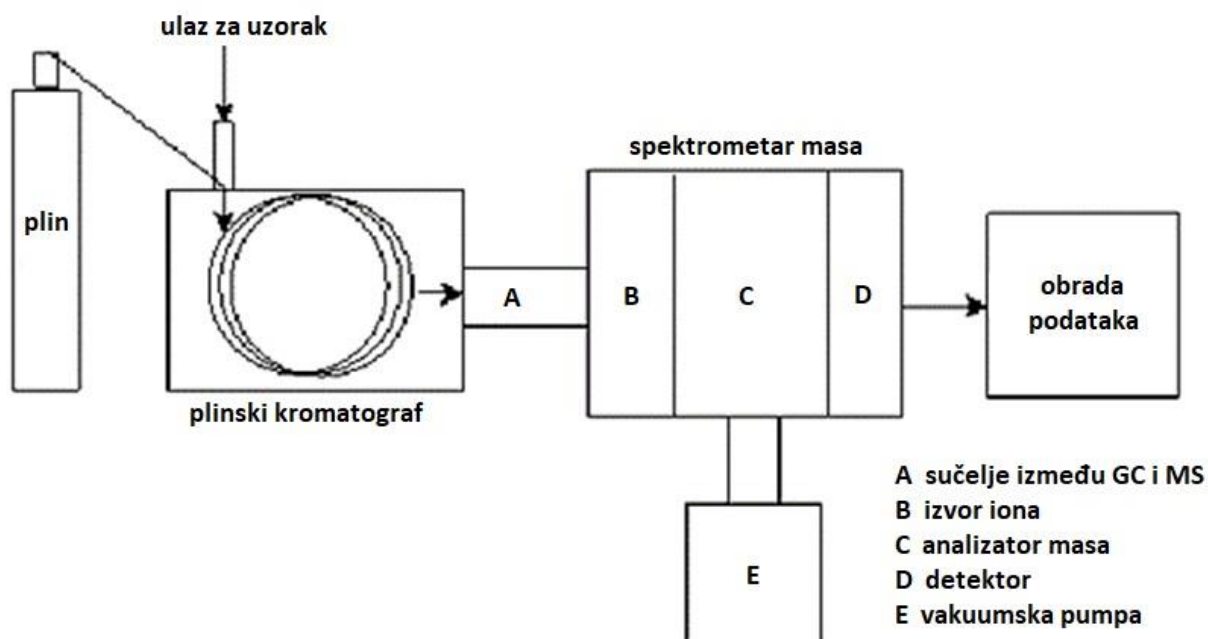


Slika 4. Prikaz LC kolona različitih duljina

Detektori su najvažniji dio tekućinske kromatografije, a u ovom radu korišten je spektrometar masa, čiji je princip rada opisan u poglavlju 2.5.1.

2.4.2. Plinska kromatografija – spektrometrija masa

Instrument GC-MS (Slika 5) sastoji se od dva glavna dijela: plinskog kromatografa i spektrometra masa. GC-MS razdvaja smjesu u pojedinačne komponente pomoću plinskog kromatografa, a pomoću MS detektora identificira i kvantificira svaku od komponenata na molekularnoj razini. To je jedan od najtočnijih i najučinkovitijih tehnika za analizu hlapljivih organskih uzoraka [11].



Slika 5. Shematski prikaz GC-MS [15]

U plinskoj kromatografiji (GC), pokretna faza je inertni plin, koji nosi uzorak kroz nepokretnu fazu tj. kolonu gdje se različite komponente selektivno separiraju [15].

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 sa sličnim vrelištim eluiraju se s obzirom na njihovu polarnost, gdje se prvo eluiraju oni spojevi koji imaju slabiju interakciju s nepokretnom fazom. Spojevi slične polarnosti eluiraju se s povećanjem vrelišta, pri čemu spojevi nižih vrelišta imaju kraće vrijeme zadržavanja [16].

Plinski kromatograf sastoji se od nekoliko komponenata. Uloga svake komponente ključna je za postizanje dobrog razdvajanja i analize. Plin nosač potreban je za osiguravanje protoka plina koji transportira spojeve kroz kolonu i do detektora. Nosivi plin mora biti inertan i ne smije ometati razdvajanje i detektiranje. Helij, vodik i dušik neki su od najčešće korištenih plinova-nosača. Ti plinovi imaju različita svojstva i karakteristike, a njihov izbor ovisi o uzorku i vrsti detektora i analize.

Razlikujemo *headspace* injektiranje, koje se koristi za analizu hlapljivih sastojaka u uzorku, te direktno injektiranje. Uzorak se injektira u GC pomoću šprice, automatskog uzorkivača (eng. *autosampler*) ili drugih uređaja za ubrizgavanje uzoraka. GC ulazni insert je poveznica između

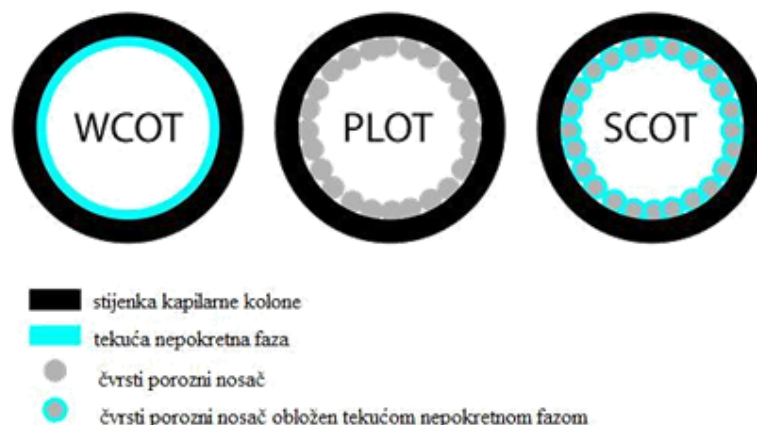
šprice i GC kapilarne kolone gdje se uzorak unosi, isparava, miješa s plinom i prenosi u kolonu. On sprječava kontakt uzorka s metalnim stijenka injezione jedinice. Razlikujemo nekoliko tehnika injektiranja: "*split*" (mali dio uzorka odlazi u kolonu), "*splitless*" (cijeli uzorak ulazi u kolonu) i "*on-column*" (uzorak izbjegava kontakt s vrućim otvorom za ubrizgavanje i prelazi izravno u kolonu) [16, 17].

Razdvajanje se postiže pomoću kolone, koja je smještena u termostatoranoj peći. Postoje razne vrste GC kolona. Kolone mogu biti staklene ili od nehrđajućeg čelika te različitih dimenzija. Punjene kolone (eng. *packed columns*) mogu biti ispunjene čvrstim česticama, bilo poroznom krutinom ili krutinom koja je presvučena tekućinom [15, 16]. Kapilarne kolone (eng. *capillary/open-tubular columns*) omogućuju učinkovitije odvajanje smjese uzorka. Općenito su dulje i manjeg unutarnjeg promjera. Osim toga, kapilarne kolone omogućuju kraće vrijeme rada (tj. veću brzinu), zahtijevaju manji volumen uzorka te daju bolje razlučivanje (Slika 6) [16].



Slika 6. Prikaz GC kolona: a) punjena kolona; b) kapilarna kolona

Postoje tri vrste otvorenih cjevastih (kapilarnih) kolona: kapilarne kolone s obložnom stijenkom (eng. *Wall-coated open-tubular column*, WCOT), kapilarne kolone s poroznim slojem (eng. *Porous-layer open-tubular column*, PLOT) i kapilarne kolone s poroznim slojem obloženim tekućom nepokretnom fazom (eng. *Support-coated open-tubular column*, SCOT) (Slika 7) [16].



Slika 7. Vrste kapilarnih kolona

Kako se spojevi odvajaju, eluiraju se iz kolone i ulaze u detektor (u ovom radu MS detektor čiji je princip rada opisan u poglavlju 2.5.1.), koji je sposoban stvoriti odgovarajući signal kada detektira prisutnost određenog spoja. Što je veća koncentracija spoja u uzorku, signal je veći, a dobiveni rezultati se obrađuju pomoću programa na računalu [15].

2.5. Detektori

Detektori se mogu podijeliti na univerzalne detektore (reagiraju na svaku komponentu u pokretnoj fazi), selektivne detektore (reagiraju samo na srodnu skupinu tvari) i na specifične detektore (reagiraju na pojedinu komponentu uzorka ili na ograničeni broj komponenata sa sličnim kemijskim svojstvima). Također, klasificiraju se i na destruktivne i nedestruktivne detektore. Bilo koji detektor može se povezati u seriju s nedestruktivnim detektorom. Glavne karakteristike koje bi idealni detektor morao imati su mogućnost detekcije niskih koncentracija analita, dobra selektivnost, brzi odgovor, širok raspon linearnosti, mali volumen zadržavanja te pouzdanost i praktičnost [18].

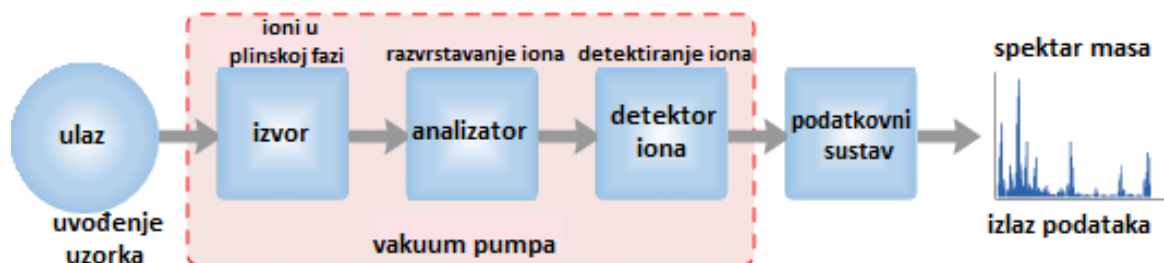
U plinskoj kromatografiji razlike su u fizikalnim svojstvima pokretne faze (nosivog plina) i uzorka dovoljno velike da se mogu koristiti univerzalni detektori s dobrom osjetljivošću (npr. plameno ionizacijski detektor (eng. *Flame Ionization Detector*, FID), detektor toplinske vodljivosti (TCD), itd. U tekućinskoj kromatografiji je problem što su fizikalna svojstva pokretne faze i uzorka često vrlo slična, što onemogućava upotrebu univerzalnog detektora. Unatoč tome, trenutno dostupni LC detektori vrlo su osjetljivi, općenito su selektivni i imaju relativno

širok spektar primjene (npr. UV-VIS detektor, detektor s nizom dioda (eng. *Diode array detector*, DAD), itd.) [18].

2.5.1. Spektrometar masa

Spektrometrija masa analitička je tehnika kojom se kemijske tvari identificiraju sortiranjem iona u plinovitoj fazi u električnim i magnetskim poljima ovisno o omjeru njihove mase i naboja. Spektrometar masa sastoji se od pet osnovnih dijelova (Slika 8):

1. sustava visokog vakuuma
2. sustava za unošenje uzorka
3. izvora iona (u kojem se može stvoriti snop nabijenih čestica karakterističnih za uzorak)
4. analizatora (koji savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja (m/z))
5. detektora ili prijavnika pomoću kojeg se odvojeni ioni detektiraju [20].



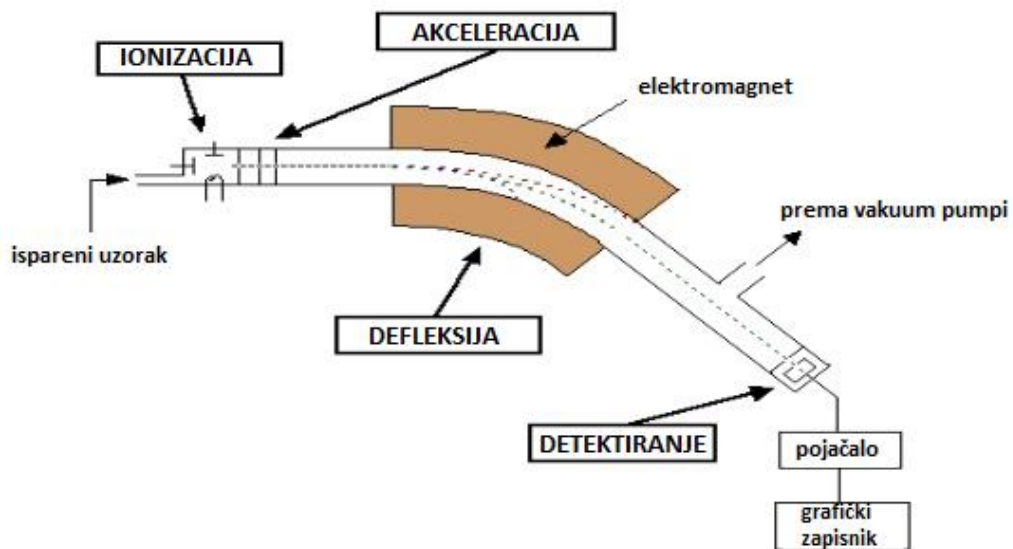
Slika 8. Komponente spektrometra masa [21]

U spektrometriji masa ioni su podvrgnuti magnetskim i električnim poljima u vakuumu. U tu svrhu, spoj mora biti u nabijenom stanju ili mora biti ioniziran prije analize. Uz to, ovi se ioni moraju prenijeti u plinsku fazu u vakuujskom sustavu spektrometra masa. Spektrometrija masa se općenito koristi za analizu slobodnih iona u visokom vakuumu. Razvile su se posebne metode ionizacije koje osiguravaju otapanje ili desorpciju analita različitih matrica i istodobnu ionizaciju. Izbor metode ionizacije ovisi o karakteristikama analita i potrebnoj vrsti analitičkih podataka. Postoje metode tzv. "tvrde ionizacije", poput ionizacije elektronima (eng. *electron*

ionisation, EI) ili kemijske ionizacije (eng. *chemical ionisation*, CI) koje na temelju fragmentacije daju strukturne informacije, tipično malih organskih molekula. Suprotno tome, tehnike „meke ionizacije“, poput ionizacije elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionisation*, ESI) ili laserske desorpcije (eng. *laser desorption*, LD), koriste se za dobivanje spektara masa s malo ili nimalo fragmentacije, kojima je moguće analizirati složene višekomponentne smjese [22]. Dakle, postupak ionizacije provodi se snopom elektrona visoke energije, a odvajanje iona postiže se ubrzavanjem i fokusiranjem iona u zruci, koja se zatim savija vanjskim magnetskim poljem. Potom se ioni detektiraju elektroničkim putem, a dobivene informacije pohranjuju se i analiziraju u računalu [23].

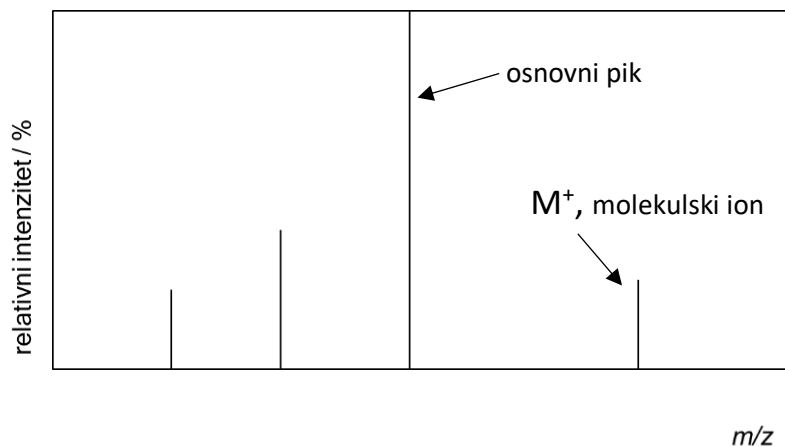
Princip ionizacije opisan je na primjeru metode ionizacije elektronima (EI), koja se ujedno i najčešće koristi. Za ionizaciju spoja ova tehnika koristi elektrone koji se emitiraju iz renijeve ili volframove žice ili vrpce i ubrzavaju s tipično 70 eV [19]. Pri tome dolazi do izbijanja jednog elektrona iz molekule, te zaostane pozitivno nabijeni ion s jednim nesparenim elektronom (radikal-kation, M^+). To je tzv. molekulski ion [23]. Nastali molekulski ion može biti stabilan ili se odmah može disocirati na neutralnu i ionsku vrstu ili na dva iona suprotnog naboja (stvaranje ionskog para). Pozitivni ioni mogu imati dovoljno unutarnje energije za daljnju fragmentaciju [19].

Nastali pozitivni ioni se ubrzavaju te prolaze kroz tri proreza kao snop. Zatim dolaze do analizatora mase, odnosno magnetskog polja, koji skreće snop iona u luku čiji je polumjer proporcionalan masi svakog iona. Neke od vrsta analizatora mase su: kvadripolni analizator masa, magnetski analizator mase, analizator vremena leta i dr. Lakši ioni se više odbijaju od težih iona. Varirajući jakost magnetskog polja, ioni različite mase mogu se postupno usmjeriti na detektor koji je pričvršćen na kraju zakrivljene cijevi (Slika 9) [21,23].



Slika 9. Shematski prikaz spektrometra masa

Kao rezultat analiza spektrometrom masa dobije se spektar masa (Slika 10) koji se obično predstavlja kao vertikalni stupičasti graf, u kojem svaka traka predstavlja ion koji ima specifičan omjer mase i naboja (m/z), a duljina trake ukazuje na relativni intenzitet iona. Najintenzivniji ion predstavlja osnovni pik kojemu relativni intenzitet iznosi 100%. Ionom najveće mase u spektru obično se smatra molekularni ion, a ioni manje mase fragmenti su molekularnog iona, pod pretpostavkom da je uzorak čisti spoj [23].



Slika 10. Spektar masa

2.5.2. Plameno-ionizacijski detektor

Plameno-ionizacijski detektor najčešće se koristi u plinskoj kromatografiji. Vrlo je jednostavan za rukovanje, brzog odziva, velike osjetljivosti, širokog linearnog raspona te izvrsne stabilnosti. Plin nosač miješa se s vodikom te nastala smjesa sagorijeva u zraku na izlazu mlaza plamena. Pritom nastaju ioni koji se sakupljaju na elektrodi, koja stvara struju proporcionalnu količini spoja uzorka u plamenu. Protoci plina nosača i plina za izgaranje trebaju biti pravilno postavljeni za optimalan rad FID-a. Tipične brzine protoka su 1:1:12 (30:30:360 mL/min), odnosno dušik kao plin-nosač, a vodik i zrak kao plinovi izgaranja. Temperatura detektora uvijek se mora održavati iznad 150 °C kako bi se spriječila kondenzacija vode koja nastaje u procesu izgaranja. Vrh plamena i elektrode treba redovito čistiti jer određeni spojevi mogu uzrokovati naslage koje se moraju mehanički ukloniti kako bi se spriječio gubitak osjetljivosti i stabilnost detektora [18].

2.5.3. Detektor s nizom fotodioda (eng. *Photodiode Array Detector* – PDA ili *Diode array detector* - DAD)

Niz fotodioda linearni je niz od nekoliko stotina svjetlosnih dioda osjetljivih na svjetlost u rasponu od 128 do 1024 - pa čak i do 4096 koji imaju tisuću fotocijevi, za svaku različitu valnu duljinu. Svjetlost prvo prolazi kroz uzorak, zatim udari u monokromator te se rasprši na niz fotodioda. Fotodiode pretvara svjetlost u električne signale i privremeno ih pohranjuje. Ovaj višekanalni detektor čini idealan senzor za čitav spektar u UV-VIS disperzivnom spektrofotometru. Detektori s nizom fotodioda (eng. *Photodiode Array Detector*, PDA) najčešće se koriste u laboratorijima za istraživanje i osiguravanje kvalitete. Prednosti PDA detektora su: mogućnost mjerenja pikova na svim valnim duljinama, analiza čistoće pika, detektiranje više valnih duljina i vrlo brzo skeniranje spektra [24].

2.6. Validacija analitičkih metoda

Glavni cilj validacije analitičke metode je pokazati da je metoda prikladna za svoju namjenu. U farmaceutskoj industriji razlikujemo nekoliko vrste analitičkih metoda koji se validiraju [25]:

- Identifikacijski testovi
- Kvantitativna ispitivanja sadržaja nečistoća
- Granična ispitivanja za kontrolu nečistoća
- Kvantitativni testovi aktivnog dijela u uzorcima ljekovite tvari ili druge odabrane komponente u lijeku.

Cilj analitičkog postupka treba biti jasno shvaćen, jer će on odrediti izvedbene karakteristike koje treba procijeniti. Tipični validacijski parametri (izvedbene karakteristike) su:

1. Specifičnost

Specifičnost je sposobnost nedvosmislene procjene analita u prisutnosti komponenata za koje se može očekivati da će biti prisutne [25].

2. Točnost

Točnost analitičkog postupka izražava bliskost slaganja između vrijednosti koja je prihvaćena (ili kao konvencionalna istinska vrijednost ili prihvaćena referentna vrijednost) i pronađene vrijednosti [25].

3. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka izražava se kao bliskost slaganja (stupanj raspršenosti) između niza mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost se može razmatrati na tri sljedeće razine [25]:

- Ponovljivost

Ponovljivost izražava preciznost u istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu [25].

- Međupreciznost

Međupreciznost izražava varijacije unutar istog laboratorija kao što su različiti dani, različiti analitičari, različita oprema itd [25].

- Obnovljivost

Obnovljivost izražava preciznost između više laboratorija (suradničke studije, obično primijenjene za standardizaciju metode) [25].

4. Granica detekcije

Granica detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno kvantificirati kao točna vrijednost [25].

5. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prikladnom preciznošću i točnošću [25].

6. Linearnost

Linearnost je sposobnost analitičke metode (unutar određenog raspona) da daje rezultate ispitivanja koji su izravno proporcionalni koncentraciji (količini) analita u uzorku [25].

7. Radno područje

Radno područje je interval između gornje i donje koncentracije (količine) analita u uzorku (uključujući te koncentracije) za koji je dokazano da analitički postupak ima odgovarajuću razinu preciznosti, točnosti i linearnosti [25].

8. Robusnost

Robusnost analitičke metode mjera je njene otpornosti na utjecaj malih, ali namjernih varijacija u parametrima metode, te je pokazatelj njene pouzdanosti tijekom normalne uporabe [25].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U tablici 2 navedene su kemikalije i proizvođači kemikalija koje su korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	CAS-No	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	CH ₃ CN	p.a.	75-05-8	VWR, Francuska
Diklormetan	CH ₂ Cl ₂	p.a.	75-09-2	Merck, Njemačka
Metanol	CH ₃ OH	p.a.	67-56-1	VWR, Francuska
Dimetil sulfoksid (DMSO)	C ₂ H ₆ OS	p.a.	67-68-5	Merck, Japan
N-metil-2-pirolidon (NMP)	C ₅ H ₉ NO	p.a.	872-50-4	Honeywell, Izrael
n-heksan	C ₆ H ₁₄	p.a.	110-54-3	Merck, Njemačka
n-heptan	C ₇ H ₁₆	p.a.	142-82-5	Merck, Njemačka
Tetrahidrofuran (THF)	C ₄ H ₈ O	p.a.	109-99-9	Merck, Njemačka
2-propanol	C ₃ H ₈ O	p.a.	67-63-0	Merck, Njemačka
Aceton	C ₃ H ₆ O	p.a.	67-64-1	Merck, Njemačka
Mravlja kiselina	HCOOH	p.a.	64-18-6	Honeywell, Njemačka

3.1.2. Pimavanserin i potencijalna genotoksična onečišćenja

U tablici 3 navedena su fizikalno-kemijska svojstva ispitivanog farmaceutika pimavanserina, a u tablici 4 prikazana su potencijalna genotoksična onečišćenja pimavanserina.

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva pimavanserin hemitararata

Ime	Pimavanserin
Klasa	Antipsihotik
Molekulska formula	$(C_{25}H_{34}FN_3O_2)_2 \cdot C_4H_6O_6$
Strukturna formula	
Molarna masa	1005,2 g/mol
Naziv po IUPAC-u	(2R,3R)-2,3-dihidroksibutandionska kiselina; 1-[(4-fluorfenil)metil]-1-(1-(1-metilpiperidin-4-il)-3-[[4-(2-metilpropoksi)fenil]metil]urea
CAS broj	706782-28-7
Talište	117-119 °C

Tablica 4. Potencijalna genotoksična onečišćenja pimavanserina

Oznaka	Naziv po IUPAC-u	Molekulska formula	Strukturna formula	Molarna masa
IMP-1	Izo-butilbromid	C_4H_9Br		137,02 g/mol
IMP-2	N-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamid	$C_{12}H_{17}NO_3$		223,27 g/mol

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument za precizno određivanje mase tvari. Osjetljiv je i skup instrument, a o njezinoj ispravnosti i preciznosti ovisi točnost rezultata analize. Analitička vaga smještena je u stakleni ormarić koji ju štiti od prašine i zračnih struja koje bi mogle poremetiti položaj ravnoteže. Stalak vage pričvršćen je na debelu staklenu ili kamenu ploču kako bi se smanjile vibracije, dok se horizontalnost vage provjerava ugrađenom okruglom libelom [26]. U radu je korištena analitička vaga XP205 Delta Range proizvođača Mettler Toledo čiji je raspon 20 mg – 220 g (Slika 11).



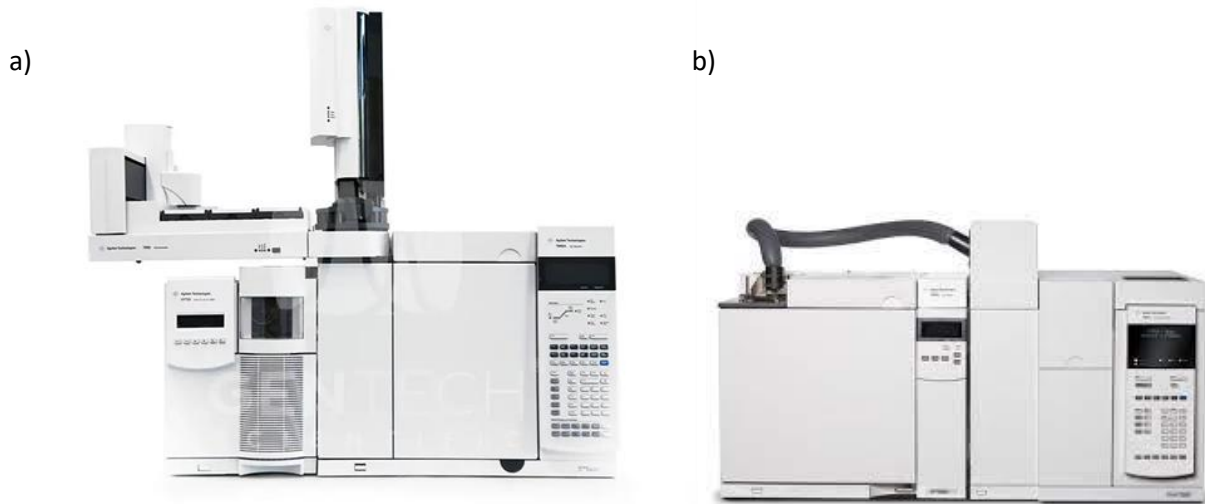
Slika 11. Analitička vaga XP205 Delta Range

3.2.2. Plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa

Za određivanje potencijalnog genotoksičnog onečišćenja izo-butilbromida korišten je plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa proizvođača Agilent Technologies (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, SAD) (Slika 12) koji se sastoji od:

- Agilent Technologies 7890A GC sustava,
- Agilent Technologies 5975C inertnog spektrometra masa s troosnim detektorom,
- Agilent Technologies uređaja za automatsko dodavanje uzorka (eng. *autosampler*)
- Agilent Technologies G1888 automatskog uzorkivača za uzorke iz plinske faze (*headspace* uzorkivač),
- računala s programom Mass Hunter za prikupljanje i obradu podataka

Kod plinske kromatografije sa statičkim *headspace* injektiranjem 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 nositelja uvodi u kolonu plinskog kromatografa. U ovom radu korištena je tehnika *split/splitless* injektiranja: kod kapilarnih kolona uzorak se ne unosi direktno u kolonu već se podijeli na dva nejednaka dijela i pritom se veći dio odventilira. Time se sprječava širenje i asimetrija pikova zbog ekspanzije otapala u kojem je uzorak otopljen. Ovakvu vrstu injektiranja nazivamo *split* injektiranje, ono obuhvaća omjere od 10:1 do 100:1, za razliku od *splitless* injektiranja kod kojeg izlazni ventil ostaje zatvoren te se sav uzorak unosi u kolonu [27].



Slika 12. Plinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, SAD) s direktnim injektiranjem (a) i *headspace* injektiranjem (b)

3.2.3. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa

Za određivanje potencijalnog genotoksičnog onečišćenja N-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamida korišten je tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa proizvođača Waters (Waters Corporation, Milford, SAD) (Slika 13) koji se sastoji od:

- pumpe (eng. *Binary Solvent Manager*)
- uređaja za automatsko dodavanje uzorka (eng. *Sample Manager – FTN*)
- termostatisanog držača kolone (eng. *Column Manager*)
- detektora s nizom fotodioda (eng. *PDA Detector*)
- jednostrukog kvadripolnog detektora (eng. *SQ Detector*)
- računala s programom Empower za prikupljanje i obradu podataka



Slika 13. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa (Waters Corporation, Milford, SAD)

Ostala oprema:

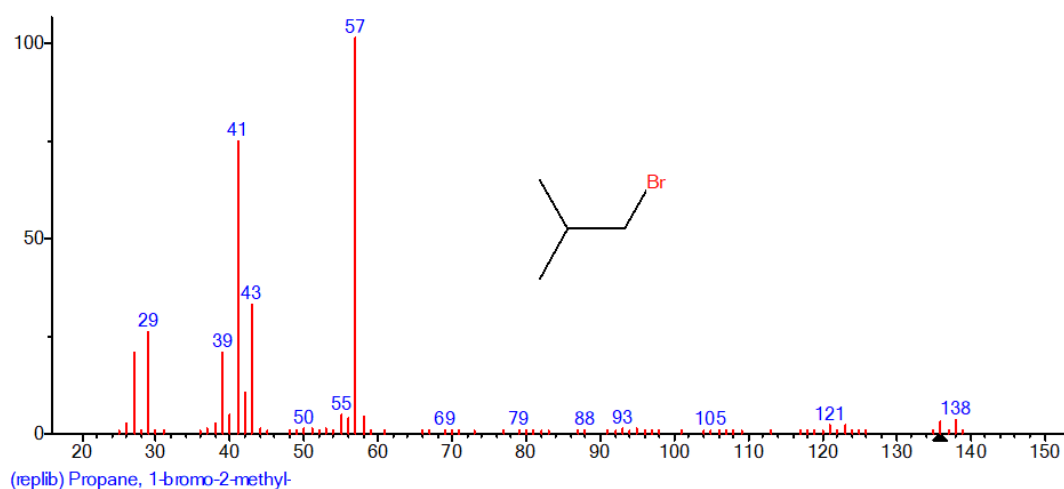
- Ultrazvučna kupelj
- Uređaj za vodu Millipore Milli-Q
- Automatske pipete (Eppendorf)
- Laboratorijsko posuđe
- Viale (setovi viala od proizvođača Agilent i Waters)

3.3. Metode rada

3.3.1. Razvoj GC-MS metode

HEADSPACE INJEKTIRANJE (HS)

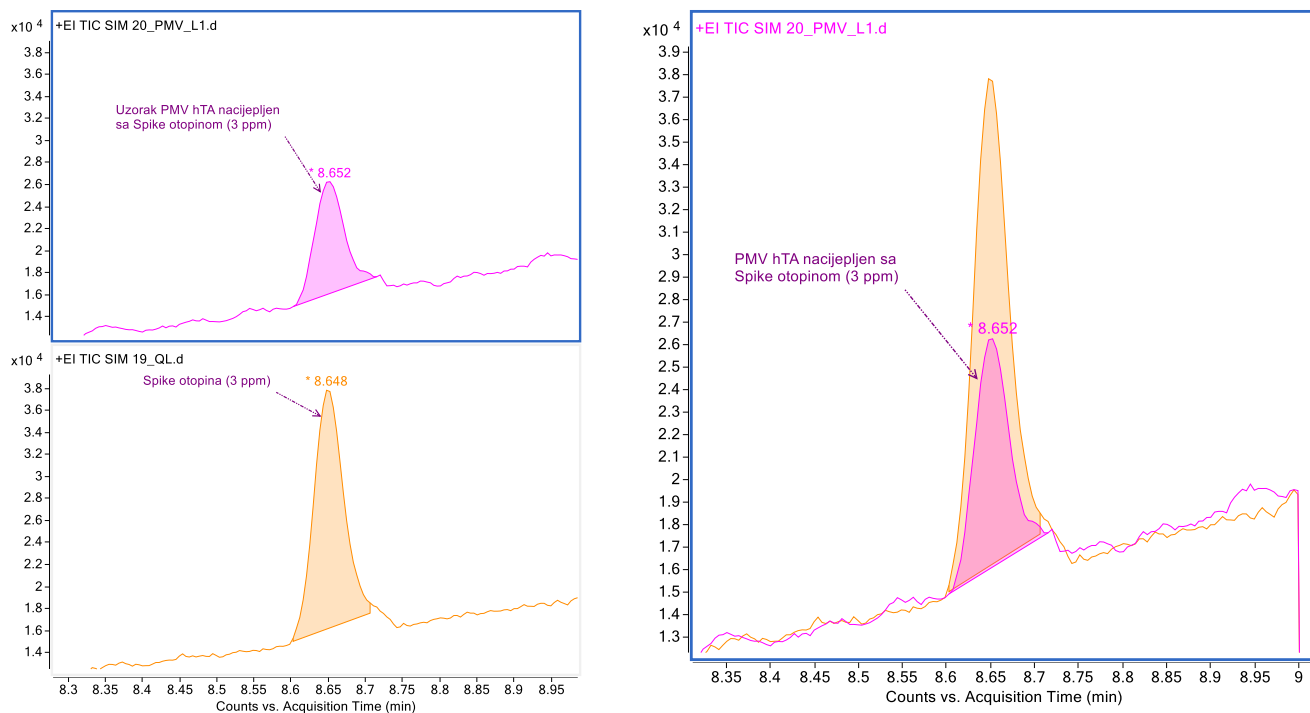
Ispitana je topljivost uzorka pimavanserin hemitararata (PMVhTA) u acetonitrilu, 2-propanolu, N-metil-2-pirolidonu (NMP), dimetil sulfoksidu (DMSO) i metanolu. Kao pogodno otapalo pokazali su se NMP i DMSO. Analiziranjem potencijalnog genotoksičnog onečišćenja IMP-1 na spektrometru masa praćen je ion 57,10 Da (Slika 14).



Slika 14. Spektar masa izo-butilbromida (IMP-1)

Analiza uzoraka u NMP-u prošla je bezuspješno jer je bila prisutna deformacija pika, tj. povlačenje pika (eng. *peak tailing*).

Analiziranjem obogaćenih (eng. *spiked*) uzoraka u DMSO pri kuhanju u pećnici na 120 °C nije bilo moguće dobiti odgovarajuće iskorištenje (eng. *recovery*), tj. točnost metode (Slika 15).



Slika 15. Kromatografska slika lošeg iskorištenja kod obogaćenih uzoraka u DMSO pri kuhanju u pećnici na 120 °C

Pretpostavljeno je da kuhanje utječe na dobivene loše rezultate iskorištenja, pa je odlučeno da se ide na direktno injektiranje uzoraka.

DIREKTNO INJEKTIRANJE

Prije pripreme otopina ispitana je topljivost uzorka PMVhTA u sljedećim otapalima: acetonitril, aceton, n-heksan, n-heptan, diklormetan i tetrahidrofuran. Kao dobro otapalo pokazao se diklormetan, te je u njemu ispitana topljivost potencijalnog genotoksičnog onečišćenja IMP-1. U tablici 5 navedeni su kromatografski parametri prema kojima je provedena validacija.

Tablica 5. Kromatografski parametri za GC-MS

Kolona	Restek Rtx-5 Amine; 30 m x 250 μ m x 1 μ m		
Nosivi plin	dušik		
Temperatura injektora	150 °C		
Temperatura kolone	40 °C		
Protok	1,5 mL/min		
Split omjer	10:1		
Temperaturni program	Brzina porasta temperature / °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 μ L		
Diluent	diklormetan		

3.3.1.1. Priprema otopina

Nominalna koncentracija ($\gamma=20$ mg/mL) uzorka PMVhTA pripremljena je vaganjem 20,13 mg PMVhTA u tikvicu volumena 1 mL na analitičkoj vagi, te je tikvica nadopunjena otapalom diklormetanom do oznake.

Temeljna standardna otopina (eng. *stock solution*) onečišćenja IMP-1 ($\gamma=1$ mg/mL) pripremljena je otapanjem 109,26 mg IMP-1 u tikvici volumena 100 mL u diklormetanu.

Radna standardna otopina (RSO) ($\gamma=0,01$ mg/mL) onečišćenja IMP-1 pripremljena je razrjeđenjem temeljne standardne otopine (TSO) tako da je 1 mL TSO prenesen u odmjernu tikvicu volumena 100 mL koja je nadopunjena diklormetanom do oznake (tablica 6).

Tablica 6. Priprema otopina uzorka (PMVhTA), TSO i RSO

Oznaka	c (mg/mL)	% od uzorka	ppm	Priprema:
Nominalna koncentracija uzorka	20	100		20 mg PMVhTA/1 mL
Stock 1 (TSO)	1,0	5	50000	100 mg IMP-1/100 mL
Stock 2 (RSO)	0,01	0,05	500	1 mL Stock 1/100 mL

3.3.1.2. Priprema otopina onečišćenja IMP-1 za provjeru linearnosti i odstupanja od linearnosti analitičke metode

Iz prethodno pripremljene radne standardne otopine (Stock 2) pripremljeno je pet otopina za određivanje linearnosti sljedećih koncentracija: 3 ppm (L1), 10 ppm (L2), 15 ppm (L3), 20 ppm (L4) i 30 ppm (L5). Pripreve navedenih otopina prikazane su u tablici 7.

Tablica 7. Priprema otopina za provjeru linearnosti i odstupanja od linearnosti

Oznaka	c (mg/mL)	% od uzorka	ppm	Priprema:
L5	0,0006	0,003	30	6 mL Stock 2 / 100 mL
L4	0,0004	0,002	20	4 mL Stock 2 / 100 mL
L3	0,0003	0,0015	15	5 mL L5 / 10 mL
L2	0,0002	0,001	10	5 mL L4 / 10 mL
L1/QL	0,00006	0,0003	3,0	2 mL L5 / 20 mL
DL	0,00003	0,00015	1,5	1 mL L5 / 20 mL

Otopine su rastočene u viala te je svaka otopina injektirana jednom za provjeru linearnog područja metode. Otopine su analizirane i određena je površina ispod kromatografske krivulje.

Za provjeru odstupanja od linearnosti analitičke metode pripravljene su otopine sljedećih koncentracija: 3 ppm (L1), 10 ppm (L2), 15 ppm (L3) i 30 ppm (L5) (tablica 7). Otopine su rastočene u viala te je svaka otopina injektirana u triplikatima.

3.3.1.3. Priprema otopina za određivanje granice kvantifikacije i detekcije

Prema ICH smjernicama dozvoljene količine genotoksičnih onečišćenja u ljekovitoj tvari mogu se izračunati prema formuli:

$$\text{Granica koncentracije (ppm)} = \frac{\text{TTC } [\mu\text{g/dan}]}{\text{doza } [\text{g/dan}]}$$

Dnevna doza pimavanserina je 34mg (≈ 40 mg), a prema TTC-u prihvatljiv unos genotoksičnih onečišćenja dnevno iznosi 1,5 μg . Prema tome, specifikacijska granica genotoksičnih onečišćenja u pimavanserin djelatnoj tvari iznosi:

$$\text{Granica koncentracije (ppm)} = \frac{\text{TTC } [\mu\text{g/dan}]}{\text{doza } [\text{g/dan}]} = \frac{1,5 \mu\text{g/dan}}{40 \text{ mg/dan}} = 0,0375 \frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} = 37,5 \text{ ppm}$$

Međutim, kako se u ovom radu koriste osjetljive metode vezane sa spektrometrom masa, postavljena je još stroža specifikacija. Prema tome, kao specifikacijska granica definirana je koncentracija od 10 ppm. S obzirom na definiranu specifikacijsku granicu, kao granica kvantifikacije (QL) odabrana je koncentracija 3 ppm. Stoga, sve komponente u uzorku koje imaju koncentraciju veću od 3 ppm mogu se kvantitativno odrediti. Granica detekcije (DL) određena je kao polovica vrijednosti granice kvantifikacije, dakle iznosi 1,5 ppm. Sve komponente u uzorku koje imaju veću koncentraciju od 1,5 ppm mogu biti detektirane. Priprava QL (ujedno je to i otopina L1) i DL otopine opisana je u tablici 7.

3.3.1.4. Priprema otopina za provjeru ponovljivosti

Ponovljivost je ispitana na koncentraciji 20 mg/mL. Ispitivanje je provedeno na šest testnih otopina koje su priređene otapanjem 20 mg uzorka PMVhTA u 1 mL čistog otapala (diklormetana) te šest testnih obogaćenih otopina priređenih otapanjem 20 mg uzorka PMVhTA u 1 mL standardne otopine koncentracije 10 ppm.

3.3.1.5. Priprema otopina za provjeru točnosti metode

Otopine za ispitivanje točnosti metode pripravljene su obogaćivanjem PMVhTA uzorka s otopinama pripremljenim za određivanje odstupanja od linearnosti analitičke metode. Odvagano je oko 20 mg uzorka direktno u vialu i dodan je 1 mL odgovarajuće otopine. Sve otopine napravljene su u triplikatu kao što je prikazano u tablici 8.

Tablica 8. Priprema obogaćenih uzoraka

Oznaka		Odvaga PMVhTA/mg	Obogaćena otopina	Volumen obogaćene otopine
Spike L1	1.	19,87	L1 (3 ppm)	1 mL
	2.	19,85		
	3.	19,96		
Spike L2	1.	20,41	L2 (10 ppm)	1 mL
	2.	20,94		
	3.	20,43		
Spike L3	1.	19,86	L3 (15 ppm)	1 mL
	2.	20,17		
	3.	19,46		
Spike L5	1.	20,75	L4 (30 ppm)	1 mL
	2.	19,83		
	3.	20,53		

Sve otopine su rastočene u vialu i injektirane jednom.

3.3.1.6. Priprema otopina za provjeru stabilnost

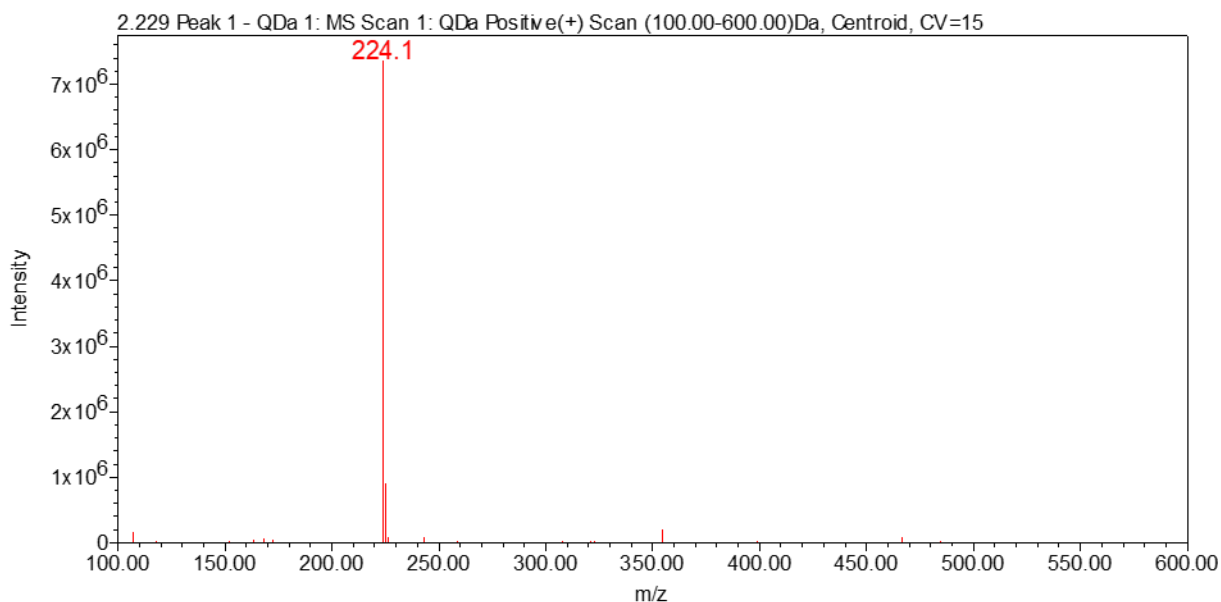
Unutar 3 dana praćena je stabilnost standardne otopine IMP-1 koncentracije 10 ppm, kao i stabilnost obogaćenog PMVhTA uzorka na koncentraciji od 10 ppm.

3.3.1.7. Ispitivanje robusnosti

Ispitivanje robusnosti provedeno je tako da je praćen utjecaj promjene temperature kolone (38 °C i 42 °C), *split*-a (5:1 i 15:1) i protoka (1,0 mL/min i 2,0 mL/min) na kritične značajke metode.

3.3.2. Razvoj LC-MS metode

Prije pripreme otopina potrebno je odrediti topljivost uzorka PMVhTA i onečišćenja IMP-2 u otapalu. Metanol i acetonitril nisu se pokazali kao dobro otapalo, no pogodnim otapalom pokazao se ACN:voda=1:1 (v/v). Analiziranjem potencijalnog genotoksičnog onečišćenja IMP-2 na spektrometru masa praćen je ion 224,14 Da (slika 16).



Slika 16. Spektar masa N-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamida (IMP-2)

Prilikom razvoja analitičke metode, optimizacijom gradijenta i sastava pokretnih faza osigurano je da ne dolazi do koelucije onečišćenja s pikom glavne komponente PMVhTA.

U tablici 9 navedeni su kromatografski parametri prema kojima je provedena validacija.

Tablica 9. Kromatografski parametri za LC-MS

Kromatografska kolona	Phenomenex, LC Column 150 × 4,6 mm, Gemini 3µm C18 110 Å			
Vodena pokretna faza „A“	0,1% HCOOH u vodi			
Organska pokretna faza „B“	0,1% HCOOH u acetonitrilu			
Gradijent	Vrijeme (min)	Protok (mL/min)	A%	B%
	0,00	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			
Valna duljina detekcije	229 nm			
Temperatura kolone	40,0 °C			
Temperatura automatskog uzorkivača	20,0 °C			
Diluent	acetonitril:voda=1:1			

3.3.2.1. Priprema otopina

Nominalna koncentracija ($\gamma=10$ mg/mL) uzorka PMVhTA pripremljena je vaganjem 9,97 mg PMVhTA u tikvicu volumena 1 mL na analitičkoj vagi, te je tikvica nadopunjena otapalom (ACN:voda=1:1, v/v) do oznake.

Temeljna standardna otopina onečišćenja IMP-2 ($\gamma=0,5$ mg/mL) pripremljena je otapanjem 25,11 mg IMP-2 u tikvici volumena 50 mL u otapalu (ACN:voda=1:1, v/v).

Radna standardna otopina ($\gamma=0,005$ mg/mL) onečišćenja IMP-2 pripremljena je razrjeđenjem temeljne standardne otopine tako da je 1 mL TSO prenesen u odmjernu tikvicu volumena 100 mL koja je nadopunjena ACN:voda=1:1 (v/v) do oznake (tablica 10).

Tablica 10. Priprema otopina uzorka (PMVhTA), TSO i RSO

Oznaka	c (mg/mL)	% od uzorka	ppm	Priprema:
Nominalna koncentracija uzorka	10	100		10 mg PMVhTA/1 mL
Stock 1 (TSO)	0,5	5	50000	25 mg IMP-2/50 mL
Stock 2 (RSO)	0,005	0,05	500	1 mL Stock 1/100 mL

3.3.2.2. Priprema otopina onečišćenja IMP-2 za provjeru linearnosti i odstupanja od linearnosti analitičke metode

Iz prethodno pripremljene radne standardne otopine (Stock 2) pripremljeno je pet otopina za određivanje linearnosti sljedećih koncentracija: 3 ppm (L1), 10 ppm (L2), 15 ppm (L3), 20 ppm (L4) i 30 ppm (L5). Otopina L1 ujedno je i granica kvantifikacije (QL) koja iznosi 3 ppm, a koncentracija granice detekcije iznosi 1,5 ppm (određivanje QL-a i DL-a opisano je u poglavlju 3.3.1.3.). Priprave navedenih otopina prikazane su u tablici 11.

Tablica 11. Priprema otopina za provjeru linearnosti i odstupanja od linearnosti

Oznaka	c (mg/mL)	% od uzorka	ppm	Priprema:
L5	0,0003	0,003	30	3 mL Stock 2 / 50 mL
L4	0,0002	0,002	20	2 mL Stock 2 / 50 mL
L3	0,00015	0,0015	15	5 mL L5 / 10 mL
L2	0,0001	0,001	10	5 mL L4 / 10 mL
L1/QL	0,00003	0,0003	3,0	2 mL L5 / 20 mL
DL	0,000015	0,00015	1,5	1 mL L5 / 20 mL

Otopine su rastočene u vialima. Svaka otopina je analizirana i određena je površina ispod kromatografske krivulje.

Za provjeru odstupanja od linearnosti analitičke metode pripremljene su otopine sljedećih koncentracija: 3 ppm (L1), 10 ppm (L2), 15 ppm (L3) i 30 ppm (L5) (tablica 11). Otopine su rastočene u vialima te je svaka otopina injektirana u triplicatima.

3.3.2.3. Priprema otopina za provjeru ponovljivosti

Ispitivanje ponovljivosti provedeno je na koncentraciji 10 mg/mL. Ispitivanje je provedeno na šest testnih otopina koje su priređene otapanjem 100 mg uzorka PMVhTA u 10 mL čistog otapala (ACN:voda=1:1, v/v) te šest testnih obogaćenih otopina priređenih otapanjem 100 mg uzorka PMVhTA u 10 mL standardne otopine koncentracije 10 ppm.

3.3.2.4. Priprema otopina za provjeru točnosti metode

Otopine za ispitivanje točnosti metode pripremljene su obogaćivanjem PMVhTA uzorka s otopinama pripremljenim za određivanje odstupanja od linearnosti analitičke metode. Odvagano je oko 100 mg uzorka u 4 tikvice volumena 10 mL te je svaka tikvica nadopunjena odgovarajućom otopinom do oznake (tablica 12).

Tablica 12. Priprema obogaćenih uzoraka

Oznaka	Odvaga PMVhTA	Obogaćena otopina	Volumen tikvice
Spike L1	100,36 mg	L1 (3 ppm)	10 mL
Spike L2	100,15 mg	L2 (10 ppm)	10 mL
Spike L3	100,61 mg	L3 (15 ppm)	10 mL
Spike L5	100,80 mg	L5 (30 ppm)	10 mL

Sve otopine su rastočene u vialima i svaka otopina je injektirana 3 puta.

3.3.2.5. Priprema otopina za provjeru stabilnosti

Unutar 2 dana praćena je stabilnost standardne otopine IMP-1 koncentracije 10 ppm i stabilnost obogaćenog PMVhTA uzorka pri koncentraciji 10 ppm.

3.3.2.6. Ispitivanje robusnosti

U okviru ispitivanja robusnosti provjereno je je li promjena temperature kolone (35 °C i 45 °C) i protoka (0,45 mL/min i 0,55 mL/min) utječu na kritične značajke metode.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom postupka validacije GC-MS i LC-MS metoda ispitane su sljedeće izvedbene karakteristike metode: specifičnost, linearnost, odstupanje od linearnosti analitičke metode, ponovljivost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, stabilnost otopine te robusnost.

Prije provođenja validacije potrebno je postaviti kriterije prihvatljivosti za određene izvedbene karakteristike u skladu sa zakonskim propisima, odgovarajućim normama ili određene dobrom laboratorijskom praksom (tablica 13).

Tablica 13. Kriteriji prihvatljivosti izvedbenih karakteristika

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti
Linearnost	$R^2 \geq 0,990$
Odstupanje od linearnosti analitičke metode	80 – 120%
Ponovljivost	$RSD \leq 30\%$
Točnost (iskazano kao iskorištenje)	za QL: 70 – 130% ; za veće koncentracije: 80 – 120%
Granica detekcije	$S/N \geq 3$
Granica kvantifikacije	$S/N \geq 10$
Stabilnost (iskazano kao relativna razlika)	≥ 10

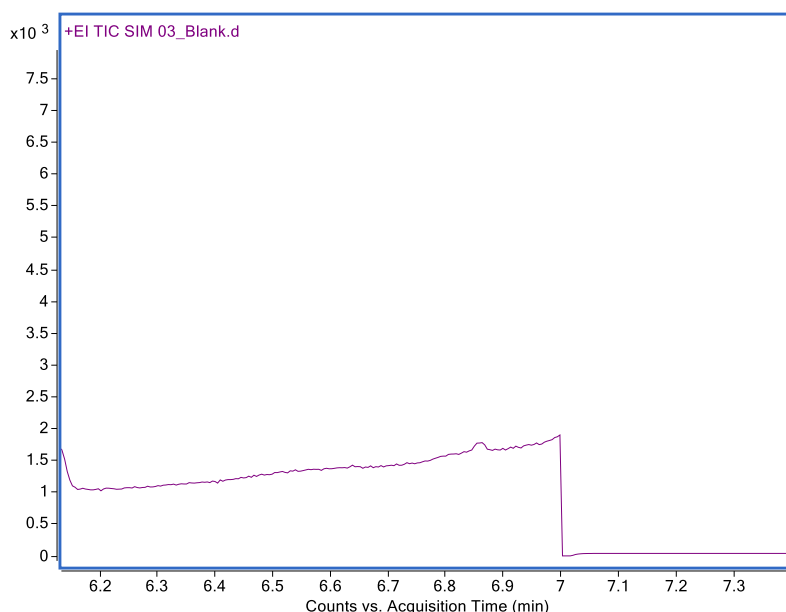
4.1. Validacija GC-MS metode

4.1.1. Specifičnost

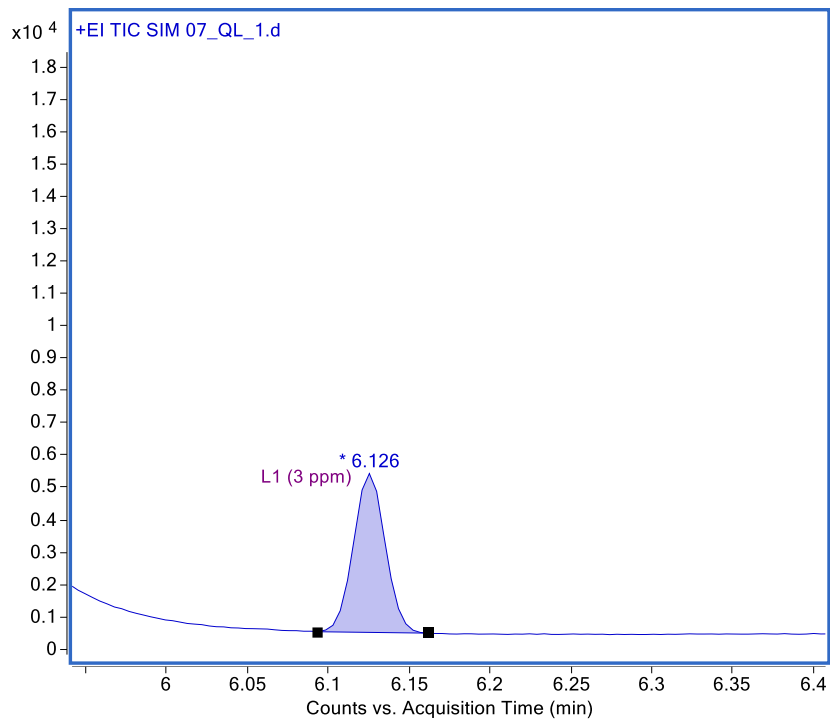
Specifičnost je mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih sastojaka uzorka. U ovom radu specifičnost je određena usporedbom kromatograma slijepe probe (eng. *blank*), otopine QL-a, otopine L2, uzorka PMVhTA te obogaćenog uzorka PMVhTA s otopinom L2.

Na slici 17.1. vidljivo je da u otopini slijepe probe (diklormetan) nisu prisutne druge tvari koje bi mogle utjecati na određivanje analita. Također, kod otopine uzorka PMVhTA (Slika 17.4.) vidljivo je da nema drugih tvari koje bi mogle interferirati s ispitivanim analitom. Na slikama 17.2., 17.3. i 17.5. može se vidjeti kromatografska krivulja ispitivanog analita (onečišćenja IMP-1), koja ima slično vrijeme zadržavanja u sva tri slučaja (t_R (otopina QL, 3 ppm) = 6,126 min, t_R (otopina L2, 10 ppm) = 6,125 min i t_R (obogaćeni uzorak PMVhTA s otopinom L2) = 6,130 min).

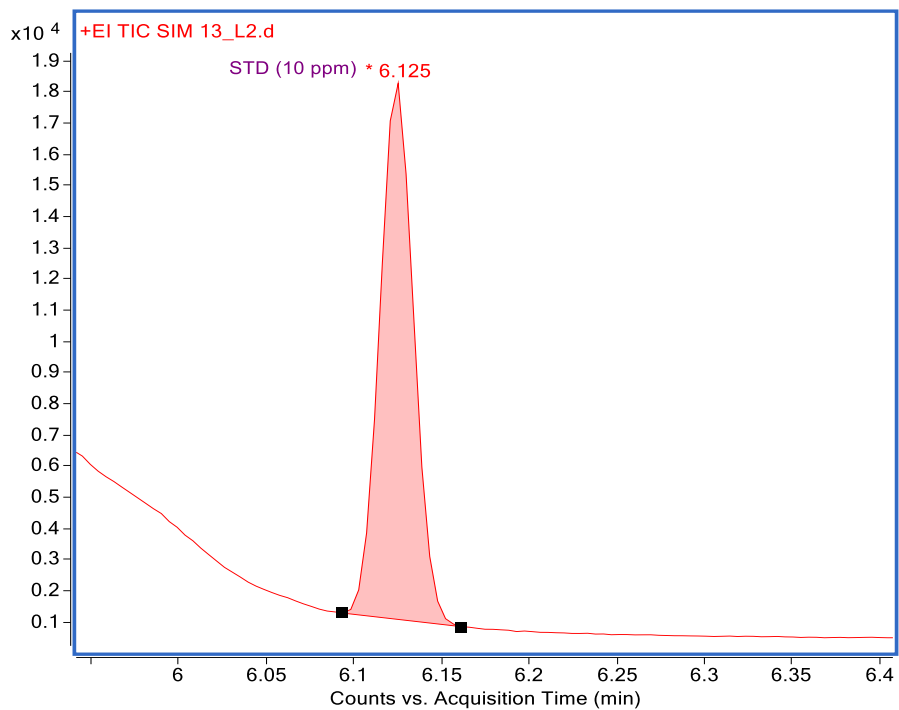
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da promjena koncentracije (3 i 10 ppm) i obogaćivanje uzorka ne utječu značajno na vrijeme zadržavanja te ne dolazi do interferencije drugih tvari tijekom analize ispitivanog analita. Time je potvrđena specifičnost metode.



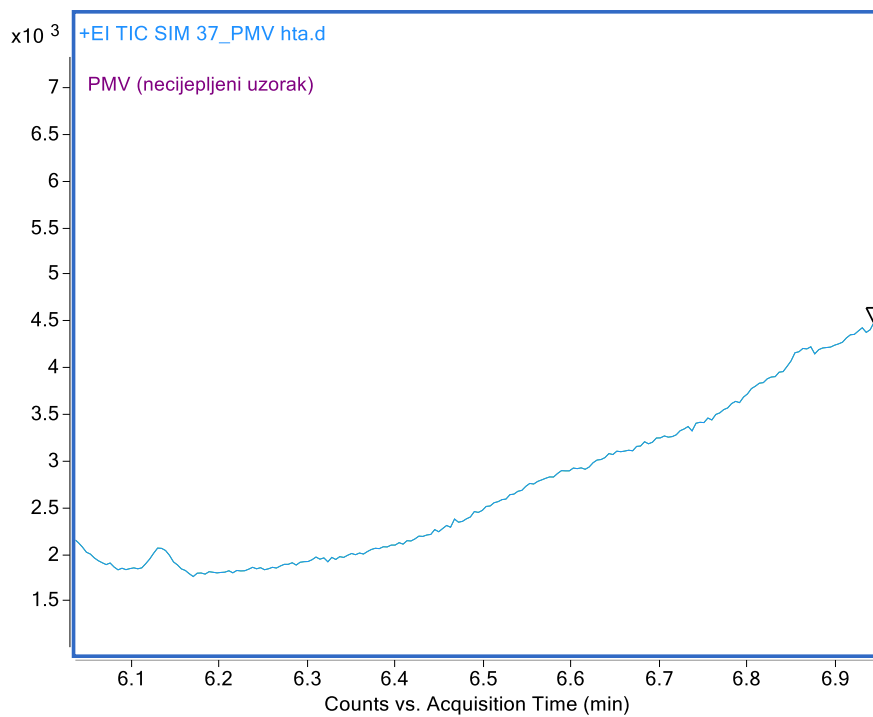
Slika 17.1. Kromatogram otopine slijepe probe (diklormetan)



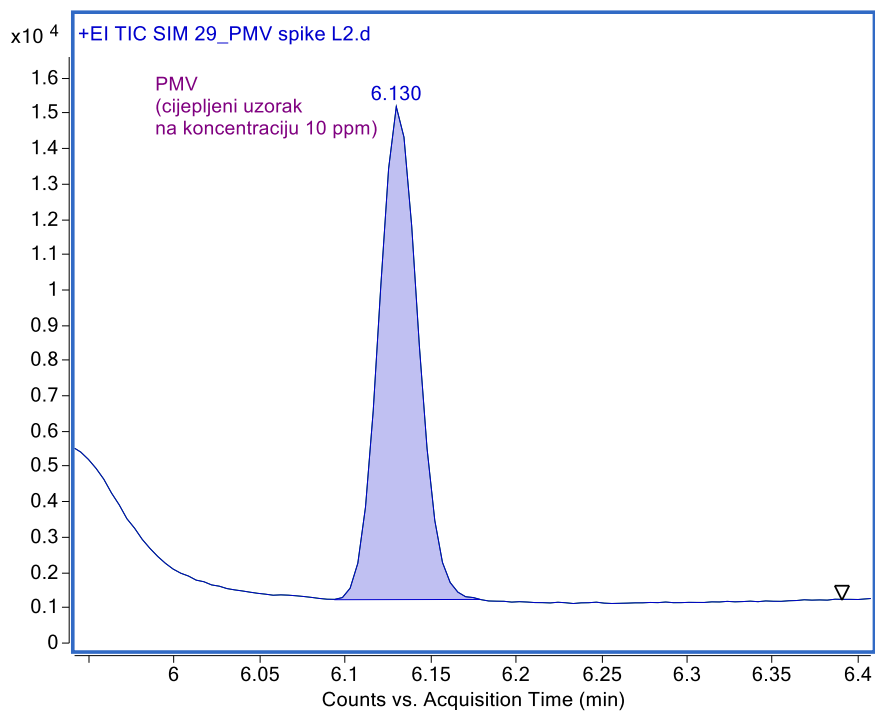
Slika 17.2. Otopina IMP-1 (3 ppm) korištena za određivanje granice kvantifikacije



Slika 17.3. Otopina IMP-1 (10 ppm) korištena kao standardna otopina



Slika 17.4. Otopina uzorka PMVhTA



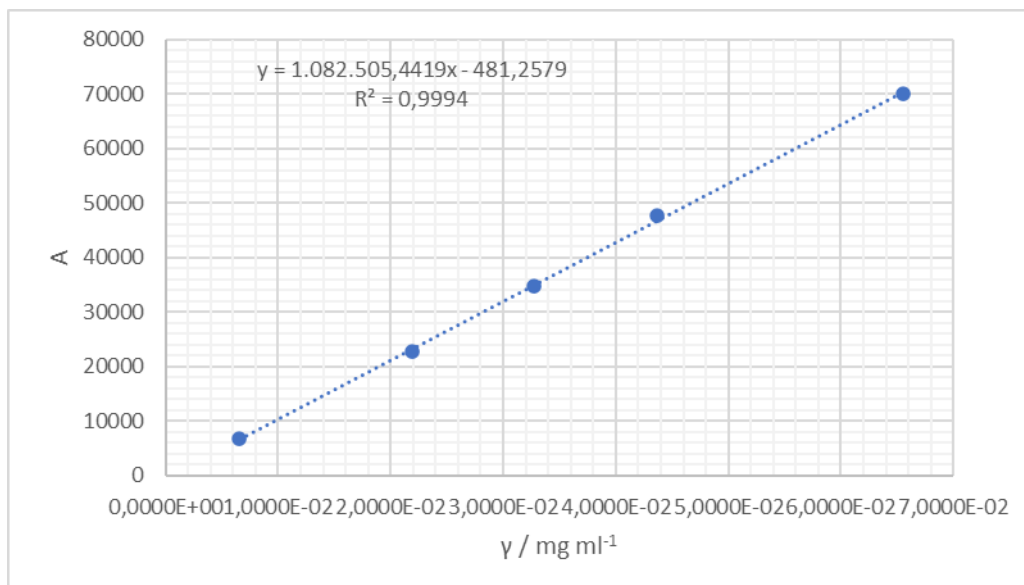
Slika 17.5. Otopina obogaćenog uzorka PMVhTA

4.1.2. Linearnost

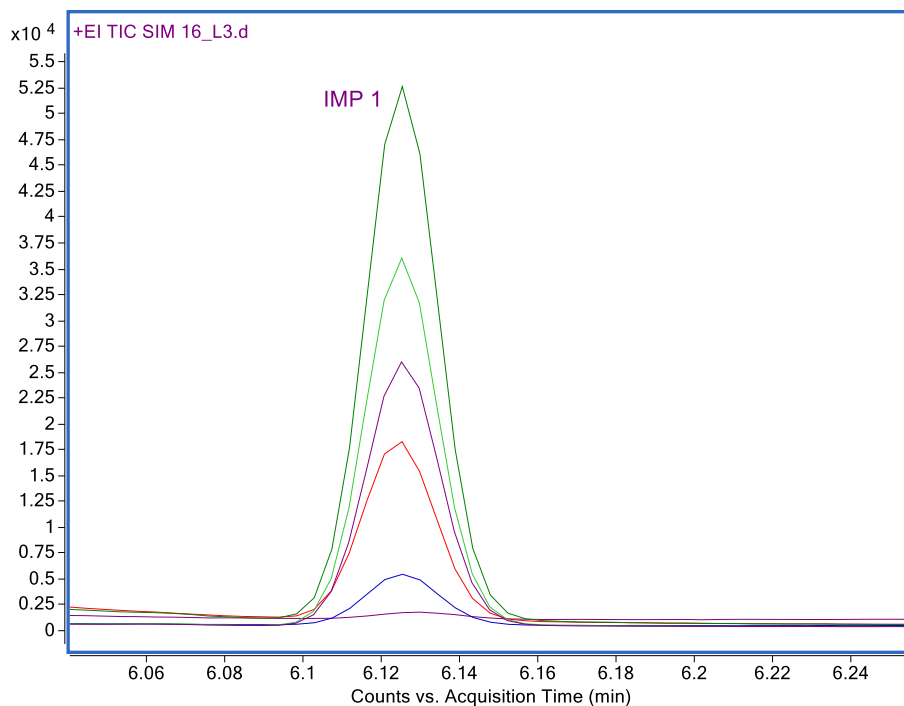
Linearnost metode ispitana je s pet otopina onečišćenja IMP-1 različitih koncentracija u rasponu od 0,00006 mg/mL do 0,0006 mg/mL. Svakoj otopini određena je površina ispod kromatografske krivulje te je nacrtan umjerni pravac iz kojeg je određen nagib pravca, odsječak i koeficijent determinacije (tablica 14, slike 18 i 19).

Tablica 14. Površine ispod kromatografske krivulje za pojedine koncentracije

Uzorak	γ (mg/mL)	A
L5	0,0006	70137
L4	0,0004	47781
L3	0,0003	34710
L2	0,0002	22696
L1	0,00006	6778



Slika 18. Grafički prikaz ovisnosti površine ispod kromatografske krivulje onečišćenja IMP-1 o koncentraciji



Slika 19. Kromatogram prikazuje linearnost otopina onečišćenja IMP-1

Na temelju dobivene vrijednosti koeficijenta determinacije, koja iznosi 0,9994, može se zaključiti da je potvrđena linearnost metode jer je zadovoljen postavljen kriterij $R^2 \geq 0,990$.

4.1.3. Odstupanje od linearnosti analitičke metode

Za određivanje odstupanja od linearnosti analitičke metode pripravljene su otopine koncentracija: 0,00006 mg/mL, 0,0002 mg/mL, 0,0003 mg/mL i 0,0006 mg/mL. Svaka otopina injektirana je tri puta (tablica 15).

Tablica 15. Rezultati odstupanja od linearnosti

Uzorak		A	Izračunata koncentracija* (mg/mL)	Iskorištenje** (%)	Srednja vrijednost iskorištenja (%)
QL (0,00006 mg/mL)	1.	6721	6,6533E-05	101,49	101,4
	2.	6636	6,5748E-05	100,29	
	3.	6778	6,7060E-05	102,29	
L2 (0,0002 mg/mL)	1.	23492	2,2146E-04	101,35	99,1
	2.	22704	2,1418E-04	98,01	
	3.	22696	2,1411E-04	97,98	
L3 (0,0003 mg/mL)	1.	34759	3,2554E-04	99,32	99,0
	2.	34450	3,2269E-04	98,45	
	3.	34710	3,2509E-04	99,18	
L5 (0,0006 mg/mL)	1.	70937	6,5975E-04	100,64	100,0
	2.	70287	6,5375E-04	99,72	
	3.	70137	6,5236E-04	99,51	

*koncentracija je izračunata preko jednadžbe umjernog pravca

**Formula za izračun:
$$\text{Iskorištenje (\%)} = 100 + \frac{\text{izračunata konc.} - \text{nominalna konc.}}{\text{nominalna konc.}} \times 100$$

Kriterij prihvatljivosti za odstupanje od linearnosti analitičke metode iznosi 80 – 120%. Iz tablice 15 vidljivo je da je kriterij prihvatljivosti zadovoljen za sve ispitane koncentracije (0,0006 mg/mL, 0,0003 mg/mL, 0,0002 mg/mL i 0,00006 mg/mL).

4.1.4. Ispitivanje ponovljivosti

Ponovljivost je ispitana na koncentraciji od 20 mg/mL. Uzorak PMVhTA obogaćen je otopinom onečišćenja IMP-1 koncentracije 10 ppm (tablica 16).

Tablica 16. Rezultati ponovljivosti

Uzorak	A	\bar{A}	s	RSD (%)
obogaćeni uzorak PMVhTA	27556	27785,17	137,12	0,49
	27740			
	27919			
	27901			
	27735			
	27860			

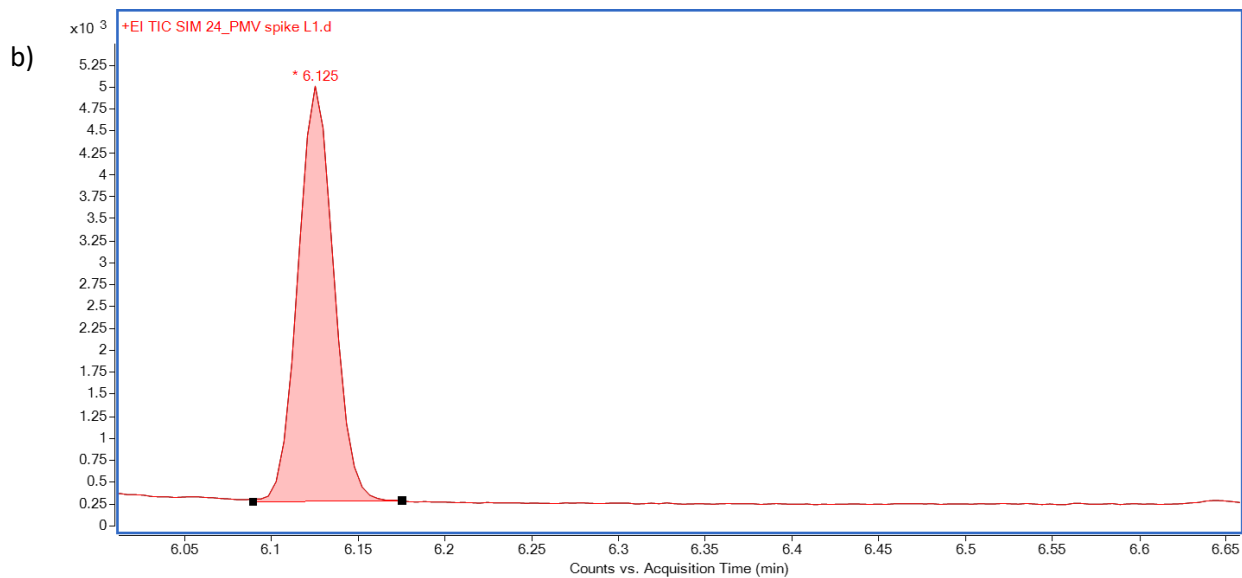
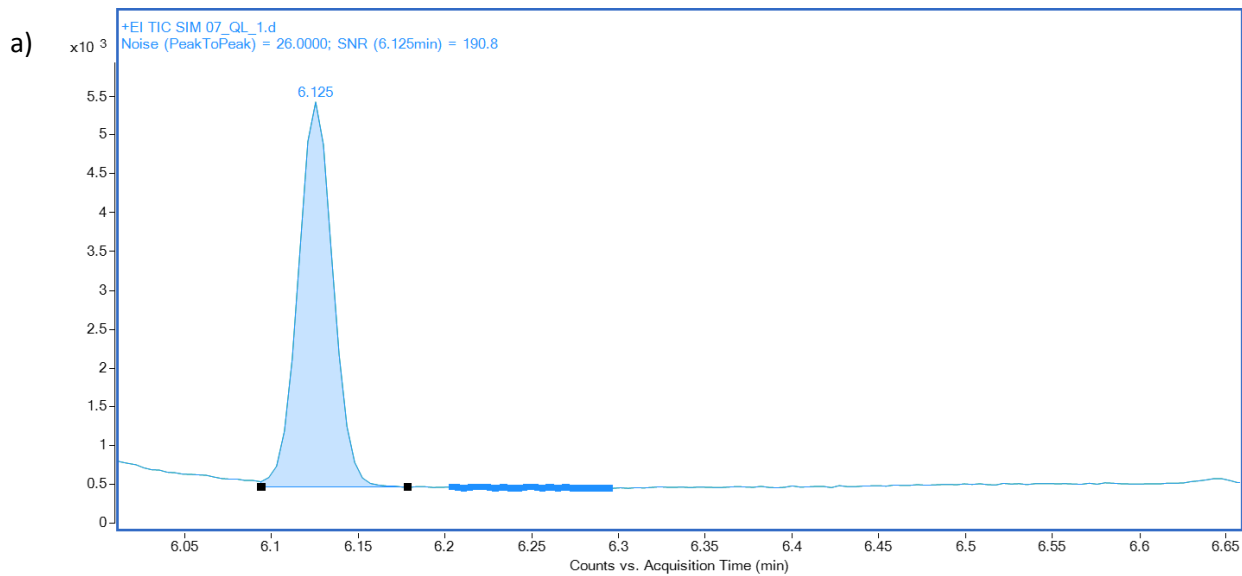
Prema dobivenoj vrijednosti RSD prikazanoj u tablici 16, koja iznosi 0,49%, vidljivo je da je kriterij prihvatljivosti za ponovljivost zadovoljen ($RSD \leq 30\%$).

4.1.5. Točnost

Točnost je određena usporedbom odgovora standardne otopine onečišćenja s odgovorom obogaćenog uzorka. Ispitivanje je provedeno na četiri koncentracije: 0,00006 mg/mL (L1/QL), 0,0002 mg/mL (L2), 0,0003 mg/mL (L3) i 0,0006 mg/mL (L5) (tablice 17.1.-17.4. i slike 20.1.-20.4.).

Tablica 17.1. Točnost određivanja onečišćenja IMP-1 na koncentraciji 0,00006 mg/mL

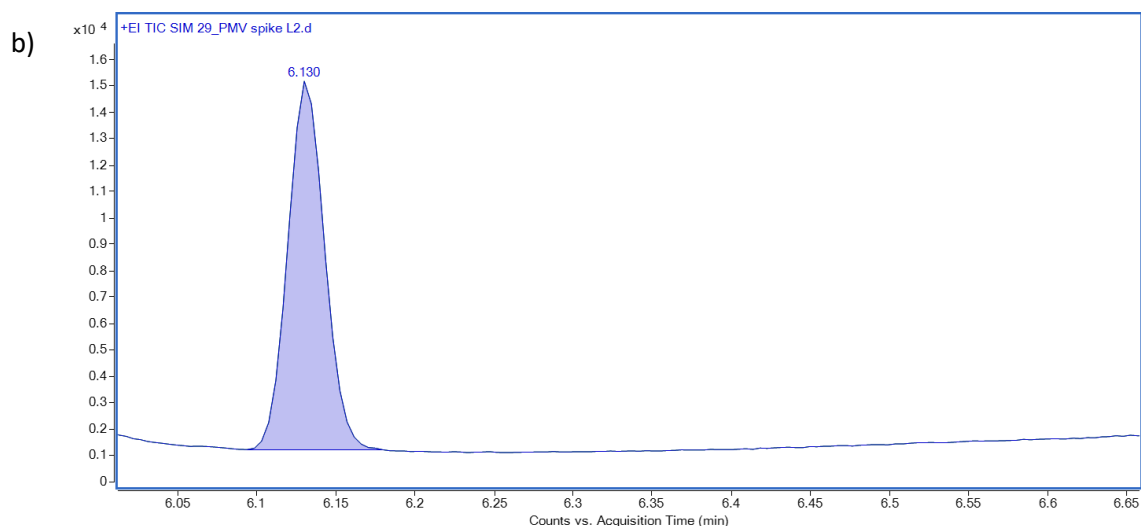
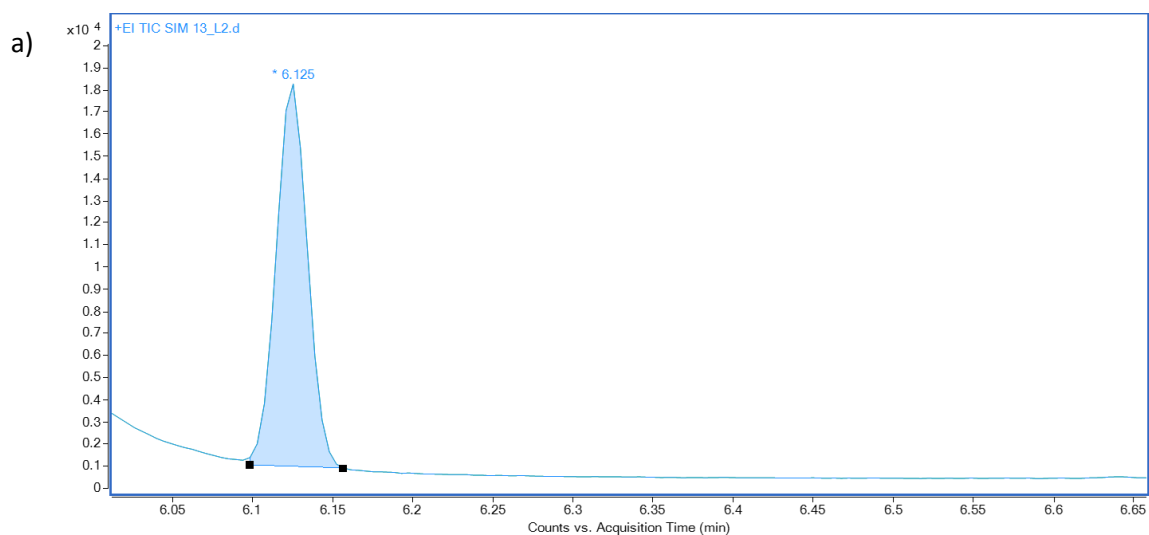
Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
QL/L1 0,00006 mg/mL	6,129	6721	6,13	6781	100,9
	6,125	6636	6,13	6820	
	6,125	6778	6,13	6709	
	\bar{A}	6711,67		6770,00	
	s	71,46		56,31	
	RSD (%)	1,1		0,8	



Slika 20.1. Prikaz kromatograma otopine L1/QL (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom L1 (b)

Tablica 17.2. Točnost određivanja onečišćenja IMP-1 na koncentraciji 0,0002 mg/mL

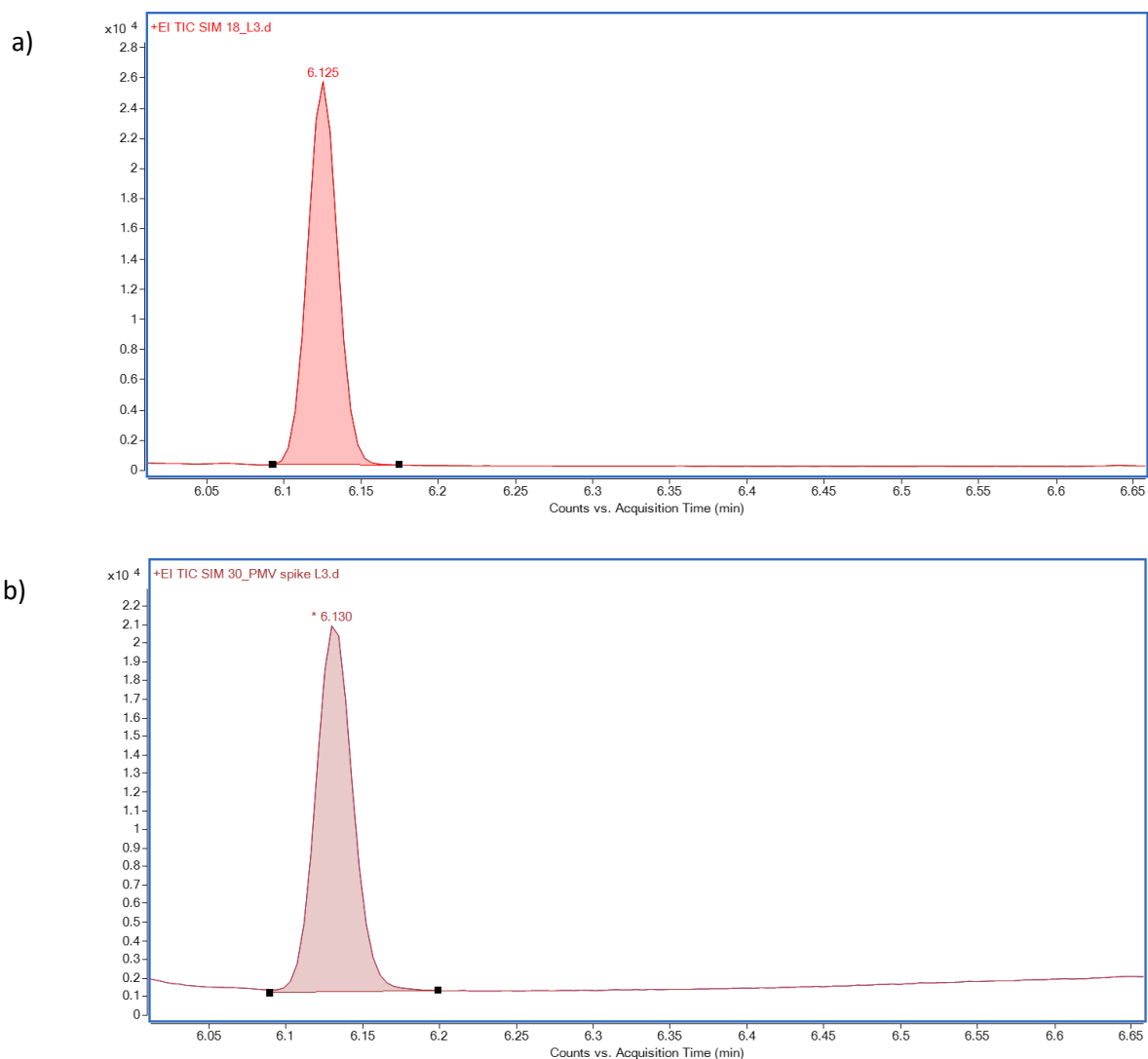
Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
L2 0,0002 mg/mL	6,125	23492	6,13	22724	99,6
	6,125	22704	6,13	23296	
	6,125	22696	6,13	22596	
	\bar{A}	22964,00		22872,00	
	s	457,28		372,73	
	RSD (%)	2,0		1,6	



Slika 20.2. Prikaz kromatograma otopine L2 (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom L2 (b)

Tablica 17.3. Točnost određivanja onečišćenja IMP-1 na koncentraciji 0,0003 mg/mL

Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
L3 0,0003 mg/mL	6,125	34759	6,13	33238	96,0
	6,125	34450	6,13	33032	
	6,125	34710	6,13	33454	
	\bar{A}	34639,67		33241,33	
	s	166,07		211,02	
	RSD (%)	0,5		0,6	

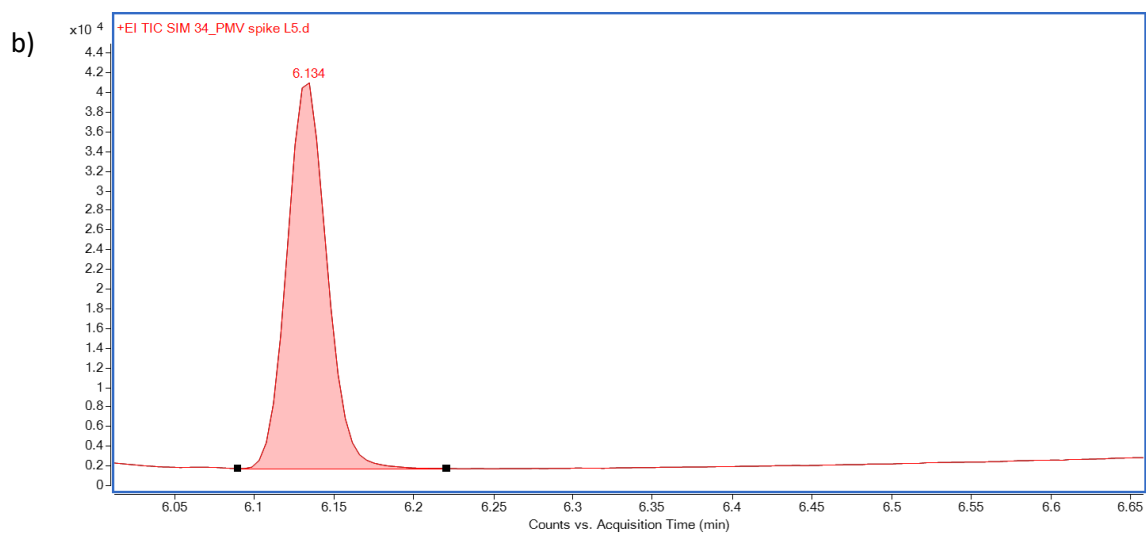
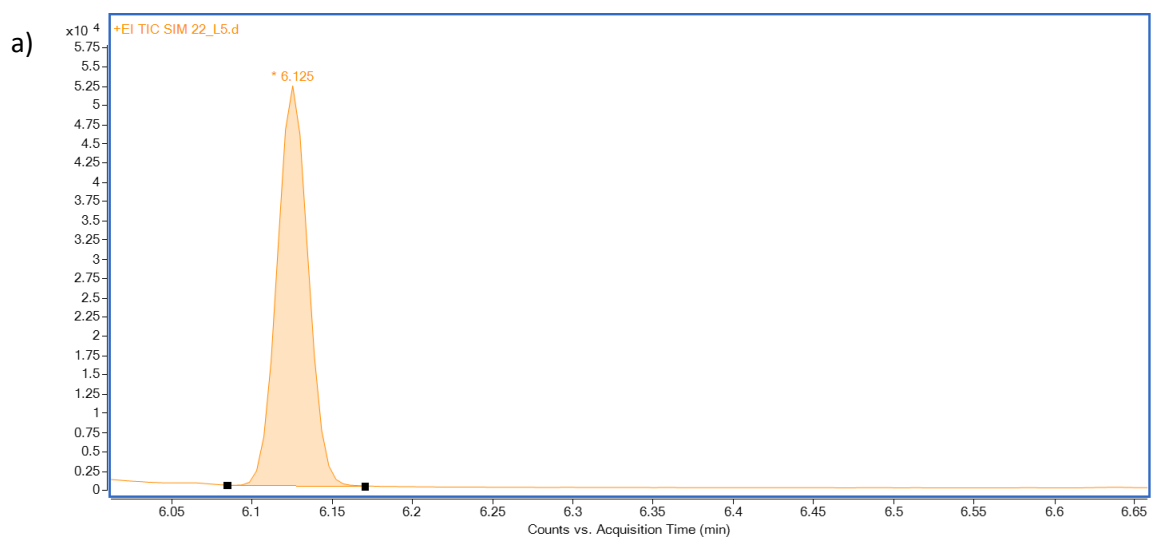


Slika 20.3. Prikaz kromatograma otopine L3 (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom L3

(b)

Tablica 17.4. Točnost određivanja onečišćenja IMP-1 na koncentraciji 0,0006 mg/mL

Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
L5 0,0006 mg/mL	6,125	70937	6,13	68462	97,4
	6,125	70287	6,13	68737	
	6,125	70137	6,13	69556	
	\bar{A}	70453,67		68918,33	
	s	425,25		569,10	
	RSD (%)	0,6		0,8	



Slika 20.4. Prikaz kromatograma otopine L5 (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom L5 (b)

Na temelju dobivenih rezultata uočava se da su površine ispod kromatografskih krivulja standardne otopine onečišćenja i obogaćene otopine vrlo slične pri određenoj koncentraciji. Dobiveno iskorištenje na QL razini iznosi 100,9%, što znači da je kriterij točnosti zadovoljen (70 – 130%). Za ostale koncentracije (L2, L3 i L5) kriterij točnosti je također zadovoljen jer je iskorištenje unutar granica prihvatljivosti (80 – 120%).

4.1.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su na temelju omjera signala i šuma (eng. *signal-to-noise*, S/N). Uspoređuje se izmjereni signal uzorka s poznatom koncentracijom analita s izmjerenim signalom slijepe probe te utvrđuje minimalna koncentracija pri kojoj se analit može pouzdano detektirati za granicu detekcije, odnosno kvantificirati za granicu kvantifikacije. Uobičajeno se kao vrijednost S/N za granicu detekcije uzima 3:1, a za granicu kvantifikacije 10:1 [25].

Tablica 18. Prikaz omjera signala i šuma kromatografske krivulje

	S/N	Prosječna vrijednost S/N
Granica detekcije (DL) 1,5 ppm	114	137
	116	
	181	
Granica kvantifikacije (QL) 3 ppm	191	183
	168	
	190	

Na temelju dobivenih vrijednosti omjera signala i šuma vidljivo je da je kriterij zadovoljen jer su vrijednosti S/N za granicu detekcije ≥ 3 , a za granicu kvantifikacije ≥ 10 .

4.1.7. Stabilnost otopine

Unutar 72 h ispitana je stabilnost standardne otopine IMP-1 koncentracije 10 ppm te stabilnost obogaćenog PMVhTA uzorka na koncentraciji 10 ppm (tablica 19).

Tablica 19. Rezultati ispitivanja stabilnosti

Otopina	Površina ispod kromatografske krivulje		Relativna razlika (%)*
	Otopina uzorka nakon 72 h	Svježa otopina uzorka	
standardna otopina IMP-1 (10 ppm)	28681	28488	0,7
obogaćeni (10 ppm) PMVhTA uzorak	27887	27556	1,2

$$*\text{Relativna razlika (\%)} = 2 \times \left(\frac{\text{svježa otopina} - \text{otopina nakon 72 h}}{\text{svježa otopina} + \text{otopina nakon 72 h}} \right) \times 100$$

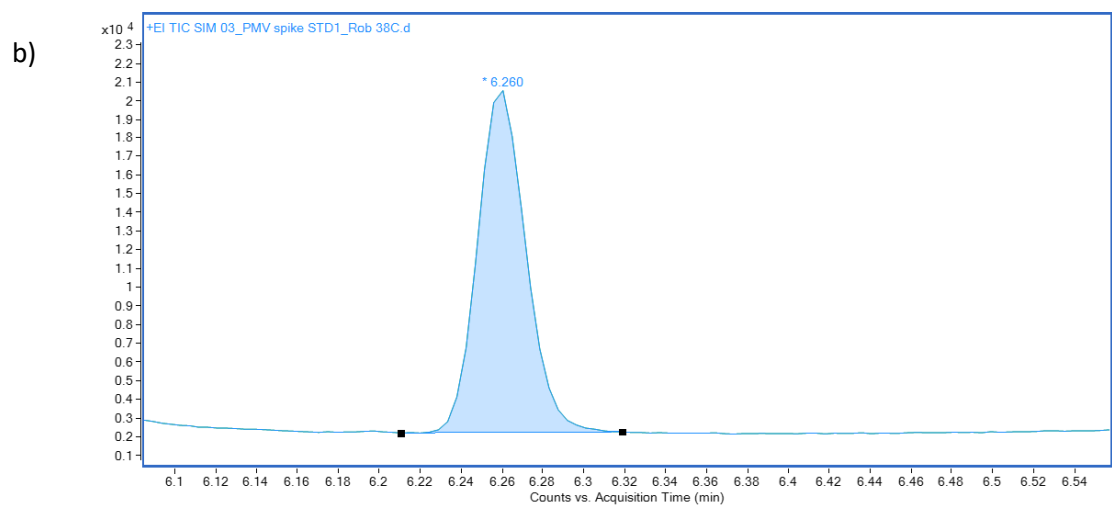
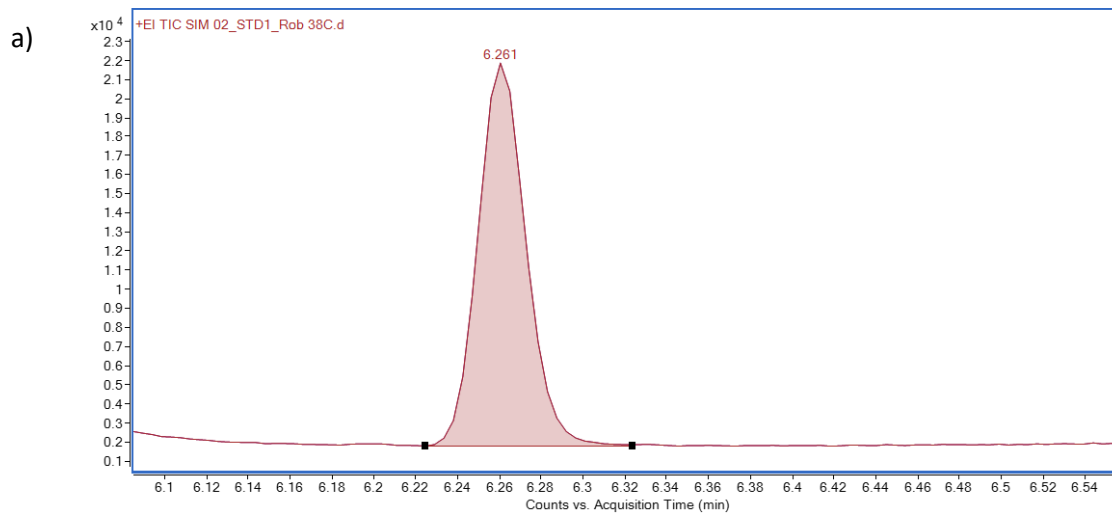
Kriterij prihvatljivosti za stabilnost otopine je da je relativno odstupanje $\leq 10,0\%$. Prema dobivenim vrijednostima relativne razlike vidljivo je da je kriterij zadovoljen za obje otopine. Prema tome se zaključuje da su otopine stabilne 72 h.

4.1.8. Robusnost

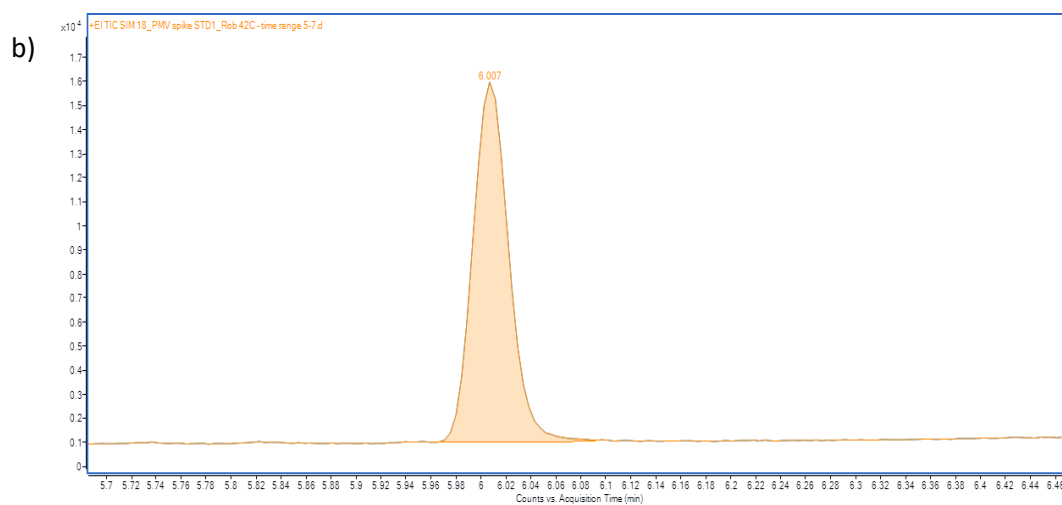
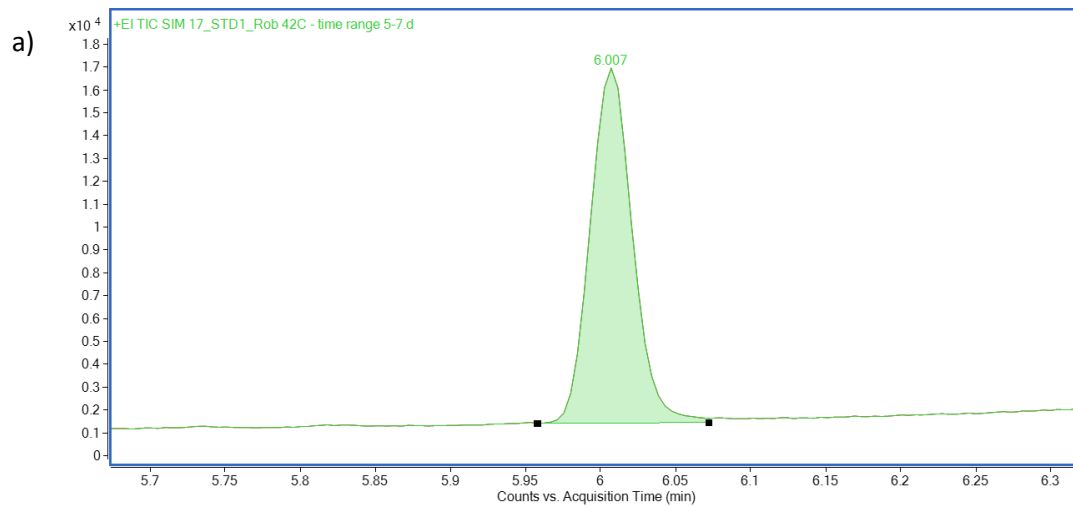
Robusnost bi trebala pokazati pouzdanost analize s obzirom na namjerne varijacije u parametrima metode. Ispitivanje robusnosti provedeno je s otopinom koncentracije 10 ppm te s uzrokom PMVhTA koji je obogaćen otopinom koncentracije 10 ppm (slike 21.1.-21.6.). Varijacije parametara navedene su u tablici 20.

Tablica 20. Varijacije parametara metode za ispitivanje robusnosti

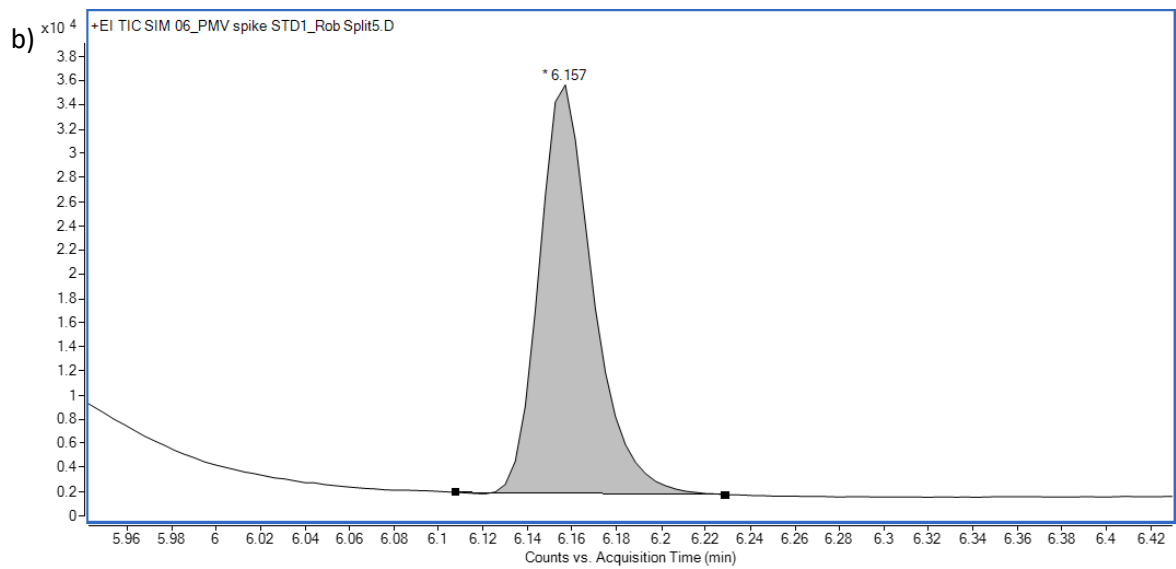
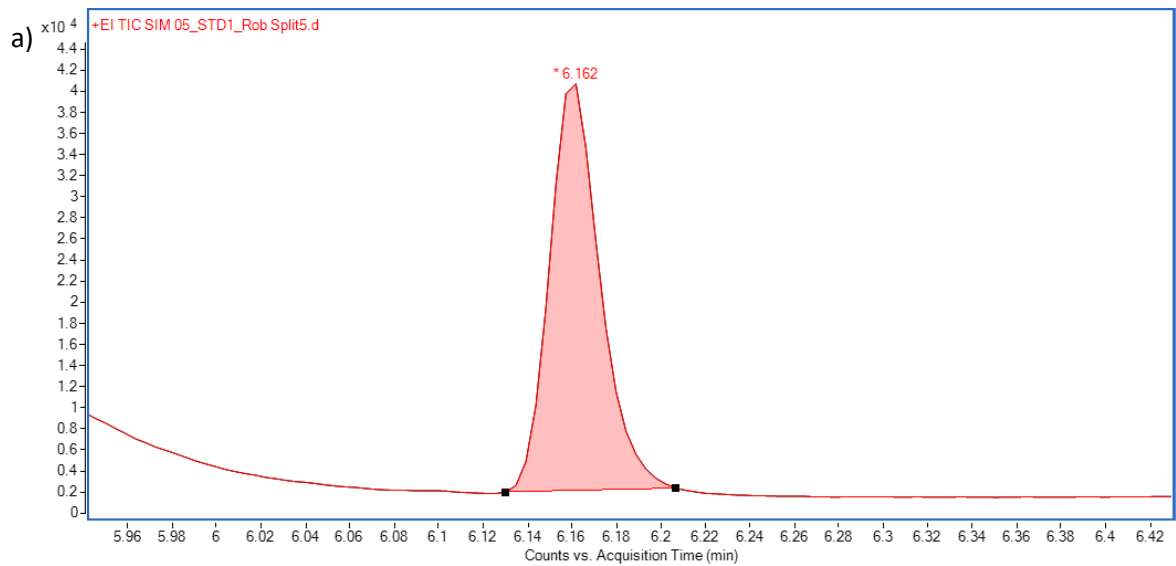
Temperatura kolone (°C)	Split omjer	Protok (mL/min)
38	5:1	1,0
42	15:1	2,0



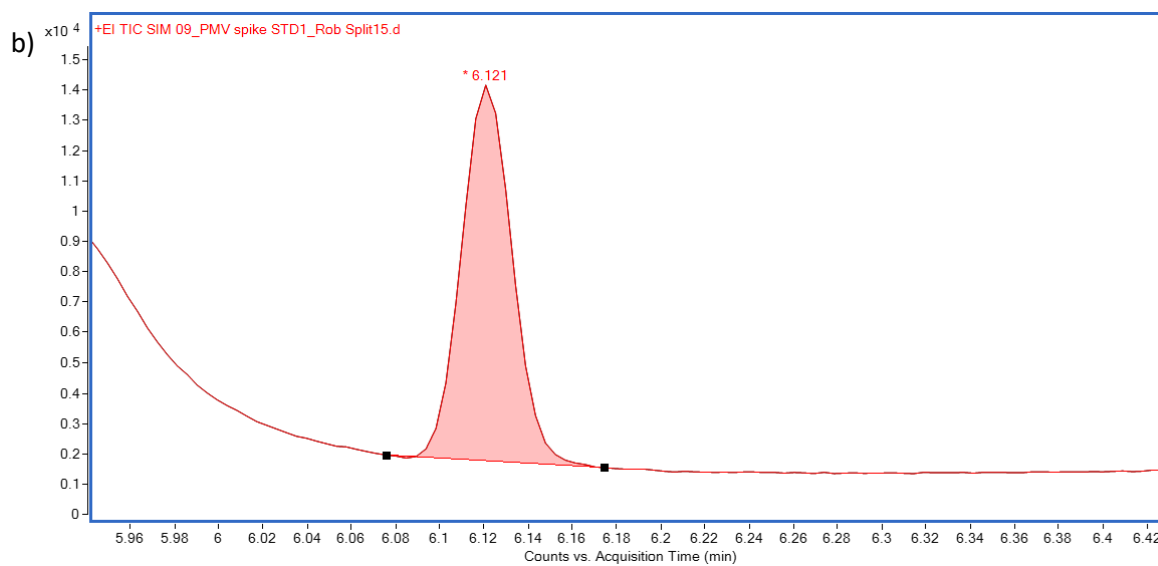
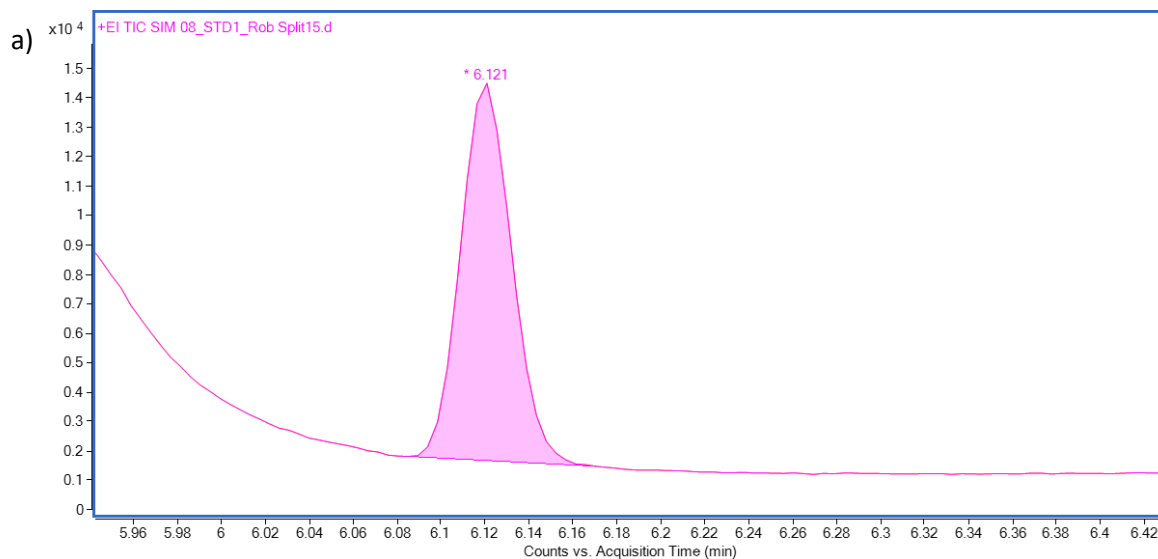
Slika 21.1. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) pri temperaturi kolone 38 °C



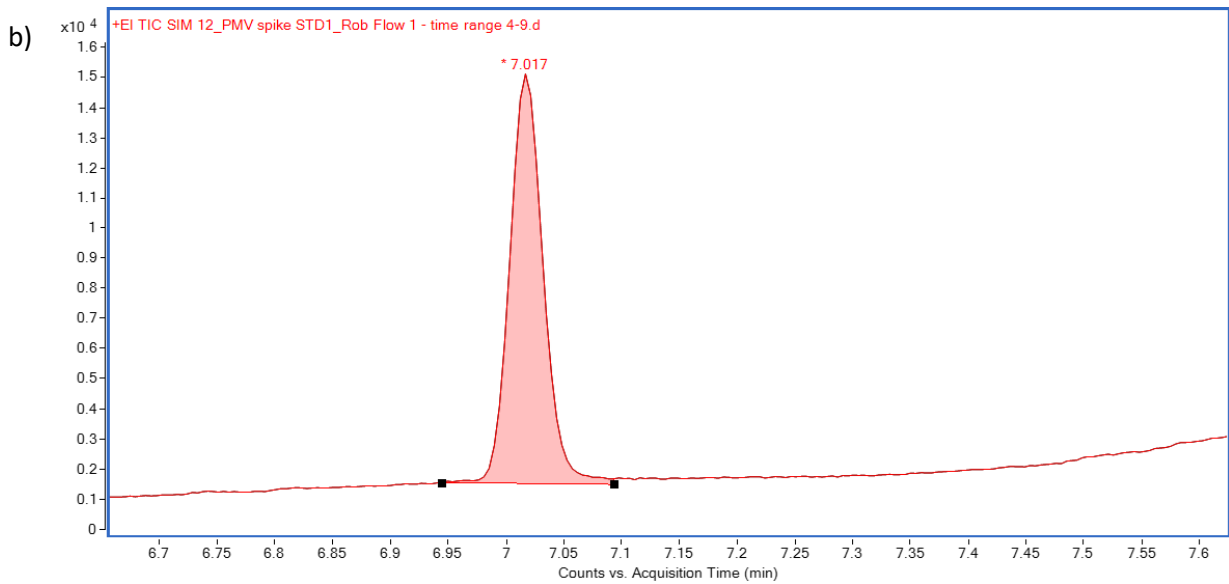
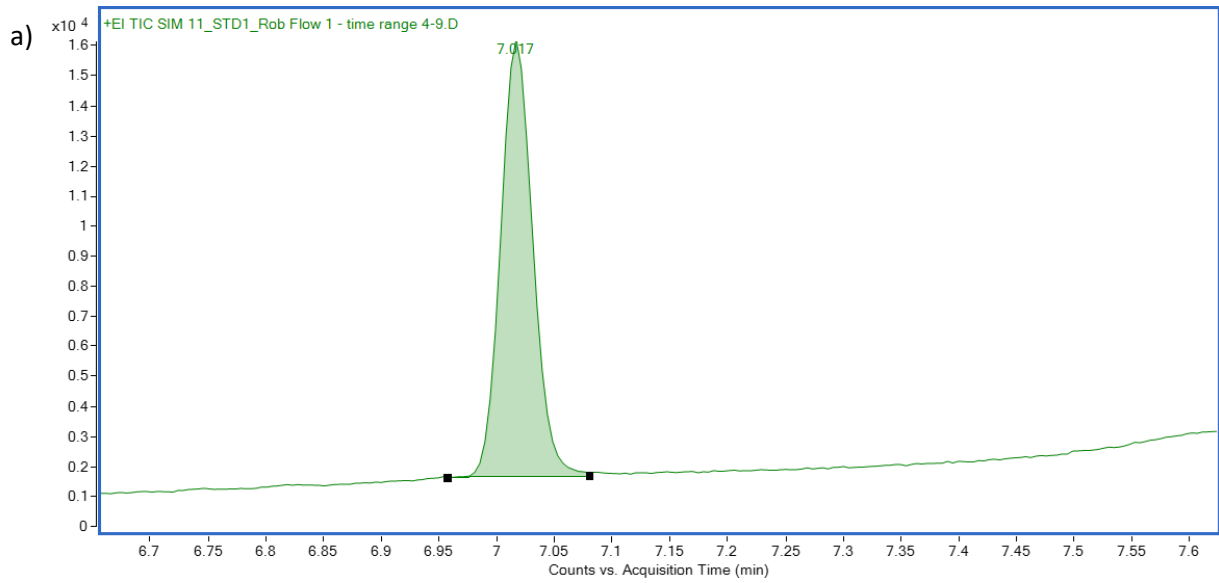
Slika 21.2. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) pri temperaturi kolone 42 °C



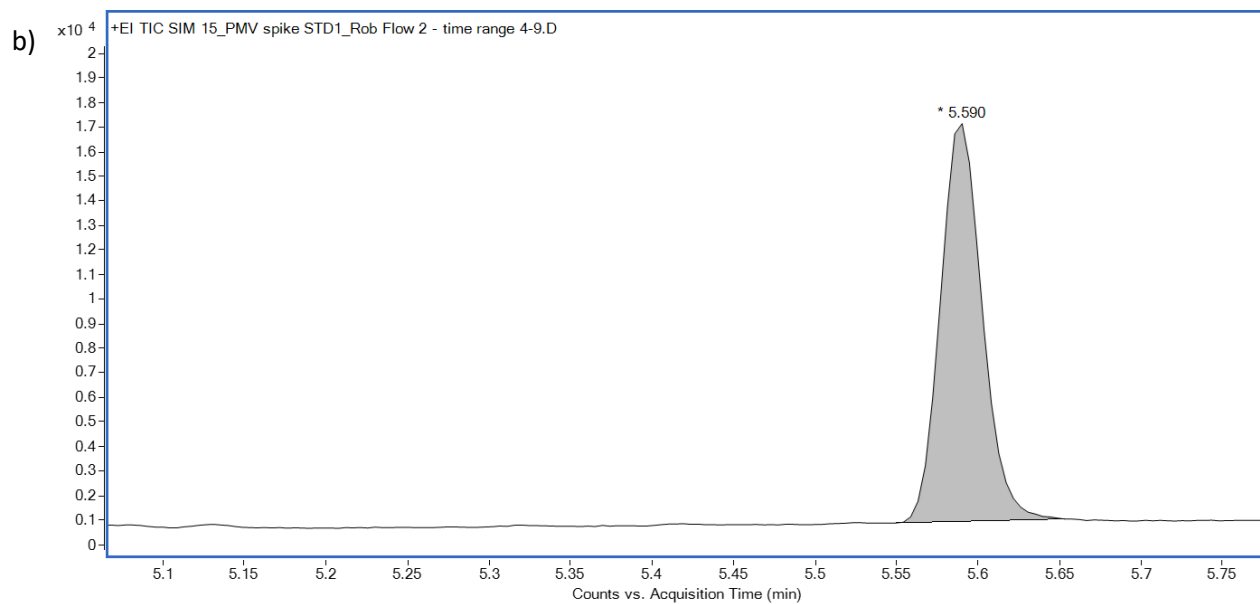
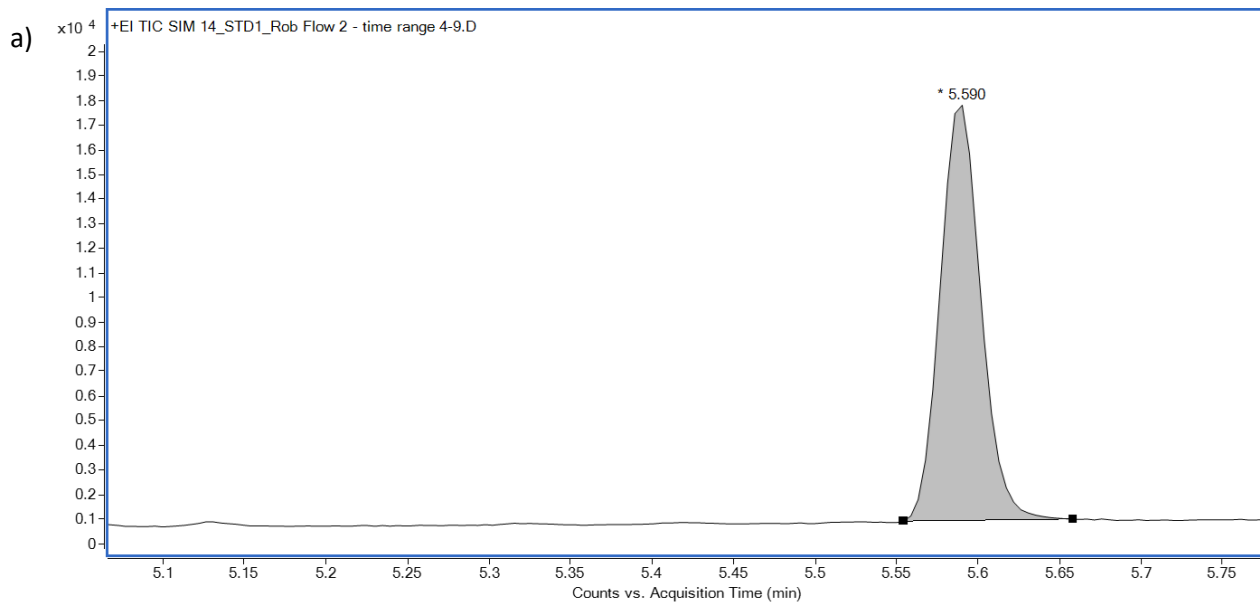
Slika 21.3. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) uz *split* omjer 5:1



Slika 21.4. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) uz *split* omjer 15:1



Slika 21.5. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) uz protok 1,0 mL/min



Slika 21.6. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) uz protok 2,0 mL/min

Tablica 21. Dobivene vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja i vremena zadržavanja prilikom varijacije parametara metode

Parametar		Uzorak	t_R	A
Početni uvjeti (temp. kolone=40 °C; <i>split</i> omjer=10:1; protok=1,5 mL/min)		STD1 (10 ppm)	6,125*	22964,0*
		Obogaćeni PMVhTA	6,130*	22872,0*
Temperatura kolone	38°C	STD1 (10 ppm)	6,261	32073
		Obogaćeni PMVhTA	6,26	30090
	42°C	STD1 (10 ppm)	6,004	27277
		Obogaćeni PMVhTA	6,004	24954
<i>Split</i> omjer	5:1	STD1 (10 ppm)	6,162	61173
		Obogaćeni PMVhTA	6,157	56789
	15:1	STD1 (10 ppm)	6,121	20789,66
		Obogaćeni PMVhTA	6,121	19733
Protok	1,0 mL/min	STD1 (10 ppm)	7,017	28317
		Obogaćeni PMVhTA	7,017	27487
	2,0 mL/min	STD1 (10 ppm)	5,590	29370
		Obogaćeni PMVhTA	5,590	28934

*srednje vrijednosti t_R i A

Na temelju podataka u tablici 21 vidljivi su pomaci vremena zadržavanja s promjenom parametara metode. Promjenom protoka uočava se značajan pomak t_R . Pri manjem protoku (1,0 mL/min) kromatografska krivulja izlazi kasnije, a pri većem protoku (2,0 mL/min) izlazi ranije (Slika 17.5. i 17.6.).

Varijacijom temperature kolone i *split* omjera nema značajnih pomaka vremena zadržavanja te se oblik kromatografske krivulje nije promijenio (Slika 17.1. -17.4.). Time se može zaključiti da je metoda robusna na male promjene vrijednosti kromatografskih parametara.

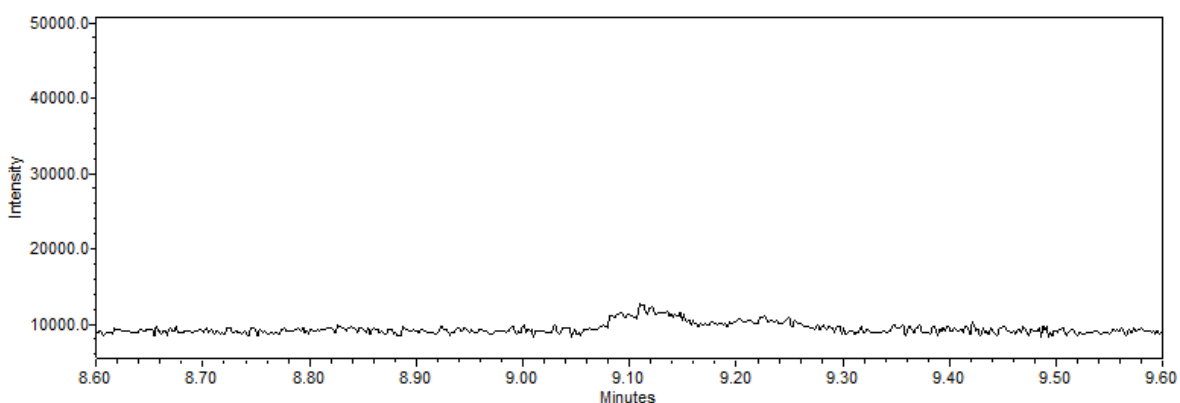
4.2. Validacija LC-MS metode

4.2.1. Specifičnost

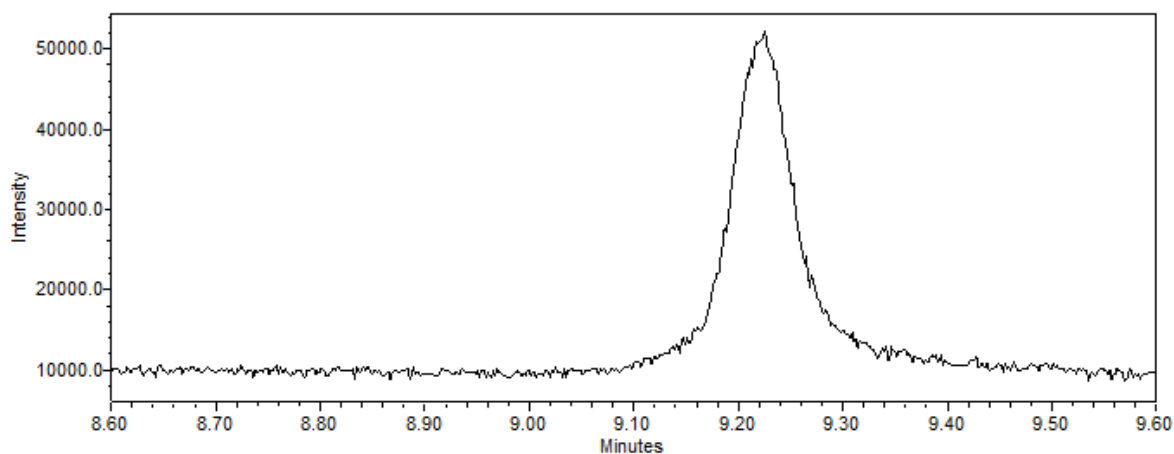
U ovom radu specifičnost je određena usporedbom kromatograma slijepe probe, otopine QL-a, otopine L2, otopine uzorka PMVhTA te otopine uzorka PMVhTA obogaćene s otopinom L2.

Na slici 22.1. vidljivo je da u otopini slijepe probe (acetonitril:voda=1:1) nisu prisutne druge tvari koje bi mogle utjecati na određivanje analita. Također, kod otopine uzorka PMVhTA (Slika 22.4.) vidljivo je da nema drugih tvari koje bi mogle interferirati s ispitivanim analitom. Na slikama 22.2., 22.3. i 22.5. može se vidjeti kromatografska krivulja ispitivanog analita (onečišćenja IMP-2), koja ima slično vrijeme zadržavanja u sva tri slučaja (t_R (otopina QL) = 9,22 min, t_R (otopina L2) = 9,22 min i t_R (uzorak PMVhTA obogaćen s otopinom L2) = 9,21 min).

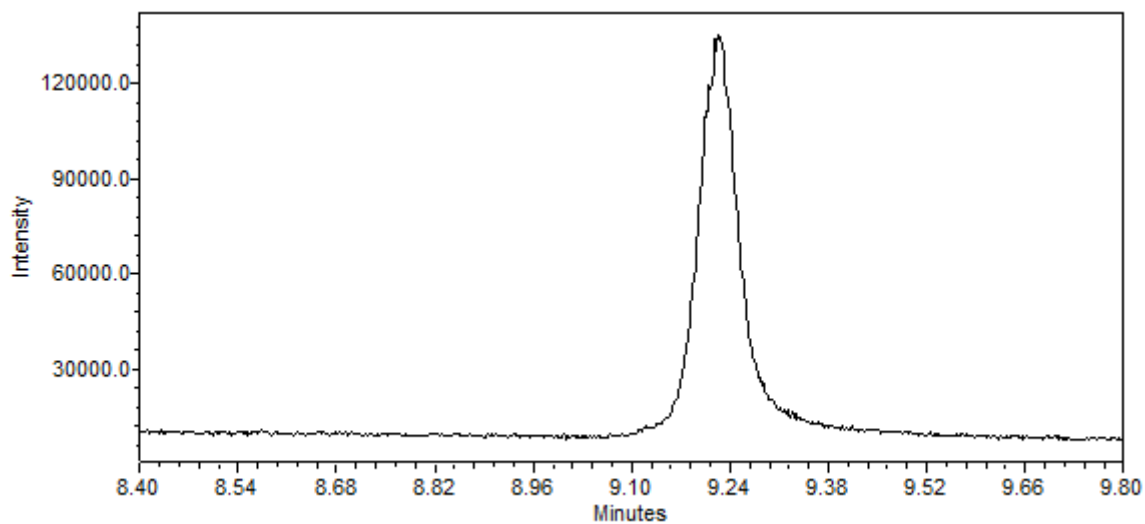
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da promjena koncentracije (3 i 10 ppm) i obogaćivanje uzorka ne utječe značajno na vrijeme zadržavanja te ne dolazi do interferencije drugih tvari tijekom analize ispitivanog analita. Time je potvrđena specifičnost metode.



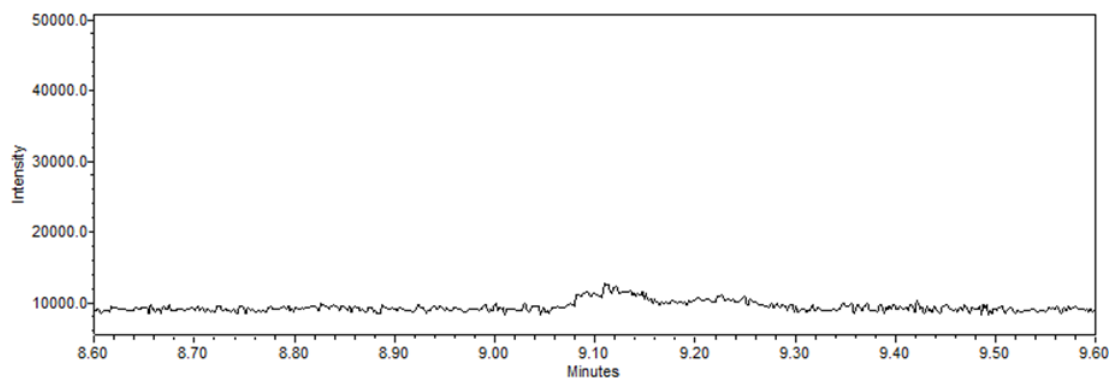
Slika 22.1. Kromatogram otopine slijepe probe (ACN:voda=1:1)



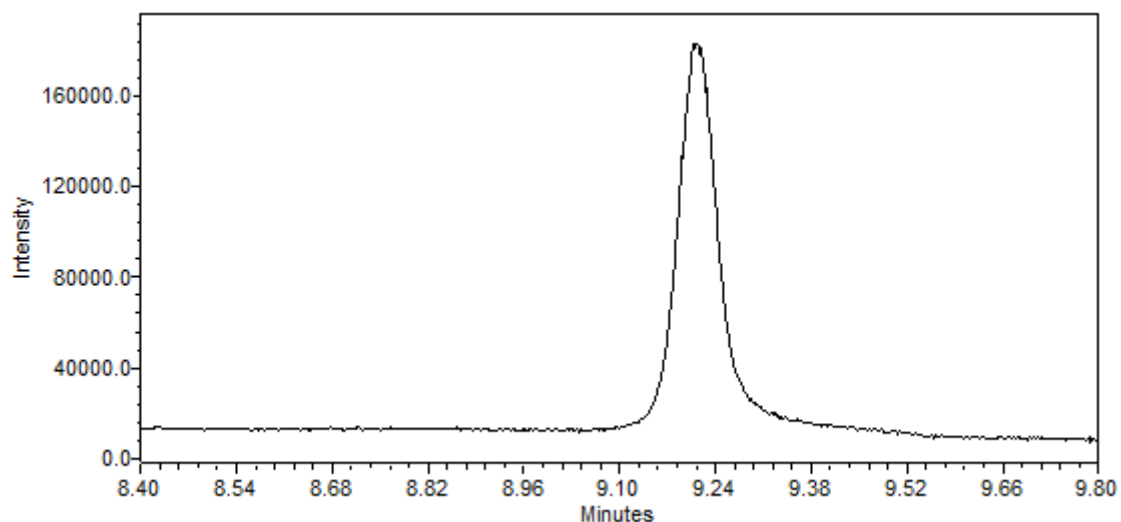
Slika 22.2. Kromatogram otopine QL-a (3 ppm)



Slika 22.3. Kromatogram otopine L2 (10 ppm)



Slika 22.4. Kromatogram uzorka PMVhTA



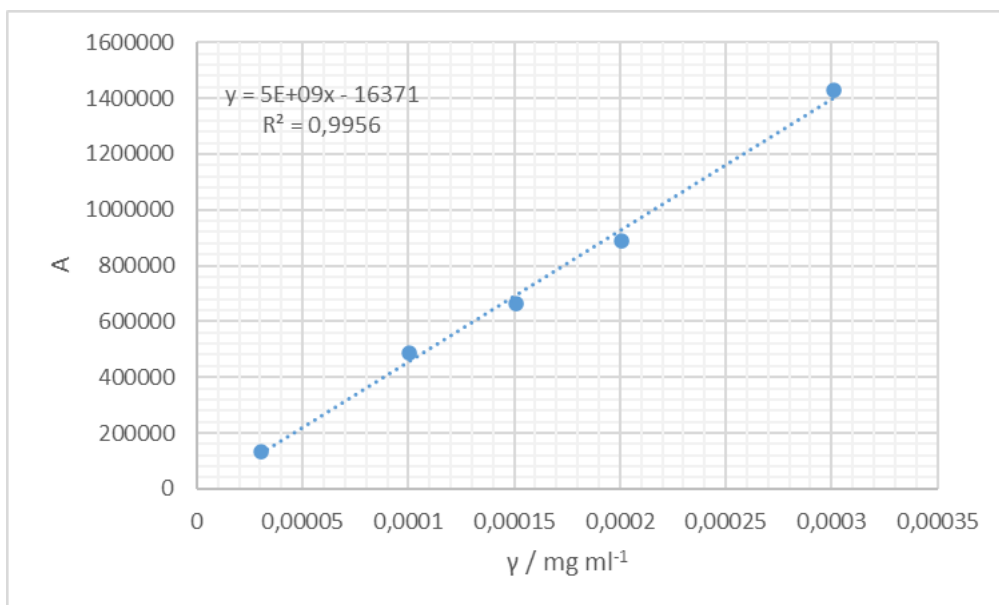
Slika 22.5. Kromatogram uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom L2

4.2.2. Linearnost

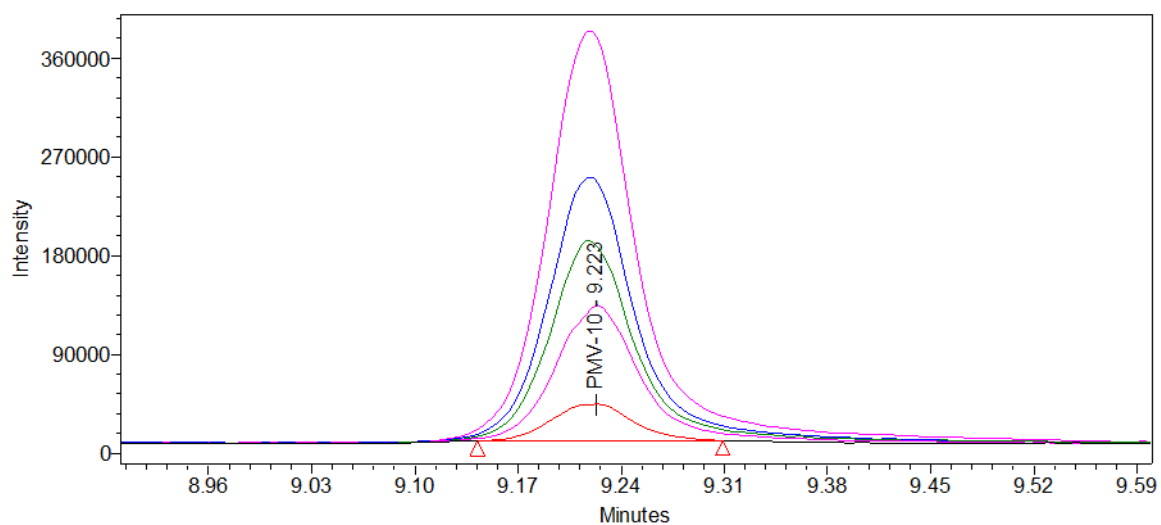
Ispitivanje linearnosti provedeno je s pet otopina onečišćenja IMP-2 različitih koncentracija u rasponu od 0,00003 mg/mL do 0,0003 mg/mL. Svakoj otopini određena je površina ispod kromatografske krivulje te je nacrtan umjerni pravac iz kojeg je određen nagib pravca, odsječak i koeficijent determinacije (tablica 22, slike 23 i 24).

Tablica 22. Površine kromatografskih krivulja za pojedine koncentracije

Uzorak	γ (mg/mL)	A
L5	0,0003	1428481
L4	0,0002	889019
L3	0,00015	665640
L2	0,0001	487905
L1	0,00003	130745



Slika 23. Grafički prikaz ovisnosti površine kromatografske krivulje onečišćenja IMP-2 o koncentraciji



Slika 24. Kromatogram prikazuje linearnost otopina onečišćenja IMP-2

Na temelju dobivene vrijednosti koeficijenta determinacije, koja iznosi 0,9956, može se zaključiti da je potvrđena linearnost metode jer je zadovoljen postavljen kriterij $R^2 \geq 0,990$.

4.2.3. Odstupanje od linearnosti analitičke metode

Za određivanje odstupanja od linearnosti analitičke metode pripravljene su otopine koncentracija: 0,00003 mg/mL; 0,0001 mg/mL; 0,00015 mg/mL i 0,0003 mg/mL. Svaka otopina injektirana je tri puta (tablica 23).

Tablica 23. Rezultati odstupanja od linearnosti

Uzorak		A	Izračunata koncentracija* (mg/mL)	Iskorištenje** (%)	Srednja vrijednost iskorištenja (%)
QL (0,00003 mg/mL)	1.	145011	3,4321E-05	113,91	115,4
	2.	162964	3,8139E-05	126,58	
	3.	133537	3,1881E-05	105,81	
L2 (0,0001 mg/mL)	1.	487905	1,0724E-04	106,78	104,3
	2.	478706	1,0529E-04	104,83	
	3.	462227	1,0178E-04	101,34	
L3 (0,00015 mg/mL)	1.	657362	1,4328E-04	95,11	95,3
	2.	665640	1,4504E-04	96,28	
	3.	653338	1,4243E-04	94,54	
L5 (0,0003 mg/mL)	1.	1428481	3,0728E-04	101,98	99,3
	2.	1351479	2,9090E-04	96,55	
	3.	1392985	2,9973E-04	99,48	

*koncentracija je izračunata preko jednadžbe umjernog pravca

**Formula za izračun:
$$\text{Iskorištenje (\%)} = 100 + \frac{\text{izračunata konc.} - \text{nominalna konc.}}{\text{nominalna konc.}} \times 100$$

Kriterij prihvatljivosti za odstupanje od linearnosti analitičke metode iznosi 80 – 120%. Prema podacima u tablici 23 vidljivo je da je kriterij prihvatljivosti zadovoljen za sve ispitane koncentracije (0,00003 mg/mL; 0,0001 mg/mL; 0,00015 mg/mL i 0,0003 mg/mL).

4.2.4. Ispitivanje ponovljivosti

Ponovljivost je ispitana na koncentraciji od 10 mg/mL. Uzorak PMVhTA obogaćen je otopinom onečišćenja IMP-2 koncentracije 10 ppm (tablica 24).

Tablica 24. Rezultati ponovljivosti

Uzorak	A	\bar{A}	s	RSD (%)
obogaćeni uzorak PMVhTA	496439	490446,67	5614,25	1,14
	480676			
	491964			
	493552			
	487386			
	492663			

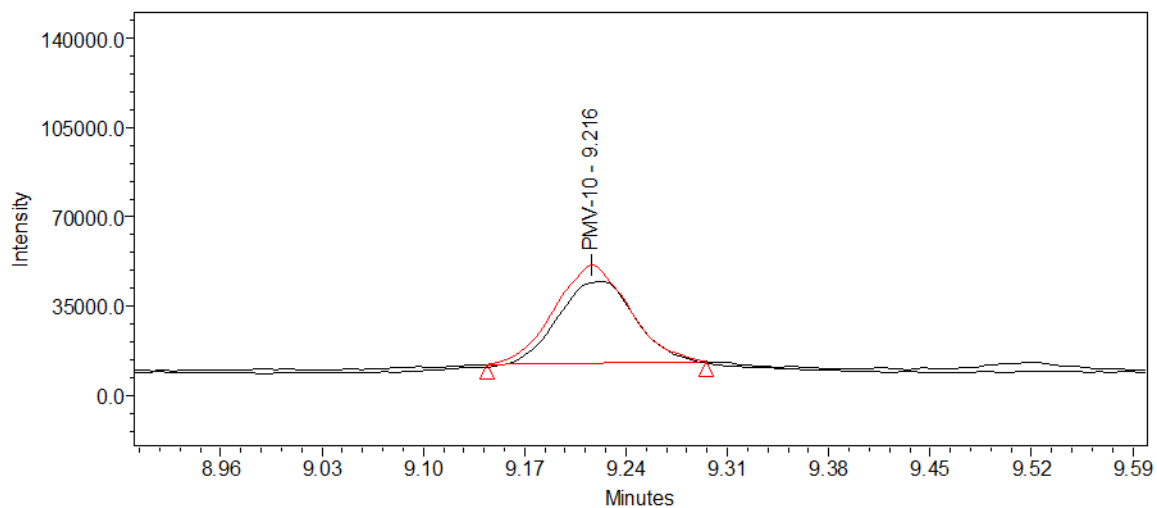
Na temelju dobivene vrijednosti RSD-a (1,14%) vidljivo je da je zadovoljen kriterij prihvatljivosti za ponovljivost ($RSD \leq 30\%$).

4.2.5. Točnost

Točnost je određena usporedbom odgovora standardne otopine onečišćenja s odgovorom obogaćene otopine. Ispitivanje je provedeno za onečišćenje IMP-2 na četiri koncentracije: 0,00003 mg/ml (L1/QL); 0,0001 mg/ml (L2); 0,00015 mg/ml (L3) i 0,0003mg/ml (L5) (tablice 25.1.-25.4. i slike 25.1.-25.4.).

Tablica 25.1. Točnost određivanja onečišćenja IMP-2 na koncentraciji 0,00003 mg/mL

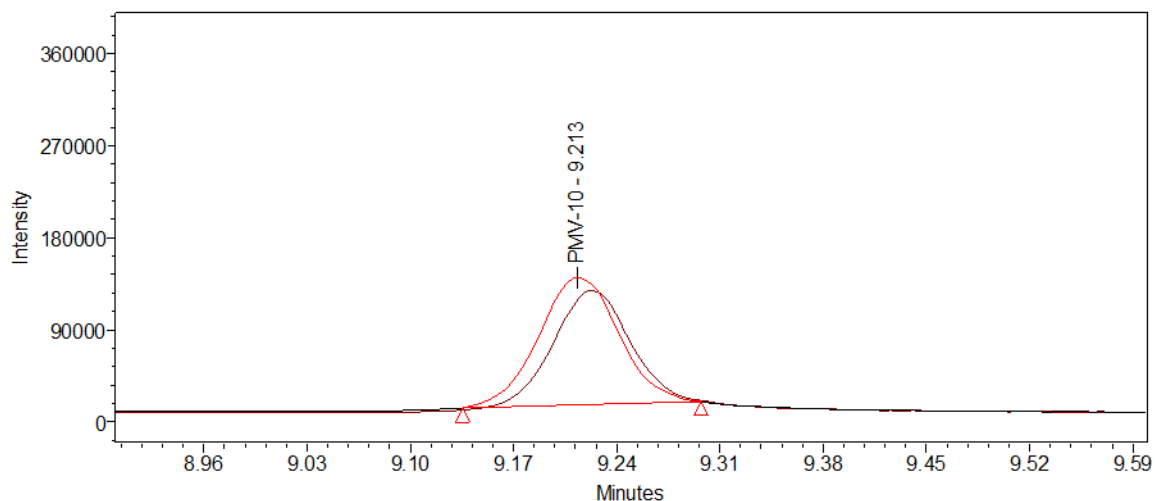
Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
QL/L1 (0,00003 mg/mL)	9,221	145011	9,216	138626	94,2
	9,223	162964	9,216	138219	
	9,218	133537	9,214	138895	
	\bar{A}	147170,67		138580,00	
	s	14831,90		340,34	
	RSD (%)	10,1		0,2	



Slika 25.1. Prikaz kromatografskih krivulja standardne otopine onečišćenja na QL/L1 koncentraciji (crna krivulja) i obogaćene otopine (crvena krivulja)

Tablica 25.2. Točnost određivanja onečišćenja IMP-2 na koncentraciji 0,0001 mg/mL

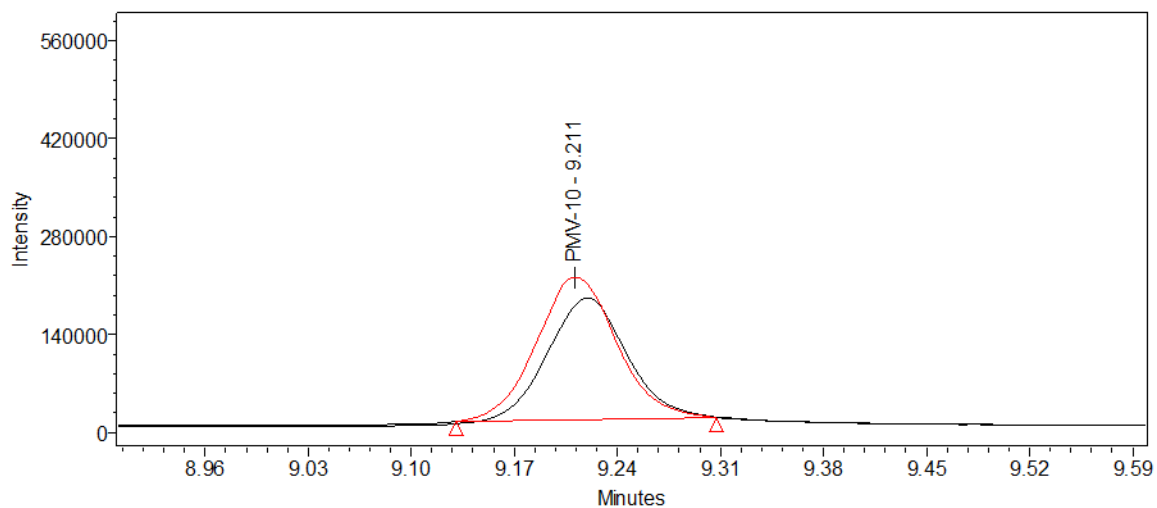
Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
L2 (0,0001 mg/mL)	9,219	487905	9,213	477984	99,6
	9,224	478706	9,213	471110	
	9,222	462227	9,212	474459	
	\bar{A}	476279,33		474517,67	
	s	13009,86		3437,38	
	RSD (%)	2,7		0,7	



Slika 25.2. Prikaz kromatografskih krivulja standardne otopine onečišćenja na L2 koncentraciji (crna krivulja) i obogaćene otopine (crvena krivulja)

Tablica 25.3. Točnost određivanja onečišćenja IMP-2 na koncentraciji 0,00015 mg/mL

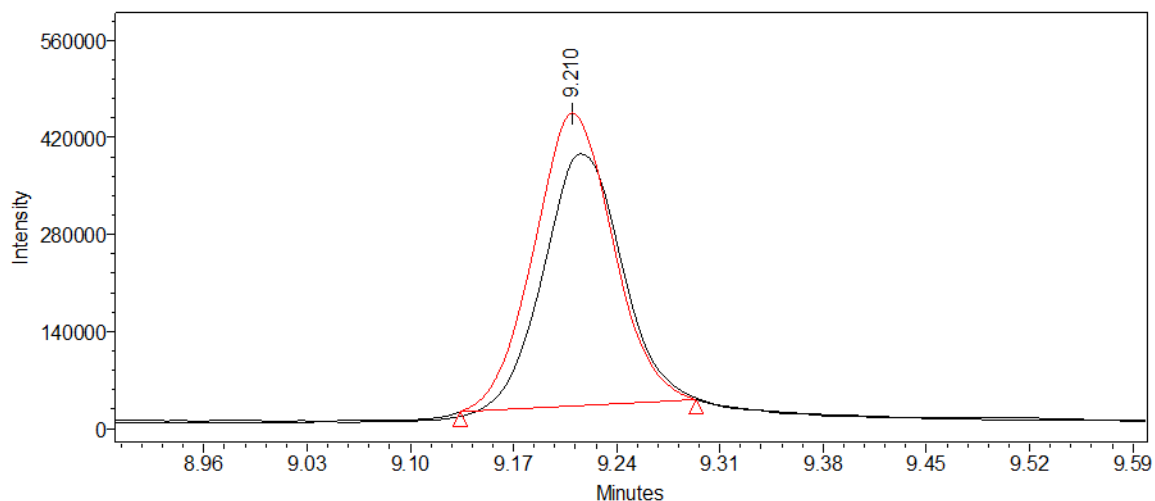
Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
L3 (0,00015 mg/mL)	6,125	34759	9,211	776854	107,0
	6,125	34450	9,213	668693	
	6,125	34710	9,211	669777	
	\bar{A}	658780,00		705108,00	
	s	6272,39		62136,22	
	RSD (%)	1,0		8,8	



Slika 25.3. Prikaz kromatografskih krivulja standardne otopine onečišćenja na L3 koncentraciji (crna krivulja) i obogaćene otopine (crvena krivulja)

Tablica 25.4. Točnost određivanja onečišćenja IMP-2 na koncentraciji 0,0003 mg/mL

Koncentracija	Standardna otopina onečišćenja		Obogaćena otopina		Iskorištenje (%)
	t_R	A	t_R	A	
L5 (0,0003 mg/mL)	9,216	1428481	9,21	1579476	108,6
	9,22	1351479	9,212	1482998	
	9,219	1392985	9,212	1468083	
	\bar{A}	1390981,67		1510185,67	
	s	38540,07		60468,81	
	RSD (%)	2,8		4,0	



Slika 25.4. Prikaz kromatografskih krivulja standardne otopine onečišćenja na L5 koncentraciji (crna krivulja) i obogaćene otopine (crvena krivulja)

Na temelju dobivenih rezultata uočava se da su površine ispod kromatografskih krivulja standardne otopine onečišćenja i obogaćene otopine vrlo slične na određenoj koncentraciji. Dobiveno iskorištenje za QL koncentraciju iznosi 94,2%, što znači da je kriterij zadovoljen (70 – 130%). Za ostale koncentracije (L2, L3 i L5) kriterij točnosti je također zadovoljen jer je postignuto iskorištenje unutar granica prihvatljivosti (80 – 120%).

4.2.6. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su kao i u poglavlju 4.1.6. na temelju omjera signala i šuma (S/N). Pritom za granicu detekcije vrijedi $S/N \geq 3$, a za granicu kvantifikacije $S/N \geq 10$.

Tablica 26. Prikaz omjera signala i šuma kromatografske krivulje

	S/N	Prosječna vrijednost S/N
Granica detekcije (DL) 1,5 ppm	17	22
	29	
	19	
Granica kvantifikacije (QL) 3 ppm	63	55
	57	
	45	

Na temelju dobivenih vrijednosti omjera signala i šuma uočava se da je kriterij zadovoljen jer su vrijednosti S/N za granicu detekcije ≥ 3 , a za granicu kvantifikacije ≥ 10 .

4.2.7. Stabilnost otopine

Unutar 48 h ispitana je stabilnost standardne otopine IMP-2 koncentracije 10 ppm te stabilnost PMVhTA uzorka obogaćenog pri koncentraciji 10 ppm.

Tablica 27. Rezultati ispitivanja stabilnosti

Otopina	Površina ispod kromatografske krivulje		Relativna razlika (%)*
	Otopina uzorka nakon 48 h	Svježa otopina uzorka	
standardna otopina IMP-2 (10 ppm)	478706	665080	32,6
obogaćeni (10 ppm) PMVhTA uzorak	491964	712900	36,7

*Relativna razlika (%) = $2 \times \left(\frac{\text{svježa otopina} - \text{otopina nakon 48 h}}{\text{svježa otopina} + \text{otopina nakon 48 h}} \right) \times 100$

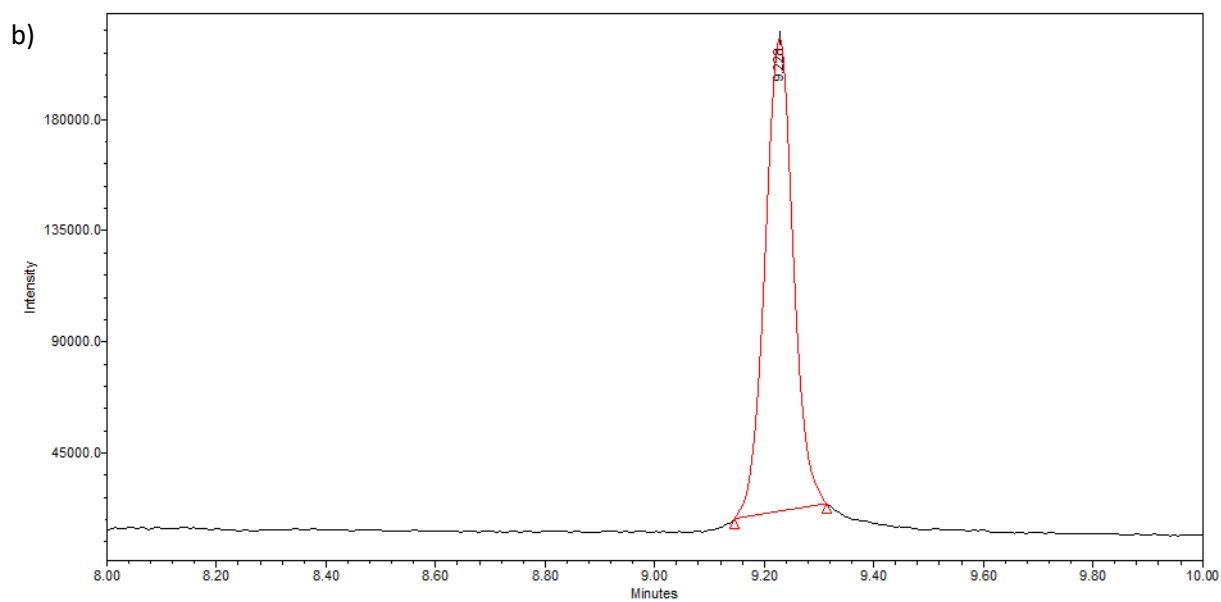
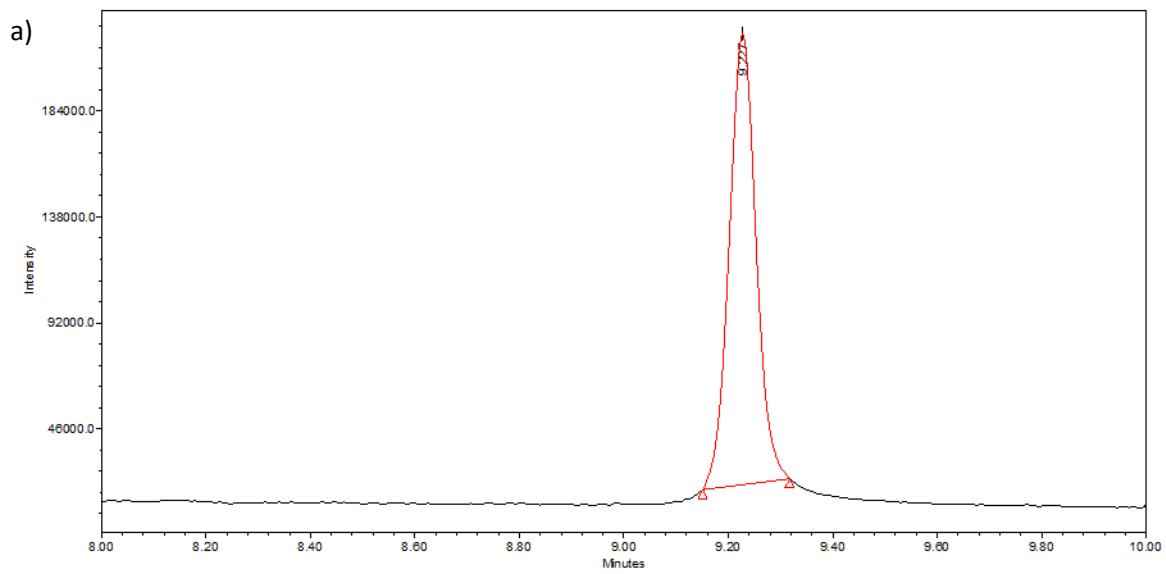
Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u tablici 27 možemo uočiti da nije zadovoljen kriterij prihvatljivosti za stabilnost otopine ($\leq 10,0\%$). Prema tome se može zaključiti da otopine nisu stabilne 48 h, te je potrebna svježa priprema otopina koje će se analizirati unutar 24 h.

4.2.8. Robusnost

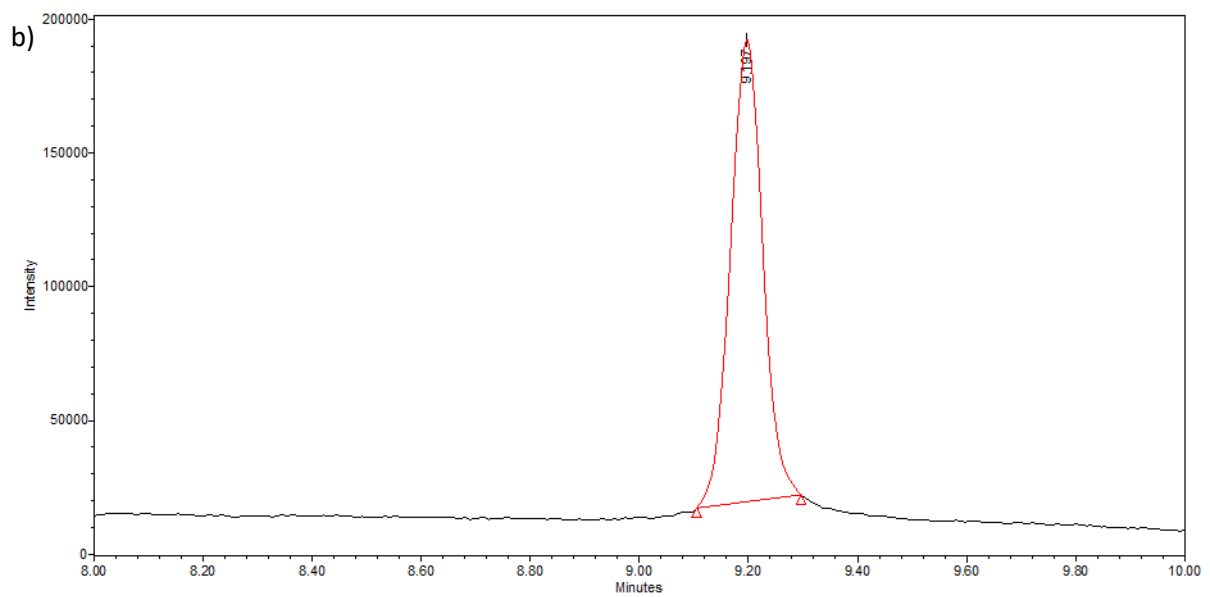
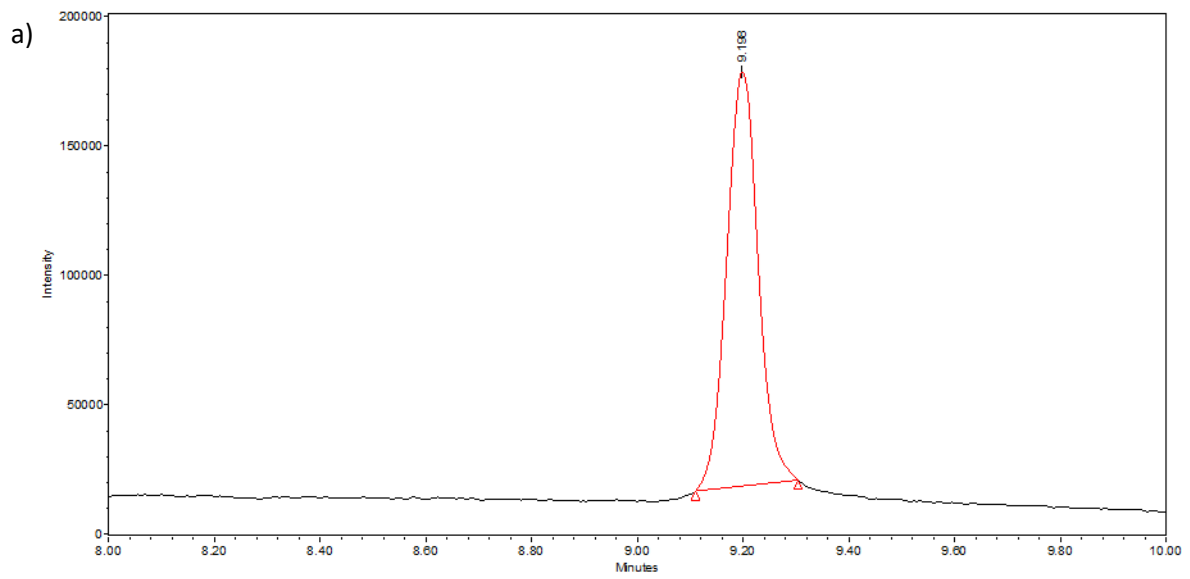
Ispitivanje robusnosti provedeno je s otopinom koncentracije 10 ppm te s uzrokom PMVhTA koji je obogaćen otopinom koncentracije 10 ppm (Slike 26.1.-26.4.). Varijacije parametara navedene su u tablici 28.

Tablica 28. Varijacije parametara metode za ispitivanje robusnosti

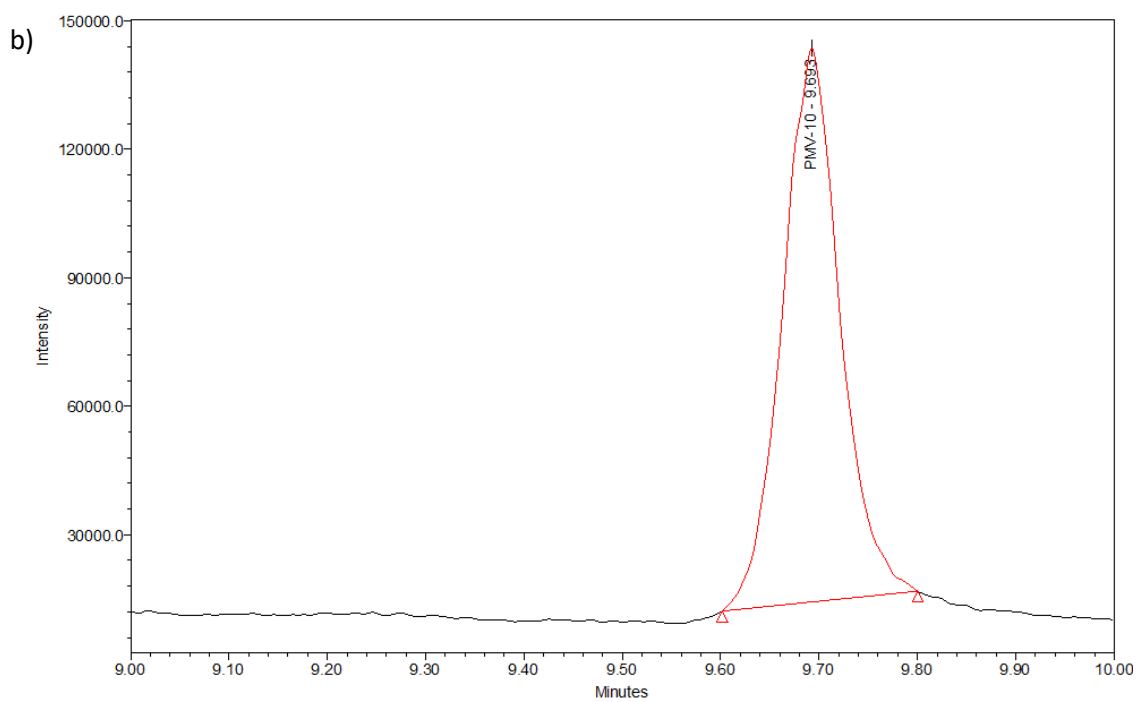
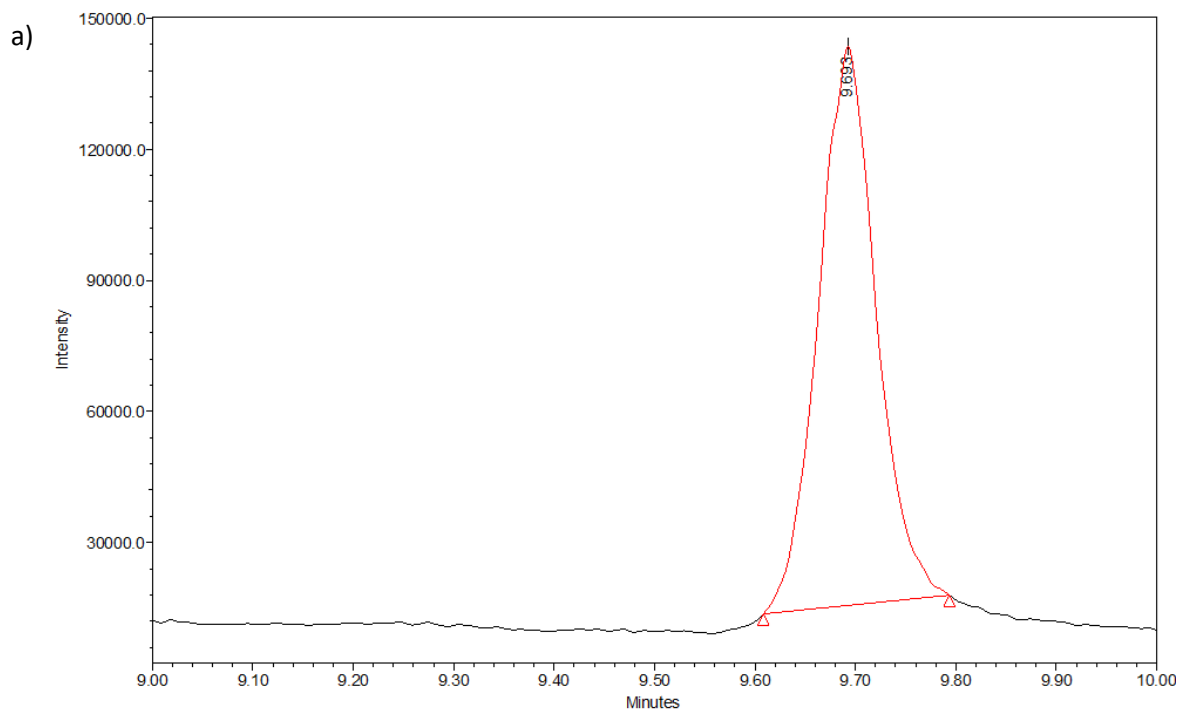
Temperatura kolone (°C)	Protok (mL/min)
35	0,45
45	0,55



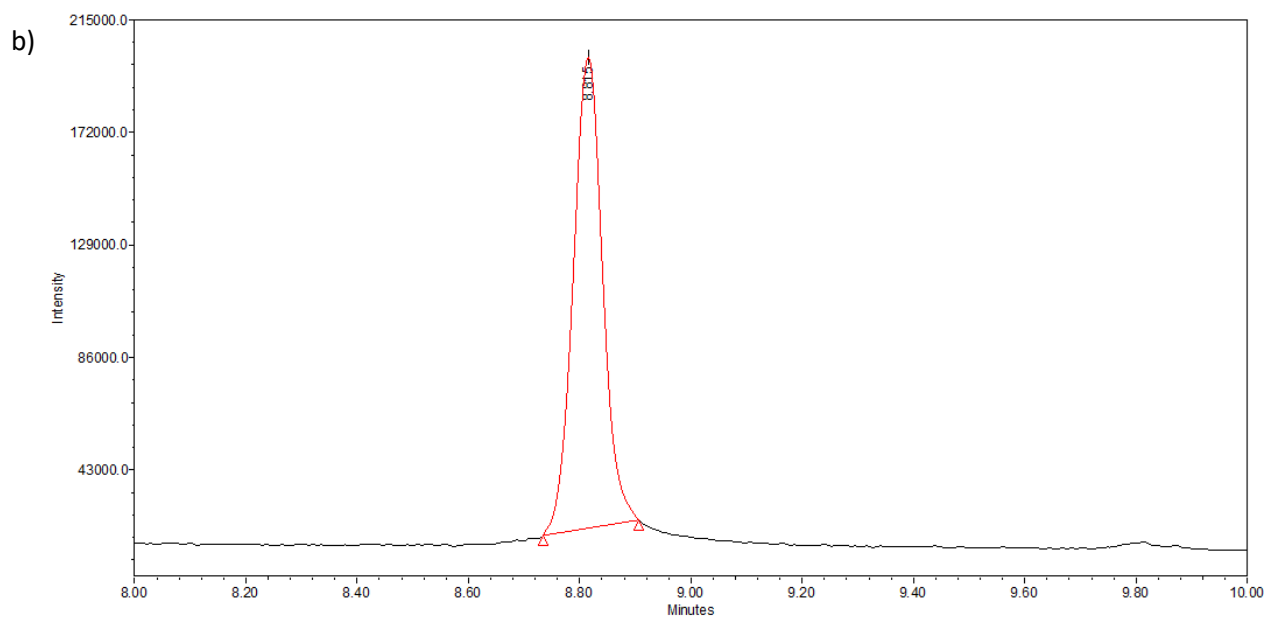
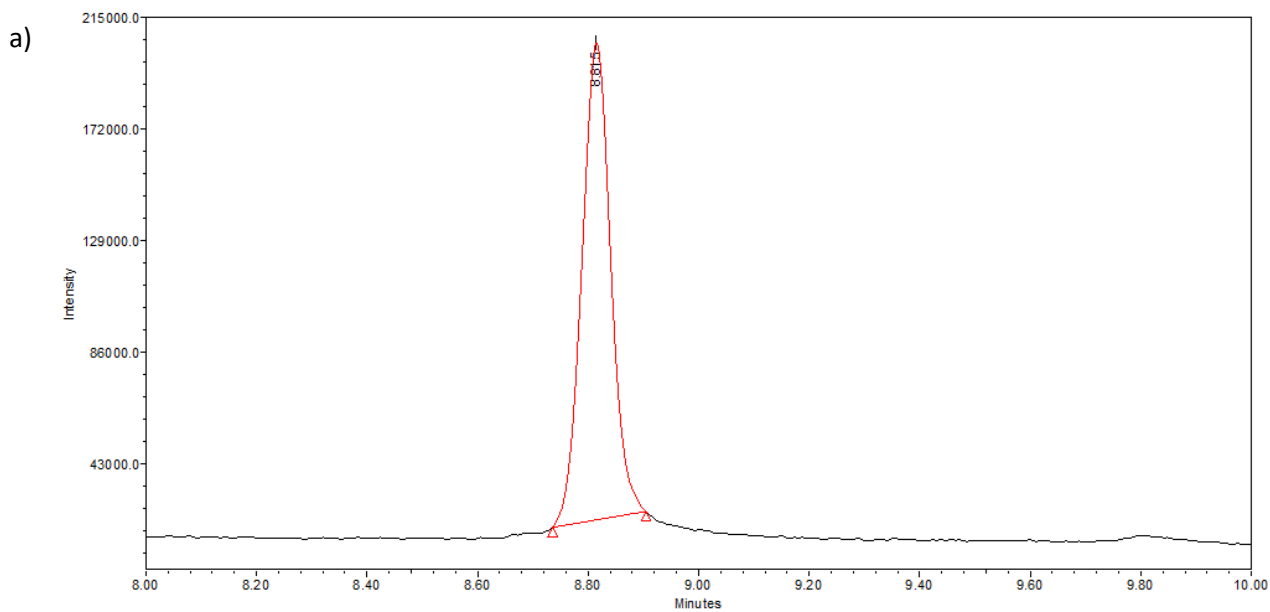
Slika 26.1. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) pri temperaturi kolone 35 °C



Slika 26.2. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) pri temperaturi kolone 45 °C



Slika 26.3. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) pri protoku 0,45 mL/min



Slika 26.4. Prikaz kromatografske krivulje otopine koncentracije 10 ppm (a) i uzorka PMVhTA obogaćenog s otopinom koncentracije 10 ppm (b) pri protoku 0,55 mL/min

Tablica 29. Dobivene vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja i vremena zadržavanja prilikom varijacije parametara metode

Parametar		Uzorak	t_R	A
Početni uvjeti (temp. kolone=40 °C; protok=0,5 mL/min)		STD1 (10ppm)	9,200*	476279,33*
		Obogaćeni PMVhTA	9,200*	474517,67*
Temperatura kolone	35°C	STD1 (10 ppm)	9,227	699465
		Obogaćeni PMVhTA	9,228	688908
	45°C	STD1 (10 ppm)	9,198	665080
		Obogaćeni PMVhTA	9,197	712900
Protok	0,45 mL/min	STD1 (10 ppm)	9,693	511828
		Obogaćeni PMVhTA	9,639	527023
	0,55 mL/min	STD1 (10 ppm)	8,815	666606
		Obogaćeni PMVhTA	8,815	660934

*srednje vrijednosti t_R i A

Na temelju podataka iz tablice 29 uočava se da se promjenom protoka vrijeme zadržavanja značajno pomiče, no izgled kromatografske krivulje se ne mijenja. Pri manjem protoku (0,45 mL/min) kromatografska krivulja izlazi kasnije, a pri većem protoku (0,55 mL/min) izlazi ranije u usporedbi s početnim uvjetima.

Promjenom temperature kolone nisu vidljive značajne promjene vremena zadržavanja te se oblik kromatografske krivulje nije promijenio. Prema tome se može zaključiti da je metoda robusna na male varijacije kromatografskih parametara.

4.3. Sažetak rezultata

U tablici 30 sažeto su prikazani rezultati validacije GC-MS i LC-MS metoda.

Tablica 30. Rezultati validacije GC-MS i LC-MS metoda

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti		Rezultat		Zadovoljava kriterij DA/NE (1./2.)		
			1. GC-MS	2. LC-MS			
Specifičnost	informacija		Slike 17.1.-17.5.	Slike 22.1.-22.5.	DA/DA		
Linearnost							
Koeficijent determinacije	$R^2 \geq 0,990$		0,9994	0,9956	DA/DA		
Odstupanje od linearnosti	80 – 120%						
Iskorištenje	GC-MS	LC-MS	101,4%	115,4%	DA/DA		
	$\gamma=0,00006$ mg/mL	$\gamma=0,00003$ mg/mL					
	$\gamma=0,0002$ mg/mL	$\gamma=0,0001$ mg/mL				99,1%	104,3%
	$\gamma=0,0003$ mg/mL	$\gamma=0,00015$ mg/mL				99,0%	95,3%
	$\gamma=0,0006$ mg/mL	$\gamma=0,0003$ mg/mL	100,0%	99,3%			
Ponovljivost	RSD $\leq 30\%$						
RSD	uzorak PMVhTA obogaćen otopinom koncentracije 10 ppm		0,49%	1,14%	DA/DA		
Točnost	za QL: 70 – 130% ; za veće konc.: 80 – 120%						
Iskorištenje	GC-MS	LC-MS	100,9%	94,2%	DA/DA		
	$\gamma=0,00006$ mg/mL	$\gamma=0,00003$ mg/mL					
	$\gamma=0,0002$ mg/mL	$\gamma=0,0001$ mg/mL				99,6%	99,6%
	$\gamma=0,0003$ mg/mL	$\gamma=0,00015$ mg/mL				96,0%	107,0%
	$\gamma=0,0006$ mg/mL	$\gamma=0,0003$ mg/mL	97,4%	108,6%			
Granica detekcije	S/N ≥ 3						
S/N	1,5 ppm		137	22	DA/DA		
Granica kvantifikacije	S/N ≥ 10						
S/N	3 ppm		183	55	DA/DA		
Stabilnost	relativna razlika $\leq 10,0\%$						
Relativna razlika	standardna otopina (10 ppm)		0,7%	32,6%	DA/NE		
	uzorak PMVhTA obogaćen otopinom koncentracije 10 ppm		1,2%	36,7%			
Robusnost	informacija		Tablica 21.	Tablica 29.	DA/DA		

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu razvijene su i validirane analitičke metode (GC-MS i LC-MS) za određivanje potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u pimavanserin ljekovitoj djelatnoj tvari. Izo-butilbromid (IMP-1) analiziran je na GC-MS-u, a N-hidroksi-2-(4-izobutoksifenil)-acetamid (IMP-2) na LC-MS-u. Na osnovi dobivenih rezultata istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Metoda GC-MS

- Metoda je specifična za određivanje potencijalnog genotoksičnog onečišćenja IMP-1
- Linearnost metode je potvrđena jer je zadovoljen kriterij prihvatljivosti ($R^2 \geq 0,990$)
- Iskorištenje metode zadovoljava postavljeni kriterij (80 – 120%) pri svim ispitivanim koncentracijama. Prema tome može se potvrditi točnost.
- Ponovljivost mjerenja obogaćenog uzorka PMVhTA potvrđena je zadovoljavanjem kriterija prihvatljivosti ($RSD \leq 30\%$).
- Manje promjene kromatografskih parametara kao što su temperatura kolone, *split* omjer i protok pokretne faze ne utječu na određivanje ispitivanog analita, te je time potvrđena robusnost metode.

Metoda LC-MS

- Metoda je specifična za određivanje potencijalnog genotoksičnog onečišćenja IMP-2
- Linearnost metode je potvrđena zadovoljavanjem kriterija prihvatljivosti ($R^2 \geq 0,990$)
- Iskorištenje metode zadovoljava postavljeni kriterij (80 – 120%) pri svim ispitivanim koncentracijama. Stoga je potvrđena točnost metode.
- Ponovljivost mjerenja obogaćenog uzorka PMVhTA potvrđena je zadovoljavanjem kriterija prihvatljivosti ($RSD \leq 30\%$).
- Manje promjene kromatografskih parametara kao što su temperatura kolone i protok ne utječu na određivanje ispitivanog analita, te je time potvrđena robusnost metode.

Iz dobivenih rezultata izvedbenih karakteristika može se zaključiti da su metode prikladne za određivanje potencijalnih genotoksičnih onečišćenja (IMP-1 i IMP-2) u pimavanserin djelatnoj tvari pri koncentracijama većima od 3 ppm.

6. LITERATURA

- [1] M. Paspé Cruz, Pimavanserin (Nuplazid): A Treatment for Hallucinations and Delusions Associated With Parkinson's Disease, *Pharmacy and Therapeutics*, 42(6) (2017) 368–371.
- [2] I. Cok, E. Emerce, Overview of impurities in pharmaceuticals: Toxicological aspects, *Asian Chemistry Letters*, 16(1) (2012) 87-97.
- [3] B. Nigović, M. Sertić, Onečišćenja u lijekovima, *Farmaceutski glasnik*, 68 (2012) 77-88.
- [4] S. K. Savale, Genotoxicity of Drugs: Introduction, Prediction and Evaluation, *Asian Journal of Biomaterial Research*, 4(6) (2018) 1-29.
- [5] <https://quizlet.com/181219814/buz-flash-cards/> (pristup 21. svibnja 2021.)
- [6] T. Klapac, Osnove toksikologije s toksikologijom hrane, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2011, 58-59
- [7] S. Mohamed, U. Sabita, S. Rajendra, D. Raman, Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods, *Global Journal of Pharmaceutical Science*, 1(5) (2017) 555575.
- [8] Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, ICH guideline M7(R1), 2018.
- [9] Guideline on the limits of genotoxic impurities, European Medicines Agency, 2006.
- [10] S. V. Patil, Dr. S. D. Barhate, Hyphenated techniques: An overview, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2) (2015) 214-225.
- [11] Md. R. Md. Us man, S. nil R. Badgujar, T. Y. Shaikh, Hyphenated Techniques of Drug Analysis, *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 6(6) (2017) 263-272.
- [12] <https://www.chemyx.com/support/knowledge-base/applications/basic-principles-hplc-ms-lc-ms/> (pristup 28.svibnja 2021.)
- [13] A. P. Nikalje, G. Ramesh, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences*, 1(1) (2018) 26-34.

- [14] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić: Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina Fluminensis*, 45(3) (2009) 218-232.
- [15] http://cires1.colorado.edu/jimenez/CHEM-5181/Labs/Gas_Chromatography.pdf (pristup 26. svibnja 2021.)
- [16] *Fundamental Guide to Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS)*, Shimadzu Corporation, 2020, str. 6-87.
- [17] <https://www.shimadzu.hr/inlet-liner> (pristup 28. svibnja 2021.)
- [18] G. Guiochon, *Basic Principles of Chromatography*, u H. Gunzler, A. Williams (ur.), *Handbook of Analytical Techniques*, WILEY-VCH, Weinheim, 2001, str. 199-323.
- [19] M. Linscheid, *Mass Spectrometry*, u H. Gunzler, A. Williams (ur.), *Handbook of Analytical Techniques*, WILEY-VCH, Weinheim, 2001, 579-622.
- [20] <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry> (pristup 24. svibnja 2021.)
- [21] <https://microbenotes.com/mass-spectrometry-ms-principle-working-instrumentation-steps-applications/> (29. svibnja 2021.)
- [22] M. Przybylski, *Mass Spectrometry*, u G. Gauglitz, T. Vo-Dinh (ur.), *Handbook of Spectroscopy*, WILEY-VCH, Weinheim, 2014, 327-356.
- [23] <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm> (pristup 29. svibnja 2021.)
- [24] Z. Es'haghi, *Photodiode Array Detection in Clinical Applications; Quantitative Analyte Assay Advantages, Limitations and Disadvantages*, u J.-W. Shi (ur.), *Photodiodes - Communications, Bio-Sensings, Measurements and High-Energy Physics*, IntechOpen, 2011., 165-166.
- [25] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH Topic Q 2 (R1), 1995.
- [26] <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=analiti%C4%8Dka+vaga> (pristup 26. svibnja 2021.)

[27] D. G. Watson, Gas chromatography, *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists* Third edition, Glasgow, 2012, 265-300.