

Prisilna razgradnja emtricitabina i ribavirina

Hofer, Roberta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:111425>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Roberta Hofer

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Roberta Hofer

PRISILNA RAZGRADNJA EMTRICITABINA I RIBAVIRINA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Šime Ukić
doc. dr. sc. Matija Cvetnić
izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, lipanj 2023.

*Ovaj je rad izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,
na Zavodu za analitičku kemiju.*

Prvenstveno, zahvaljujem se svojem mentoru, prof. dr. sc. Šimi Ukiću, na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada pod njegovim mentorstvom. Zahvaljujem se na strpljenju, pomoći, izdvojenom vremenu, razumijevanju te danim savjetima i smjernicama. P.S. Nisam potpuna inkarnacija Viki, samo nekih 70%.

Nadalje, zahvaljujem se asistentici Viktoriji Martinjak, mag. ing. cheming., koja me uzela pod svoje okrilje i bila od velike pomoći tijekom godine. Viki hvala ti na strpljenju, korisnim savjetima, pruženoj pomoći i prenesenom znanju. Hvala ti što si dijelila slatko sa mnom, nadam se da ti je pomoglo da digneš vreću zemlje. :) P.S. Kako se zove breskva koja trči?

Zahvaljujem se i mom Valentinu, koji mi je bio velika podrška tijekom cijelog studija. Hvala ti na bezuvjetnoj ljubavi i motivaciji. Budi zvjezdica!

Naposljetku, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju, pomoći i razumijevanju. A sad fešta! :)

Sažetak

Razvoj brojnih farmaceutika i njihova primjena u medicini imaju značajan utjecaj na poboljšanje kvalitete ljudskog života. Nažalost, tijekom proizvodnje ili uslijed korištenja, dio farmaceutika dospijeva u okoliš zbog čega je bitno poznavati ponašanje farmaceutika u različitim ekosustavima. Pokazalo se da farmaceutici, njihovi metaboliti i razgradni (nus)produkti, ukoliko su prisutni u većim količinama, imaju dugoročne negativne učinke na ekosustave. Ponekad su metaboliti i razgradni produkti toksičniji od inicijalne molekule farmaceutika zbog čega je također potrebno poznavati puteve njihove razgradnje.

Cilj ovog rada je bio provesti testove prisilne razgradnje emtricitabina i ribavirina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti te tako dobiti predodžbu što se zbiva s navedenim spojevima u okolišu. Emtricitabin i ribavirin podvrgnuti su neutralnoj, lužnatoj i kiseloj hidrolizi, fotolizi, prisilnoj razgradnji s oksidansom te termičkoj razgradnji. Za oba farmaceutika su razvijene i validirane HPLC metode. Za razvijene metode utvrđena je linearnost uz koeficijent determinacije veći od 0,99 te analitički povrat u granicama 70-130%. Preciznosti metoda su veoma dobre uz relativna standardna odstupanja manja od 2%.

Ključne riječi: farmaceutici, okoliš, prisilna razgradnja, kromatografija

Abstract

The development of various pharmaceuticals and their active use in medicine greatly improve the quality of people's lives. However, the intensive use of pharmaceuticals also has a bad side. Unfortunately, the production or use of pharmaceuticals releases certain amounts of these chemicals into the environment, so it is important to know the behavior of pharmaceuticals in different ecosystems. Pharmaceuticals, their metabolites, and degradation (by) products have been shown to have long-term adverse effects on ecosystems. Sometimes the metabolites and degradation products themselves are more toxic than the original pharmaceutical, so it is necessary to know the degradation pathways.

The aim of this work was to conduct the forced degradation study on emtricitabine and ribavirin to see what is potentially happening with the above compounds in the environment. Emtricitabine and ribavirin undergo neutral hydrolysis, alkaline hydrolysis, acid hydrolysis, photolysis, forced degradation with an oxidizing agent, and thermal degradation. The LC methods were developed and validated for each pharmaceutical. For both methods developed, linearity was confirmed with a coefficient of determination greater than 0.99, and analytical recoveries were within 70-130%. The precisions of the methods were very good with relative standard deviations of less than 2%.

Key words: pharmaceuticals, environment, forced degradation, chromatography

SADRŽAJ

1.	Uvod.....	1
2.	Teorijski dio	2
2.1	Antivirotici	2
2.1.1	Emtricitabin.....	2
2.1.2	Ribavirin.....	3
2.2	Prisilna razgradnja.....	4
2.3	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	5
2.4	Validacija HPLC metode	7
2.4.1	Linearnost.....	7
2.4.2	Točnost.....	7
2.4.3	Preciznost	8
2.4.4	Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	8
3.	Eksperimentalni dio	9
3.1	Kemikalije i reagensi.....	9
3.2	Popis instrumenata i opreme	9
3.3	Eksperimentalni dizajn.....	10
3.3.1	Validacija LC metoda za analizu emtricitabina i ribavirina.....	10
3.3.2	Prisilna razgradnja.....	10
4.	Rezultati i rasprava.....	12
4.1	Validacija LC metoda	12
4.1.1	Linearnost.....	12
4.1.2	Točnost.....	16
4.1.3	Preciznost	18
4.1.4	Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	20
4.2	Prisilna razgradnja.....	20
4.2.1	Lužnata hidroliza.....	20

4.2.2	Kisela hidroliza	21
4.2.3	Oksidacija vodikovim peroksidom	21
4.2.4	Termička razgradnja.....	24
4.2.5	Fotolitička razgradnja.....	24
4.2.6	Usporedba svih primijenjenih postupaka razgradnje	24
5.	Zaključak.....	26
6.	Literatura	27
	Životopis.....	31

1. Uvod

Farmaceutici predstavljaju veliku skupinu lijekova namijenjenih primjeni u medicini. Uključuju tisuće jedinstvenih i raznolikih kemijskih spojeva koji posjeduju različita fizikalna i kemijska svojstva poput bioaktivnosti, optičke aktivnosti, topljivosti, bioraspoloživosti, toksičnosti i dr. [1,2] Upotrebom farmaceutika povećao se ljudski životni vijek te se poboljšala kvaliteta života. [3] Međutim, sve je veća i prisutnost farmaceutika u okolišu zbog čega se postavlja pitanje kako oni djeluju na okoliš. [1,4]

Najviše farmaceutika u okoliš ulazi njihovom primjenom. U tijelu se dio aktivne tvari iskoristi i metabolizira, a dio ostaje neiskorišten te skupa s metabolitima dospijeva u otpadne vode. Uz to, ulaz farmaceutika u okoliš predstavljaju i nesvjesno zbrinuti neiskorišteni lijekovi. Ostaci farmaceutika pronađeni su površinskim i podzemnim vodama, tlu, sedimentu i u životinjskim tkivima. [4] Farmaceutici su u okolišu prisutni u niskim koncentracijama, ali kontinuirani unos može rezultirati njihovom akumulacijom što u konačnici može imati dugoročne negativne učinke na vodene i kopnene organizme. Također, veliku zabrinutost predstavljaju i njihovi metaboliti te razgradni produkti koji mogu posjedovati znatno različita fizikalno-kemijska svojstva te biti toksičniji od početne molekule. [1]

Međunarodna konferencija za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove (eng. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*; ICH) ima za cilj postići veću usklađenost na svjetskoj razini za razvoj i odobravanje sigurnih, učinkovitih i visokokvalitetnih lijekova na resursno najučinkovitiji način. Stoga je ICH oformila skup sigurnih smjernica za otkrivanje potencijalnih rizika poput kancerogenosti, genotoksičnosti i reprotoksičnosti. [5]

2. Teorijski dio

2.1 Antiviroci

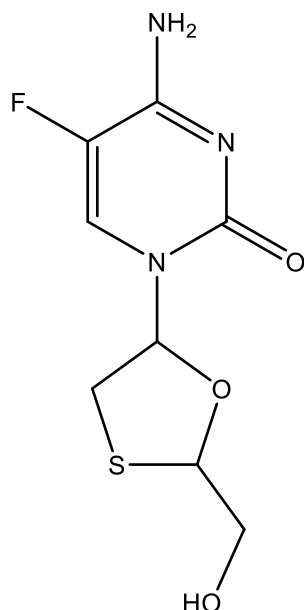
Farmaceutici se koriste za prevenciju i liječenje bolesti kod ljudi i životinja. Kontinuirano se unose u okoliš u sve većim količinama: putem izlučevina, nepropisnim odlaganjem te upotrebom u akvakulturi kao dodataka prehrani. [6] Zbog svog kontinuiranog unosa i mogućih negativnih učinaka farmaceutici se smatraju tzv. „novim onečišćivalima“. [1] Pod pojmom „nova onečišćivala“ misli se na supstance prirodnog ili sintetskog podrijetla čiji se utjecaji na okoliš i zdravlje tek trebaju utvrditi. [7]

Farmaceutici se mogu klasificirati prema mehanizmu djelovanja, kemijskoj strukturi i fiziološkom učinku. [8] Antiviroci ili antivirusni lijekovi su farmaceutici koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih virusima. William Prusoff sintetizirao je prvi antivirus, 5-jod-2'-deoksiuridin (IDU), koji je dobio dozvolu za kliničku upotrebu. [9] Djelovanje antivirusa ovisi o vrsti virusa. Općenito, oni sprječavaju replikaciju virusa na način da inhibiraju različite enzime: proteaze, reverzne transkriptaze, integraze, neuraminidaze itd. [10]

2.1.1 Emtricitabin

Emtricitabin, obično nazivan kraticom FTC, je antivirus molekulske formule $C_8H_{10}FN_3O_3S$ ($M=247,25$ g/mol). Struktura emtricitabina prikazana je na slici 1: on je C5'-fluorirani analog lamivudina. Emtricitabin je nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze. Pri sobnoj temperaturi (25 °C) emtricitabin je praškasta krutina bijele boje. Topljivost emtricitabina u vodi je 112 mg/mL pri 25 °C. [11-13]

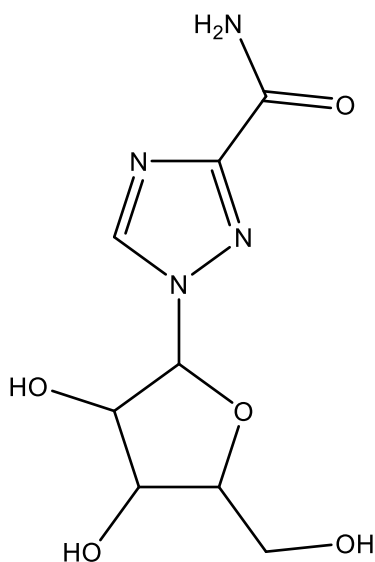
Emtricitabin se na tržištu može naći pod imenom Emtriva, a često se može naći u kombinaciji s HIV lijekovima kao što su Truvada (emtricitabin/tenofovir) i Atripla (emtricitabin/tenofovir/efavirenz). [14,15] L-enantiomer emtricitabina pokazao se stotinu puta aktivniji protiv virusa HIV-a nego njegov D-enantiomer. [16] Također, emtricitabin bi se potencijalno mogao koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih virusom hepatitisa B, međutim Američka agencija za hranu i lijekove ga još nije odobrila za tu upotrebu. [14] Isto tako, pandemija uzrokovana SARS-CoV-2 virusom potakla je znanstvenike na daljnja istraživanja koja su pokazala da emtricitabin zajedno u kombinaciji s tenofovirom ometa normalno djelovanje ovisne RNA polimeraze (RdRp) zbog čega je onemogućena transkripcija virusa. [17,18] Upravo ga taj mehanizam čini pogodnim za liječenje COVID-a.



Slika 1. Strukturna formula emtricitabina

2.1.2 Ribavirin

Ribavirin (RIB) je antivirusni molekulske formule $C_8H_{12}N_4O_5$ ($M=244,20$ g/mol). Struktura ribavirina prikazana je na slici 2.



Slika 2. Strukturna formula ribavirina

Ribavirin je pri sobnoj temperaturi (25 °C) praškasta krutina bijele boje. Postoji u dva polimorfna oblika koja se razlikuju po temperaturi taljenja: A oblik ima talište 166-168 °C, dok B oblik ima talište 174-176 °C. Topljivost ribavirina u vodi je 142 mg/mL 25 °C. [19,20]

Sintetiziran 1972. kao analog gvanozina, ribavirin pokazuje široki spektar djelovanja protiv nekoliko DNA i RNA virusa. [21] Ribavirin se u kombinaciji s interferonom α smatra „zlatnim standardom“ u liječenju hepatitisa C. [22] Za sada su pretpostavljena četiri mehanizma djelovanja ribavirina, pri čemu je jedan od njih inhibicija ovisne RNA polimeraze. [21] Upravo se taj mehanizam djelovanja istražuje u liječenju infekcije SARS-CoV-2 virusom. [23]

2.2 Prisilna razgradnja

Prisilna razgradnja (eng. *forced degradation*) farmaceutika podrazumijeva izlaganje farmaceutika različitim stresnim uvjetima. [24] Prisilna razgradnja opisana je različitim međunarodnim smjernicama. ICH je objavila skup smjernica koje su prihvaćene od strane Europskih, Američkih i Japanskih regulatornih tijela. [25] Prisilna razgradnja pomaže u razvijanju i validiranju metoda vezanih uz stabilnost farmaceutika te u identifikaciji strukture i određivanju toksičnosti razgradnih produkata. [26]

Stabilnost farmaceutika i/ili njegove aktivne tvari vitalan je parametar koji utječe na njegovu kvalitetu i sigurnost. Promjene u stabilnosti mogu ugroziti sigurnost pacijenata stvaranjem toksičnih degradacijskih produkata i smanjenjem koncentracije aktivne tvari nužne za pravilno djelovanje farmaceutika. Svrha prisilne razgradnje je pokazati kako kvaliteta farmaceutika i/ili aktivne supstance varira s vremenom pod utjecajem različitih stresnih uvjeta, kao što su povišena temperatura, vlaga i svjetlost, te utvrditi rok trajanja i preporučene uvjete skladištenja. Priroda testiranja ovisi o vrsti farmaceutika te o aktivnoj supstanci. [27]

ICH smjernica Q1A daje indikacije za ispitivanje parametara koji mogu biti podložni promjenama tijekom dugog skladištenja i koji vjerojatno utječu na kvalitetu, sigurnost i učinkovitost, a moraju se provesti stabilnim validiranim metodama. Prisilna razgradnja provodi se pri povišenim temperaturama, pri čemu se temperature moraju razlikovati za 10 °C, u širokom rasponu pH vrijednosti (kisela, lužnata i neutralna razgradnja), te se provodi pod fotolitičkim i oksidativnim uvjetima. [25,28]

Hidrolitička razgradnja u širokom rasponu pH vrijednosti jedna je od najčešće primjenjivanih kemijskih reakcija prisilne razgradnje. Farmaceutik se izlaže kiselim i alkalnim uvjetima pri čemu vrsta i koncentracija kiseline, odnosno baze, ovisi o njegovoj stabilnosti. Kao prikladni reagensi za kiselu hidrolizu najviše se koriste HCl i H₂SO₄ u koncentracijama od 0,1 M do 1 M, dok se kao prikladni reagensi za lužnatu hidrolizu najviše

koriste NaOH i KOH u istom rasponu koncentracija. Preporuka je da se hidrolitička razgradnja ne provodi duže od tjedan dana.

Oksidativna razgradnja najčešće se provodi s H₂O₂. Koncentracija korištenog H₂O₂ također ovisi o stabilnosti farmaceutika, a varira 3-30%. Oksidativna razgradnja trebala bi se provoditi tjedan dana pri sobnoj temperaturi ili kraće ukoliko je postignut raspad promatranog spoja od 20%.

Termička razgradnja trebala bi se provoditi pri temperaturama višim od onih koje propisuje ICH Q1A smjernica. Provodi se maksimalno 7 dana. [27]

Kao nužan dio prisilne razgradnje, provodi se i fotolitička razgradnja kako bi se ispitala stabilnost farmaceutika izlaganjem svjetlu. Prilikom fotolitičke razgradnje potrebno je održavati odgovarajuću temperaturu kako ne bi došlo do lokaliziranih promjena temperature ili raditi u tamnom načinu rada. Kao izvor svjetlosti može se koristiti bilo koji izvor svjetla koji proizvodi zračenje slično D65/ID65 – fluorescentne žarulje koje kombiniraju vidljivo i ultraljubičasto zračenje, ksenonske žarulje ili metal halogene žarulje. Ukoliko se fotoliza provodi u tamnom načinu rada, farmaceutik treba biti izložen i hladnom, bijelom fluorescentnom svjetlu i žarulji koja emitira blisko ultraljubičasto zračenje. [27,2926] Iako trenutno ne postoji smjernica o tome kolika bi se razgradnja trebala postići, prema industrijskoj praksi potrebno je postići 5-30% razgradnje promatranog spoja. [26,27]

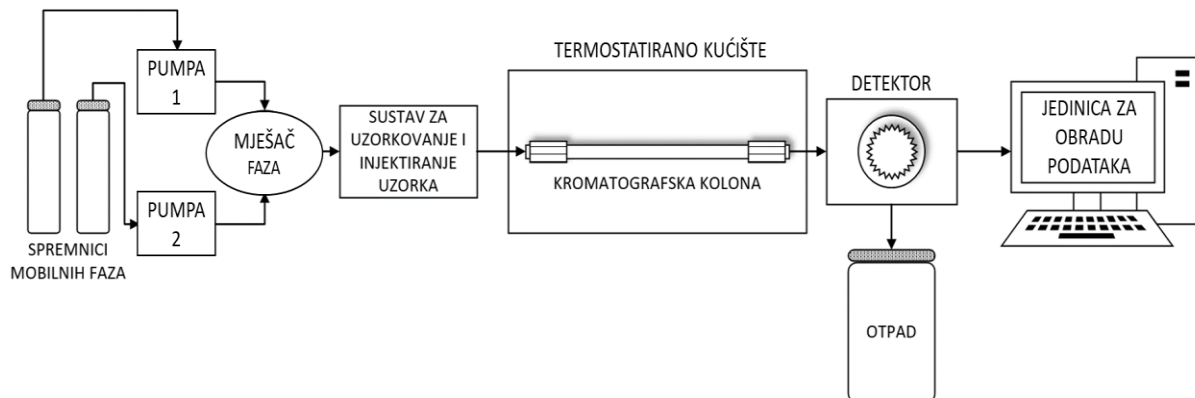
Smatra se da je idealni postotak razgradnje 10% od početne vrijednosti, kako bi se mogli promatrati razgradni produkti. [24,27] Ukoliko je postotak razgradnje veći od 30% potrebno je primijeniti blaže uvjete, npr. smanjiti koncentraciju reagensa, sniziti temperaturu itd.

2.3 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se tvari razdvajaju zbog različitih afiniteta prema dvama fazama: nepokretnoj (stacionarnoj), i pokretnoj (mobilnoj). Kao rezultat dobiva se kromatogram, tj. brojnost čestica analita na izlazu iz kromatografske kolone u volumenu eluata ili vremenu elucije. Izgled kromatograma ovisi o više čimbenika: pripremi uzoraka, temperaturi, korištenoj koloni, vrsti i protoku mobilnih faza itd. [30,31]

Jedna od najčešće primjenjivanih kromatografskih metoda je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Ona se

koristi za identifikaciju, kvantifikaciju, pročišćavanje i separaciju tvari. Često se koristi za praćenje tijekom prisilne razgradnje jer je njome moguće odvojiti razgradne produkte od početnog farmaceutika. [26]



Slika 3. Shematski prikaz HPLC sustava

Glavne komponente HPLC sustava shematski su prikazane na slici 3. Mobilne faze transportiraju se pomoću pumpi do mješalice pri čemu omjer mobilnih faza ovisi o primijenjenoj metodi i uzorku koji se analizira. Ukoliko se omjer mobilnih faza ne mijenja s vremenom onda se radi o izokratnoj eluciji, a ako se mijenja s vremenom je riječ o gradijentnoj eluciji. Mobilna faza dolazi do tzv. injeckijske petlje gdje preuzima injeckirani uzorak i nosi ga dalje kroz sustav do kromatografske kolone. Kromatografska kolona ispunjena je stacionarnom fazom koja može biti zrnata ili monolitna. [32] Danas postoji niz različitih kolona koje se razlikuju po duljini, promjeru te vrsti i veličini čestica punila. Odabir kolone ovisi o vrsti tvari koju je potrebno separirati te o njenim svojstvima. Ako je kromatografska kolona polarnija od pokretne faze tada govorimo kromatografiji normalnih faza, a ako je nepokretna faza nepolarna onda se radi o kromatografiji obrnutih faza. Tijekom prolaska uzorka kroz kolonu dolazi do interakcija između kolone i željenog analita što rezultira razdvajanjem analita od matrice uzorka. Dakle, tvari koje provode više vremena u pokretnoj fazi eluiraju prije, dok one koje se preferiraju nepokretnu fazu eluiraju kasnije. Zbog različitih puteva kojima komponente prolaze kroz kolonu dolazi do raspodjele čestica analita, odnosno do nastanka kromatografskih pikova koji daju kvantitativnu i/ili kvalitativnu informaciju o analitu. Dolaskom analita na detektor stvara se signal proporcionalan koncentraciji analita. Odabir detektora također ovisi o tvari koja se analizira. UV/VIS je najčešće korišten detektor, ali također se koriste i fluorescentni te konduktometrijski detektori, a ponekad se HPLC spreže sa spektrometrom masa. [32-36]

2.4 Validacija HPLC metode

Validacija je postupak kojim se potvrđuje i dokumentira prikladnost analitičkog sustava za određenu namjenu. Pod pojmom validacija često se misli na validaciju metode. Rezultati validacije koriste se za ocjenjivanje kvalitete, pouzdanosti i dosljednosti analitičkih rezultata. Validacija se provodi u tri koraka. Prvi korak je karakterizacija ispitnog postupka, odnosno potrebno je definirati i opisati koji se specifični zahtjevi postavljaju pred metodu, a zatim i karakterizirati metodu ispitivanjem njezinih glavnih izvedbenih karakteristika (npr. linearnost, točnost, preciznost, granica kvantifikacije i detekcije, selektivnost, osjetljivost). Drugi korak je usporedba sa zahtjevima korisnika. Ugovor koji se postiže između naručitelja i laboratorija koji provodi validaciju definira zahtjeve koje metoda mora zadovoljiti da bi bila prikladna za namjeravanu upotrebu. Kada je metoda karakterizirana, tako da su određene njene izvedbene karakteristike, i kada su rezultati uspoređeni sa zahtjevima korisnika, na temelju rezultata validacije piše se izjava o prikladnost/neprikladnosti metode za namjeravanu upotrebu. Validacija se provodi za nenormirane metode, za metode razvijene u vlastitom laboratoriju, prilikom prenamjene ili modifikacije postojeće metode te kada se normirana metoda želi primijeniti izvan normiranog područja. [37-38]

2.4.1 Linearnost

Linearnost je svojstvo metode da unutar određenog koncentracijskog područja daje rezultate direktno proporcionalne koncentraciji analita u ispitnom uzorku. Određuje se postupkom umjeravanja ili kalibracije, odnosno mjerenjem odziva standardnih otopina različitih koncentracija analita te analizom ovisnosti odziva o koncentraciji. Svrha kalibracije je smanjiti ili ukloniti pogrešku mjernog sustava. Linearnost metode se najčešće potvrđuje preko koeficijenta determinacije R^2 koji mora biti $\geq 0,9900$.

2.4.2 Točnost

Točnost izražava slaganje srednje vrijednosti niza ponovljenih mjerenja i prave, odnosno referentne vrijednosti. Razlike u vrijednostima posljedica su sustavne pogreške. Točnost se često iskazuje kao analitički povrat koji se računa prema jednadžbi (1).

$$\text{Analitički povrat} = \frac{\text{izmjerena vrijednost}}{\text{prava vrijednost}} \cdot 100\% \quad (1)$$

2.4.3 Preciznost

Preciznost se definira kao stupanj podudaranja više nezavisnih rezultata izvedenih iz istog homogenog uzorka. Preciznost se izražava kao standardno odstupanje, relativno standardno odstupanje (*RSD*) ili varijanca. Također, preciznost se iskazuje kao ponovljivost, međupreciznost ili obnovljivost. Ponovljivost je preciznost pri istim uvjetima (npr. isti analitičar, ista metoda, isti instrument, vrlo kratko vremensko razdoblje), a međupreciznost je preciznost pri različitim uvjetima (npr. različiti analitičar, instrument, metoda). Obnovljivost se, s druge strane, definira kao mjerenje izvedeno na identičnom uzorku u različitim laboratorijima zbog čega se često koristi kod međulaboratorijskih usporedbi.

U ovom radu preciznost će biti iskazana preko *RSD* vrijednosti koja se računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdje je *s* standardno odstupanje određenog broja ponovljenih mjerenja, a \bar{x} njihova srednja vrijednost.

2.4.4 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Kako bi se izbjeglo dokazivanje nepostojećeg ili nedokazivanje postojećeg analita vrlo je bitno definirati granicu detekcije (*GD*) i granicu kvantifikacije (*GK*) primijenjene analitičke metode. Granica detekcije definira se kao najmanja količina analita koju je moguće razlučiti od pozadinskog signala, dok se granica kvantifikacije definira kao najmanja koncentracija analita koja se može odrediti uz odgovarajuću točnost i preciznost. *GD* i *GK* računski se određuju primjenom jednadžbi (3) i (4).

$$GD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad (3)$$

$$GK = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \quad (4)$$

Pri tome je *a* nagib kalibracijskog pravca, a σ standardna devijacija slijepe probe, odsječka kalibracijskog pravca ili uzorka veoma niske koncentracije analita. [39-44]

3. Eksperimentalni dio

3.1 Kemikalije i reagensi

Kemikalije i reagensi upotrebljavani za prisilnu razgradnju te validaciju metoda za određivanje emtricitabina i ribavirina navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija i reagensa

Kemikalija	Formula	Čistoća	Proizvođač	Država	Upotreba
Emtricitabin	$C_8H_{10}FN_3O_3S$	krutina, 99,93%	Sigma-Aldrich	US	CRM
Kalij dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	krutina, $\geq 99,5\%$	Alkaloid AD Skopje	MK	mobilna faza
Klorovodična kiselina	HCl	otopina, 37%	VWR	US	reagens
Metanol	CH_3OH	otopina, HPLC stupanj čistoće	J.T. Baker	US	mobilna faza
Natrijev hidroksid	NaOH	krutina, 99,3%	Lach-ner	CZ	reagens
Ribavirin	$C_8H_{12}N_4O_5$	krutina, 99,5%	Sigma-Aldrich	US	CRM
Vodikov peroksid	H_2O_2	otopina, 30%	Gram-mol d.o.o.	HR	reagens

3.2 Popis instrumenata i opreme

Tijekom izrade ovog diplomskog rada korištena je sljedeća analitička oprema:

- tehnička vaga Mettler Toledo, model PB1502-L, US,
- analitička vaga Mettler Toledo, model XA105DU, US,
- pH metar Mettler Toledo, model S20 SevenEasy, US,
- pH elektroda Mettler Toledo, model InLab Expert Pro, US,
- sustav za proizvodnju Milli-Q (ultra-čiste) vode, Reagent Grade Water System, Millipore Co., US,
- HPLC sustav LC-20ADXR sa SPD-20AV UV detektorom, Shimadzu, JP,
- kromatografska kolona XBridge C18 3,5 μ m, 4,6 \times 150 mm, Waters, US,
- magnetska miješalica Witeg Labortechnik GmbH, model MSH-20A, DE,
- Suntest uređaj Atlas Material Testing Technology GmbH, model CPS+, US,
- ultrazvučna kupelj Rocker, model Soner 210, TW i
- termostat Bodalec & Havočić, model EBT, HR.

3.3 Eksperimentalni dizajn

3.3.1 Validacija LC metoda za analizu emtricitabina i ribavirina

Stock otopine emtricitabina i ribavirina pripremljene su otapanjem 31,03 mg standarda emtricitabina, odnosno 26,03 mg standarda ribavirina u 50 mL ultra-čiste vode. Iz *stock* otopina pripremljena su razrjeđenja za kalibraciju u rasponu koncentracija od 0,0010 do 0,1250 mM. Navedene otopine pripremane su u triplikatu, a svaka od pripremljenih otopina analizirana je tri puta pri uvjetima navedenim u tablici 2. Za analizu oba spoja razvijene su izokratne HPLC metode pri čemu je korištena C18 kolona.

Tablica 2. Kromatografski uvjeti metoda za analizu emtricitabina i ribavirina

	Emtricitabin	Ribavirin
Mobilna faza	5% CH ₃ OH i 95% 20 mM KH ₂ PO ₄	100% 20 mM KH ₂ PO ₄
Protok / mL min ⁻¹	1	1
Volumen injektiranja / μL	30	30
Temperatura pećnice / °C	30	30
Valna duljina detekcije / nm	280	207
Trajanje metode / min	15	6

3.3.2 Prisilna razgradnja

Nakon validacije LC metoda za analizu emtricitabina i ribavirina provedena je prisilna razgradnja. Prisilne razgradnje emtricitabina i ribavirina provedene su: lužnatom, kiselom i „neutralnom“ hidrolizom, oksidacijom vodikovim peroksidom te fotolitičkom i termičkom razgradnjom. Pod pojmom „neutralna“ hidroliza misli se na hidrolizu spoja u ultra-čistoj vodi pri čemu nije podešavana pH vrijednost. „Neutralna“ hidroliza pratila se 7 dana na temperaturi od 25 °C te je takva otopina korištena kao slijepa proba, za usporedbu s drugim razgradnjama. Sve razgradnje provedene su na otopini farmaceutika početnih koncentracija 0,1 mM.

3.3.2.1 Lužnata hidroliza

Lužnata hidroliza emtricitabina i ribavirina provodila se 1 M otopinom NaOH koja je pripravljena otapanjem 10 g krutog NaOH u 250 mL ultra-čiste vode.

Lužnata hidroliza emtricitabina provodila se u odmjernoj tikvici od 50 mL pri čemu je dodano 15 mL 1 M otopine NaOH i 35 mL 0,1 mM otopine emtricitabina. Razgradnja se pratila 4 h, a uzorci su uzimani svakih 30 min. Lužnata hidroliza ribavirina provodila se pri istim uvjetima, međutim praćenje razgradnje trajalo je 2 h pri čemu su uzorci uzimani svakih 10 min zbog veće brzine razgradnje spoja.

3.3.2.2 Kisela hidroliza

Kisela hidroliza emtricitabina i ribavirina provodila se 1 M otopinom HCl koja je pripravljena razrjeđivanjem 37%-tne otopine HCl. Razgradnja se provodila u odmjernoj tikvici od 50 mL pri čemu je dodano 25 mL 1 M otopine HCl i 25 mL 0,1 mM otopine emtricitabina, odnosno ribavirina. Razgradnja se u oba slučaja pratila 24 h. Uzorci su tijekom prvog sata uzimani svakih 30 min, nakon toga svakih sat vremena do petog sata te se u konačnici uzeo 24-satni uzorak.

3.3.2.3 Oksidacija vodikovim peroksidom

Prisilna razgradnja emtricitabina i ribavirina provodila se 3 i 30%-tnom otopinom H₂O₂ u odmjernoj tikvici od 50 mL pri čemu je u tikvicu dodano 5 mL H₂O₂ i 45 mL 0,1 mM otopine emtricitabina. Razgradnja 3%-tnom otopinom H₂O₂ pratila se 3 h, a 30%-tnom 2 h. Kako bi se spriječila razgradnja uzrokovana svjetlosnim zračenjem, sve su tikvice bile omotane aluminijskom folijom.

3.3.2.4 Termička razgradnja

Termička razgradnja emtricitabina i ribavirina provodila se na 50 mL 0,1 mM otopine oba farmaceutika tijekom 7 dana, u tamnim bočicama u termostatu na 30 i 40 °C.

3.3.2.5 Fotolitička razgradnja

Fotolitička razgradnja emtricitabina i ribavirina provodila se na Suntest uređaju gdje su uzorci izloženi svjetlosti valnih duljina 300-800 nm. Uzorci su osvjetljavani svjetlošću jačine 600 W/m² na 25 °C, a razgradnja je praćena kroz 6 h. Uz osvjetljavane uzorke, radile su se i tamne slijepe probe omotane aluminijskom folijom koje su bile smještene u uređaju pokraj osvjetljavanih uzoraka.

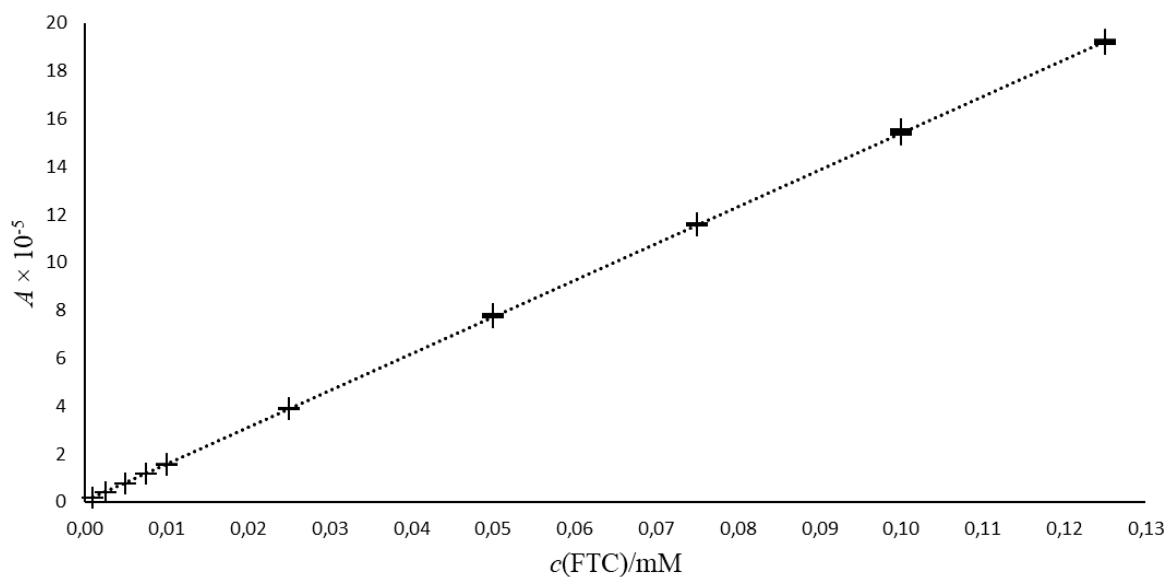
4. Rezultati i rasprava

4.1 Validacija LC metoda

Za prisilnu razgradnju emtricitabina i ribavirina razvijena je metoda, u laboratoriju Analitičkog zavoda Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, kojom je ispitana linearnost, točnost, preciznost te granice detekcije i kvantifikacije. Granice detekcije i granice kvantifikacije određene su računski primjenom jednadžbi (3) i (4) uz korištenje standardne devijacije uzorka niske koncentracije analita.

4.1.1 Linearnost

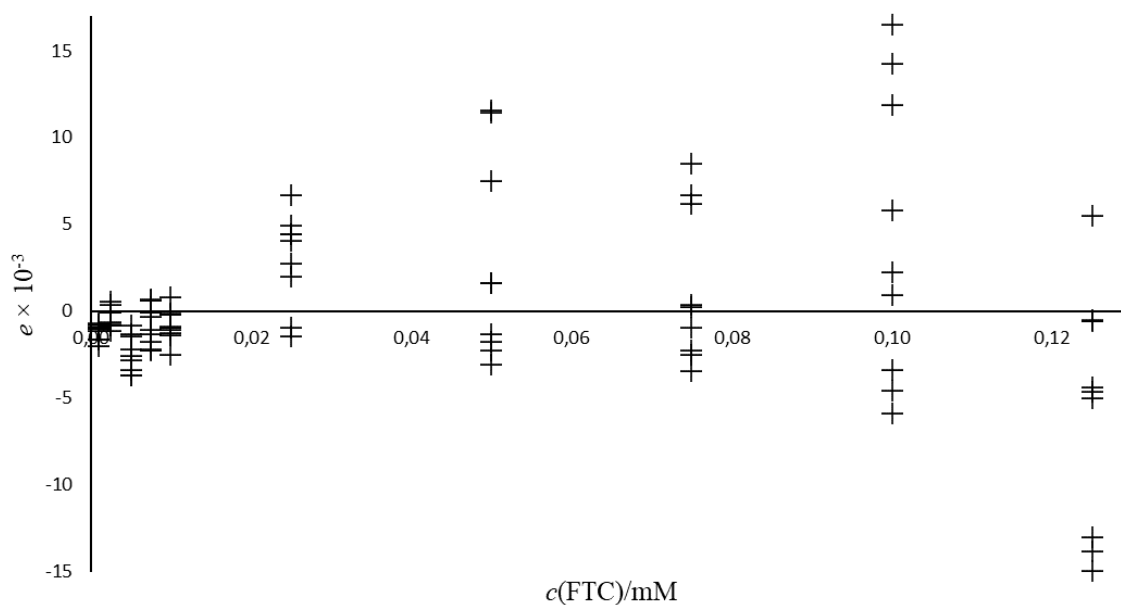
Linearnost je određena postupkom kalibracije, odnosno preko kalibracijskog pravca. Kalibracijski pravac pokriva koncentracijsko područje od 0,0010 do 0,1250 mM.



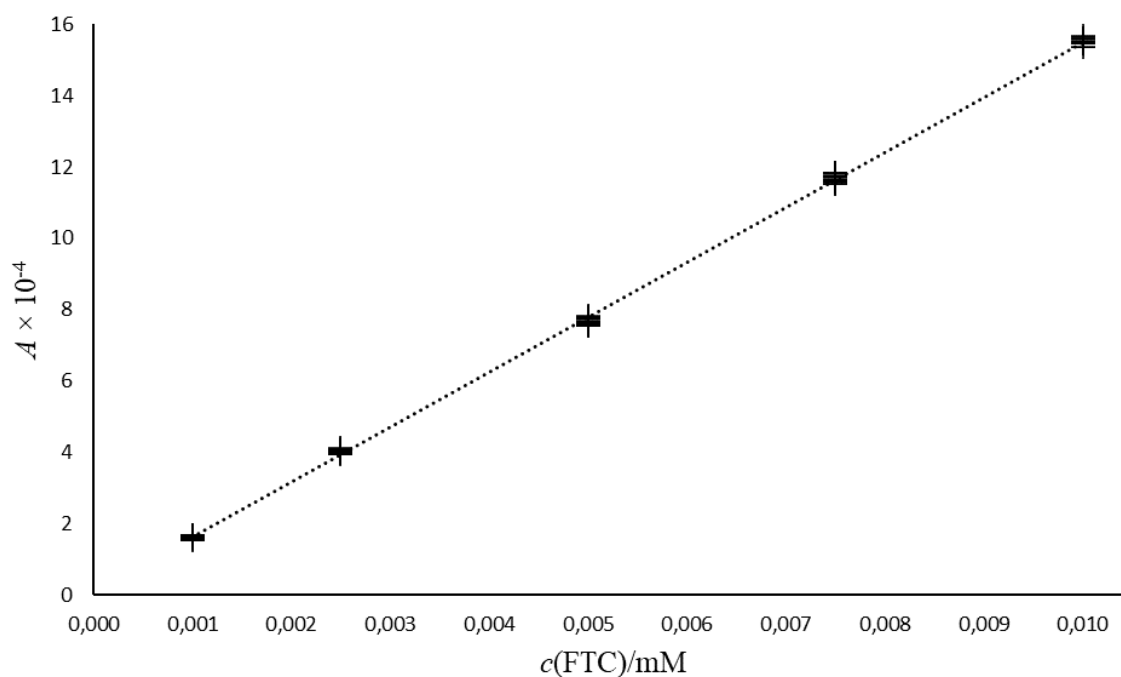
Slika 4. Kalibracijski pravac FTC-a jednadžbe $y = 1,5 \cdot 10^7 x + 2,1 \cdot 10^3$ i R^2 vrijednosti od 0,9999 za područje koncentracija od 0,0010 mM do 0,1250 mM

Na slici 4 prikazan je kalibracijski pravac dobiven za FTC. Uz jednadžbu kalibracijskog pravca prikazan je i koeficijent determinacije R^2 čija vrijednost mora biti veća od 0,9900. U ovom slučaju koeficijent determinacije iznosi 0,9999 što znači da je uvjet zadovoljen. Međutim, kako bi se linearnost u potpunosti potvrdila, napravljen je i graf rezidualnih odstupanja (slika 5). Na njemu se jasno vidi veće rasipanje podataka pri većim koncentracijama, odnosno da su veća odstupanja zbog čega se pristupilo izradi dvaju kalibracijskih pravaca: za manje i za veće koncentracijsko područje (slike 6 i 7). Oba pravca

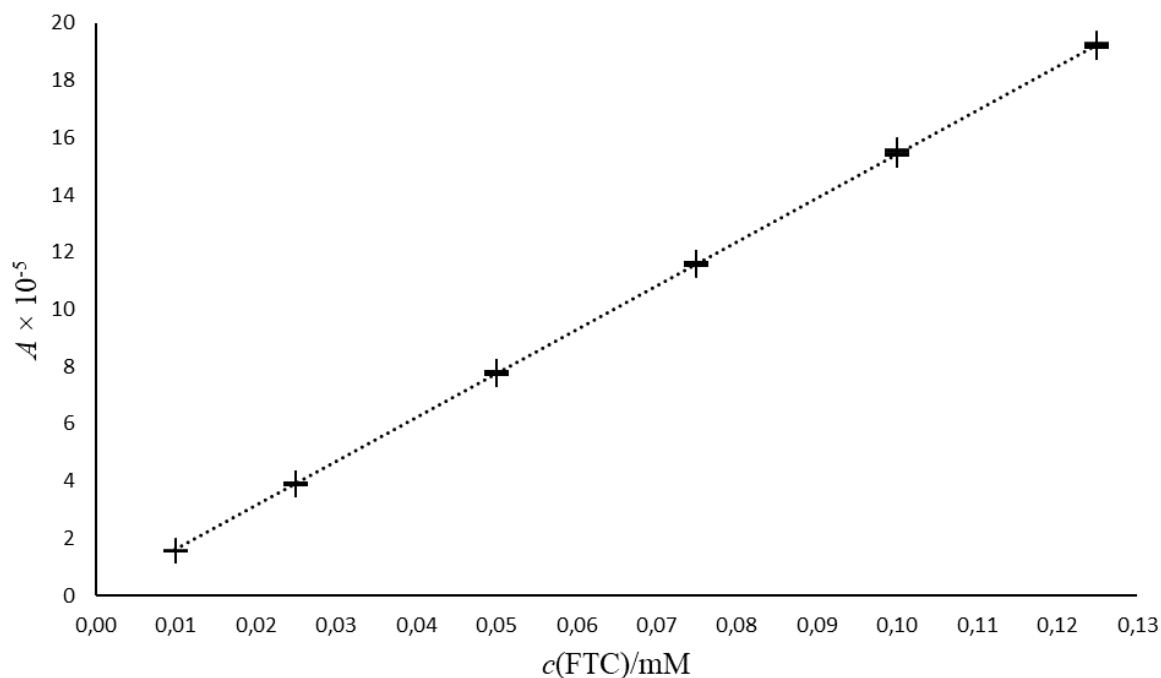
pokazuju koeficijent determinacije veći od 0,9900 što znači da je i razdvajanjem kalibracijskog pravca uvjet linearnosti zadovoljen.



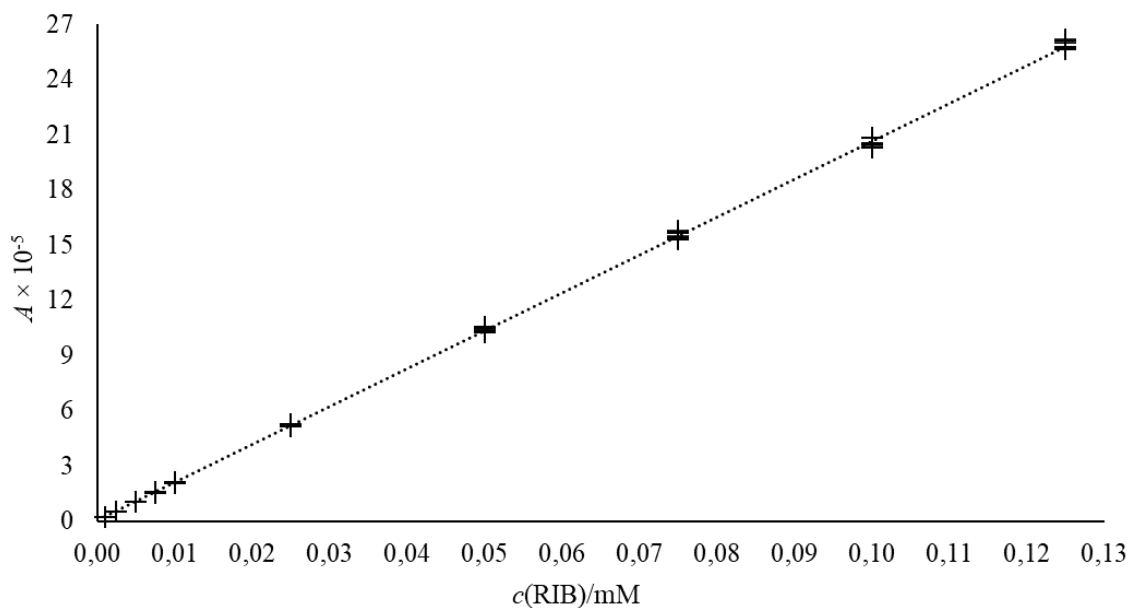
Slika 5. Graf rezidualnih odstupanja FTC-a za kalibracijski pravac $y = 1,5 \cdot 10^7 x + 2,1 \cdot 10^3$



Slika 6. Kalibracijski pravac FTC-a jednadžbe $y = 1,5 \cdot 10^7 x + 9,2 \cdot 10^2$ i R^2 vrijednosti od 0,9995 za područje koncentracija od 0,0010 mM do 0,0100 mM

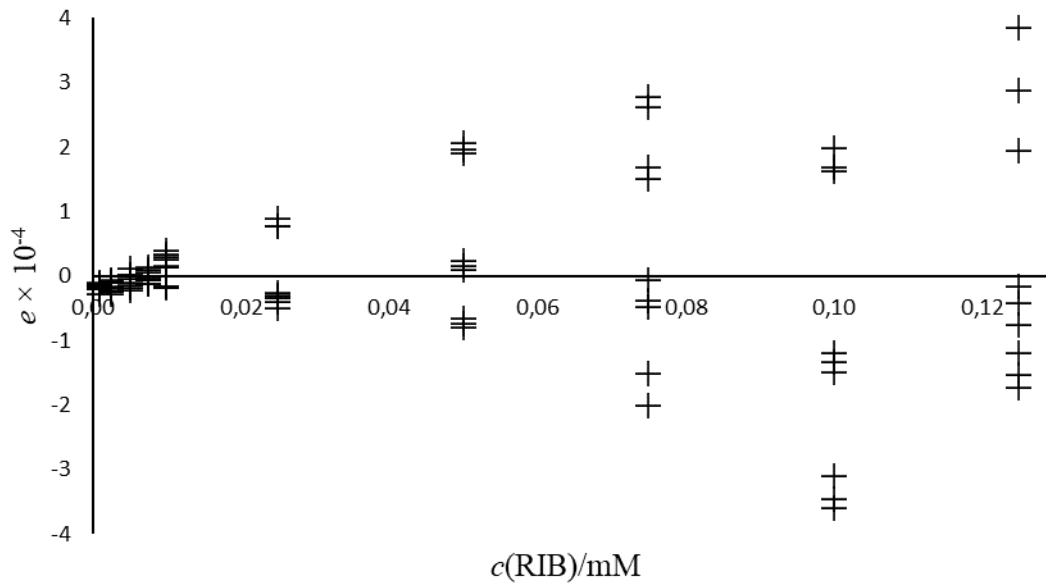


Slika 7. Kalibracijski pravac FTC-a jednadžbe $y = 1,5 \cdot 10^7 x + 4,8 \cdot 10^3$ i R^2 vrijednosti od 0,9999 za područje koncentracija od 0,0100 mM do 0,1250 mM

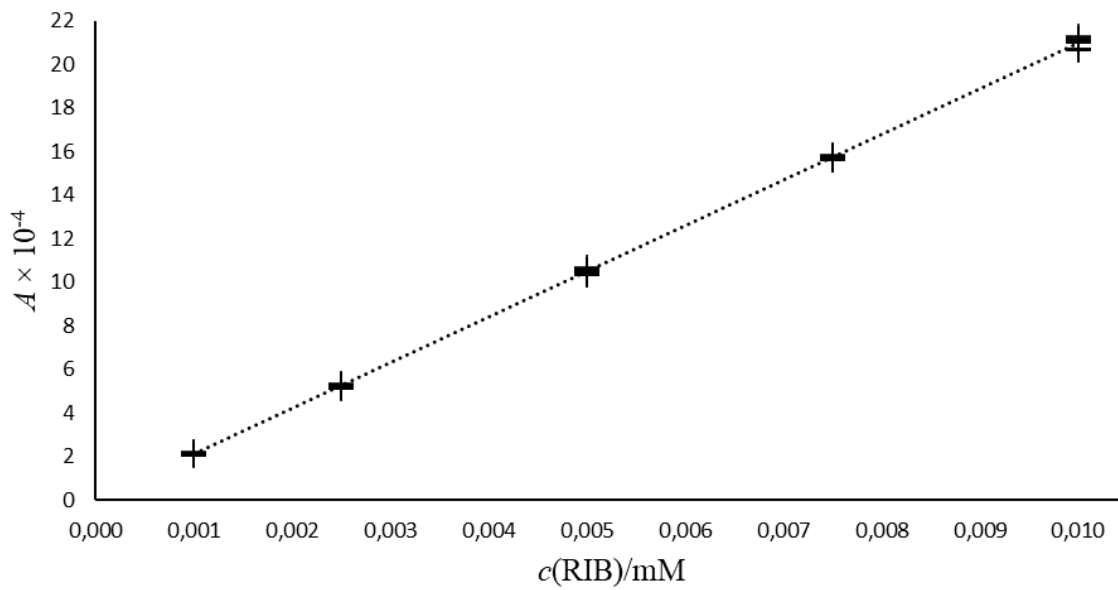


Slika 8. Kalibracijski pravac RIB-a jednadžbe $y = 2,1 \cdot 10^7 x + 2,3 \cdot 10^3$ i R^2 vrijednosti od 0,9998 za područje koncentracija od 0,0010 mM do 0,1250 mM

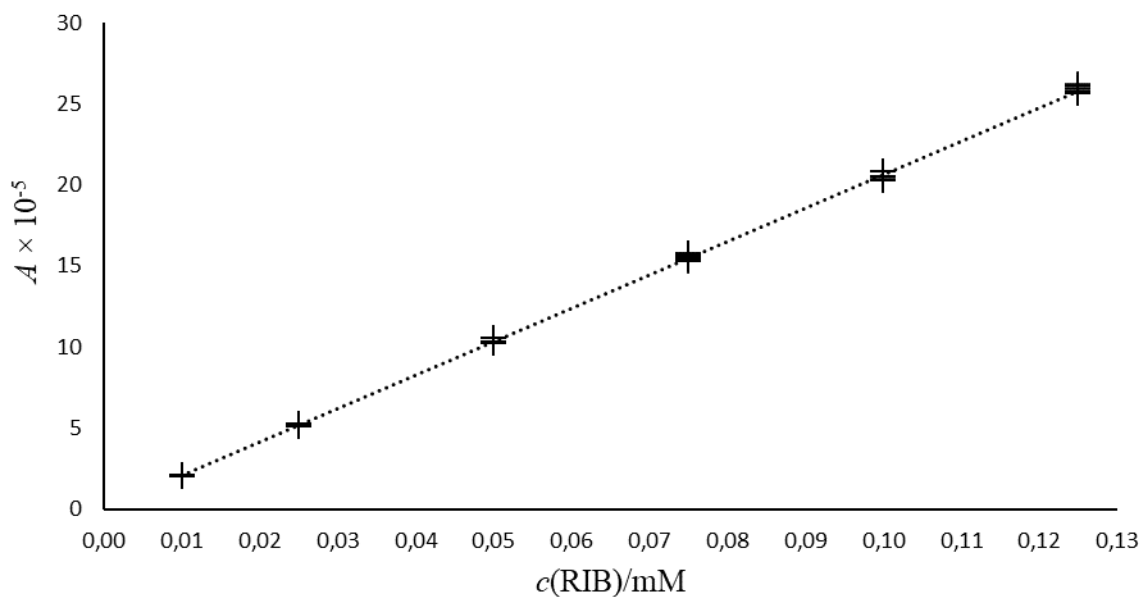
Na slici 8 prikazan je kalibracijski pravac za RIB kojeg karakterizira velika linearnost ($R^2 > 0,9900$). Graf rezidualnih odstupanja (slika 9) i ovdje pokazuje veća odstupanja pri većim koncentracijama zbog čega sam domenu razdvojila na dva koncentracijska područja (slike 10 i 11). Za oba područja dobivena je visoka linearnost odziva ($R^2 > 0,9900$).



Slika 9. Graf rezidualnih odstupanja RIB-a za kalibracijski pravac $y = 2,1 \cdot 10^7 x + 2,3 \cdot 10^3$



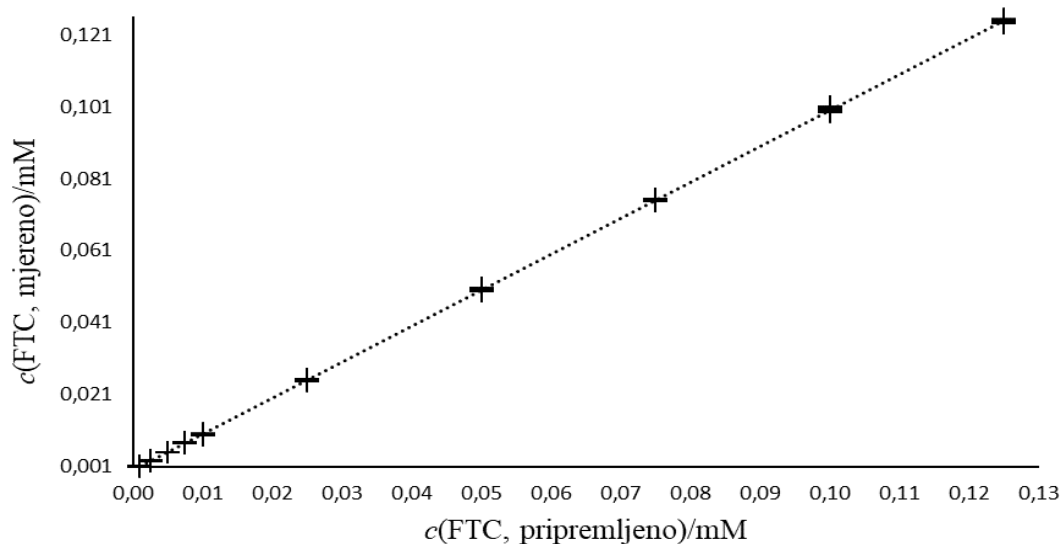
Slika 10. Kalibracijski pravac RIB-a jednadžbe $y = 2,1 \cdot 10^7 x + 81$ i R^2 vrijednosti od 0,9997 za područje koncentracija od 0,0010 mM do 0,0100 mM



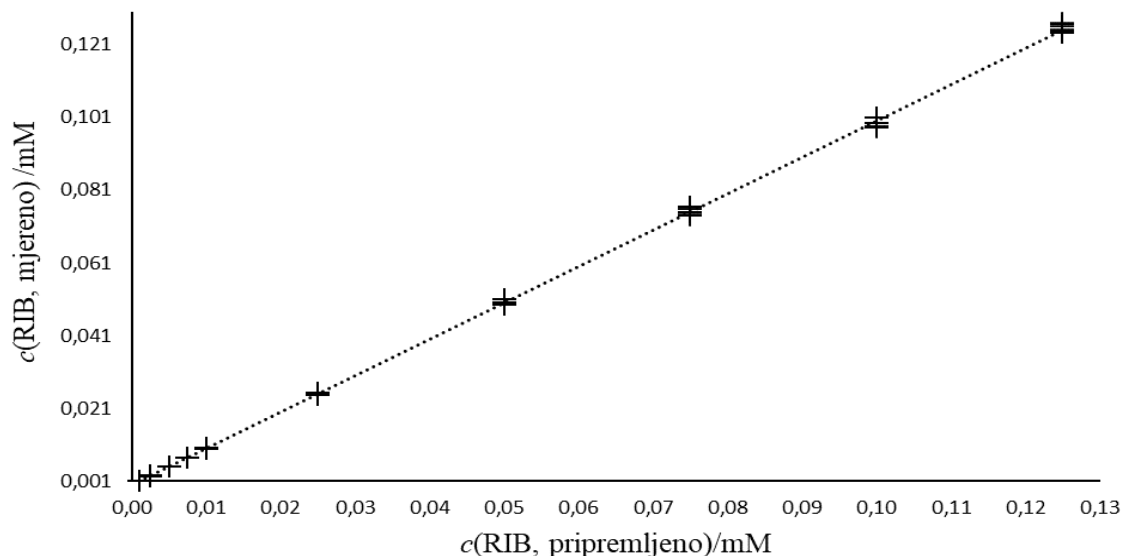
Slika 11. Kalibracijski pravac RIB-a jednadžbe $y = 2,1 \cdot 10^7 x + 4,6 \cdot 10^3$ i R^2 vrijednosti od 0,9997 za područje koncentracija od 0,0100 mM do 0,1250 mM

4.1.2 Točnost

Za sve kalibracijske krivulje analiziran je odnos mjerenih i pripremljenih vrijednosti koncentracija (slika 12 za FTC i slika 13 za RIB).



Slika 12. Usporedba mjerenih i pripremljenih vrijednosti koncentracija FTC-a



Slika 13. Usporedba mjerenih i pripremljenih vrijednosti koncentracija RIB-a

Točnost se određuje procjenom sustavne pogreške. Sustavna pogreška može biti konstantna ili proporcionalna. U idealnom slučaju, kada nema proporcionalne pogreške nagib pravca trebao bi biti 1, a u odsustvu konstantne pogreške odsječak bi trebao biti 0. Analiza točnosti FTC-a i RIB-a (tablice 3 i 4) pokazuju da kod svih razvijenih metoda 95%-tni intervali pouzdanosti za odsječak i nagib kalibracijskih pravaca sadrže vrijednosti 0, odnosno 1, što znači da s 95%-tnom vjerojatnošću možemo tvrditi kako razvijene metode ne sadrže ni konstantnu ni proporcionalnu sustavnu pogrešku. Također, za razvijene metode izračunat je i analitički povrat i to za sve pripremljene otopine. Ipak, zbog jednostavnijeg prikaza uzimane su srednje vrijednosti pojedine koncentracijske razine (tablice 5 i 6). Kriterij prihvatljivog analitičkog povrata varira od propisa do propisa, međutim najčešće se uzima interval od 70 do 130%. Srednje vrijednosti analitičkog povrata za FTC i RIB ne prelaze te granice što znači da je i ovaj kriterij točnosti zadovoljen.

Tablica 3. Rezultati analize točnosti FTC-a

Kalibracijsko područje / mM	Naziv parametra	Vrijednost parametra	Interval pouzdanosti 95,0%	
			Donja granica	Gornja granica
0,0100-0,1250	odsječak	0,0000	-0,0002	0,0002
	nagib	1,0000	0,9973	1,0027
0,0010-0,0100	odsječak	0,0000	0,0000	0,0000
	nagib	1,0000	0,9934	1,0066

Tablica 4. Rezultati analize točnosti RIB-a

Kalibracijsko područje / mM	Naziv parametra	Vrijednost parametra	Interval pouzdanosti 95,0%	
			Donja granica	Gornja granica
0,0100-0,1250	odsječak	0,0000	-0,0004	0,0004
	nagib	1,0000	0,9949	1,0051
0,0010-0,0100	odsječak	0,0000	0,0000	0,0000
	nagib	1,0000	0,9945	1,0055

Tablica 5. Prikaz srednjih vrijednosti analitičkog povrata za FTC

$c(\text{FTC})_{\text{pripravljeno}} / \text{mM}$	$c(\text{FTC})_{\text{mjereno}} / \text{mM}$	analitički povrat / %
0,1250	0,1247	99,76
0,1000	0,1003	100,29
0,0750	0,0751	100,08
0,0500	0,0501	100,20
0,0250	0,0251	100,26
0,0100	0,0100	100,11
0,0075	0,0075	100,22
0,0050	0,0049	98,32
0,0025	0,0026	102,04
0,0010	0,0010	99,96

Tablica 6. Prikaz srednjih vrijednosti analitičkog povrata za RIB

$c(\text{RIB})_{\text{pripravljeno}} / \text{mM}$	$c(\text{RIB})_{\text{mjereno}} / \text{mM}$	analitički povrat / %
0,1250	0,1252	100,16
0,1000	0,0995	99,53
0,0750	0,0752	100,27
0,0500	0,0502	100,35
0,0250	0,0249	99,74
0,0100	0,0100	100,11
0,0075	0,0075	99,81
0,0050	0,0050	100,03
0,0025	0,0025	99,67
0,0010	0,0010	101,01

4.1.3 Preciznost

Preciznost je u ovom radu iskazana kao ponovljivost te je izražena kao relativno standardno odstupanje (*RSD*). Obzirom na veliki broj točaka, preciznost je određivana samo na koncentraciji 0,0050 mM za koncentracijsko područje od 0,0010 mM do 0,0100 mM te

koncentracija 0,0750 mM za koncentracijsko područje od 0,0100 mM do 0,1250 mM. Kriterij za preciznost bio je $RSD \leq 10\%$.

U tablici 7 prikazani su rezultati analize preciznosti za FTC. RSD za koncentraciju 0,0050 mM iznosi 1,42%, a za koncentraciju 0,0750 mM 0,39%. Obje RSD vrijednosti su manje od 10% što znači da je zadovoljen kriterij preciznosti metode.

Tablica 7. Analiza preciznosti za FTC

	$C_{\text{pripravljeno}} / \text{mM}$	$C_{\text{mjereno}} / \text{mM}$	$C_{\text{pripravljeno}} / \text{mM}$	$C_{\text{mjereno}} / \text{mM}$
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0755
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0748
	0,0050	0,0048	0,0750	0,0749
	0,0050	0,0048	0,0750	0,0754
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0748
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0750
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0754
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0750
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0747
$C_{\text{srednje}} / \text{mM}$	0,0050	0,0049	0,0750	0,0751
standardna devijacija / mM		0,0001		0,0003
$RSD / \%$		1,42		0,39

Tablica 8 sadrži rezultate analize preciznosti metode određivanja RIB-a. RSD za koncentraciju 0,0050 mM iznosi 1,07%, a za koncentraciju 0,0750 mM 1,13%. Kao i kod FTC, i kod RIB obje su RSD vrijednosti manje od 10% čime je zadovoljen uvjet preciznosti.

Tablica 8. Rezultati određivanja preciznosti za RIB

	$C_{\text{pripravljeno}} / \text{mM}$	$C_{\text{mjereno}} / \text{mM}$	$C_{\text{pripravljeno}} / \text{mM}$	$C_{\text{mjereno}} / \text{mM}$
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0747
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0762
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0750
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0740
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0748
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0742
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0758
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0757
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0763
$C_{\text{srednje}} / \text{mM}$	0,0050	0,0050	0,0750	0,0752
standardna devijacija / mM		0,0001		0,0008
$RSD / \%$		1,07		1,13

4.1.4 Granica detekcije i granica kvantifikacije

GD i GK (tablica 9) određene su iz otopina najmanje koncentracije, odnosno iz 0,0010 mM otopina FTC-a i RIB-a.

Tablica 9. Proračunate vrijednosti GD i GK za FTC i RIB

	FTC	RIB
GD / mM	$6,4 \cdot 10^{-12}$	$5,4 \cdot 10^{-12}$
GK / mM	$1,9 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{-11}$

4.2 Prisilna razgradnja

„Neutralna“ hidroliza pratila se 7 dana na temperaturi od 25 °C. Prvi dan zabilježena je pH vrijednost FTC od 5,69 i pH vrijednost RIB od 5,86. Praćenjem kinetike hidrolize utvrđeno je da kroz 7 dana nije došlo do razgradnje nijednog od navedenih spojeva.

4.2.1 Lužnata hidroliza

Lužnata hidroliza FTC-a provodila se 4 h, a uzorci su uzimani svakih 30 min. Lužnata hidroliza RIB-a provodila se 2 h: uzorci su tijekom prvog sata uzimani svakih 10 min, a potom svakih 30 min. U tablici 10 prikazani su rezultati razgradnje preko normalizirane površine A/A_0 , gdje je t vrijeme, A površina ispod kromatografskog pika nakon određenog vremena trajanja hidrolize, a A_0 površina ispod kromatografskog pika prije hidrolize. Vidljivo je da se FTC pri navedenim uvjetima nakon 4 h razgradio 20%, dok se RIB već nakon 40 min razgradio 19%, a nakon 2 h čak 48%.

Tablica 10. Rezultati lužnate razgradnje FTC-a i RIB-a

FTC		RIB	
t / min	A/A_0	t / min	A/A_0
0	1,00	0	1,00
30	0,97	10	0,96
60	0,95	20	0,90
90	0,93	30	0,86
120	0,90	40	0,81
150	0,87	50	0,77
180	0,85	60	0,73
210	0,83	90	0,62
240	0,80	120	0,52

4.2.2 Kisela hidroliza

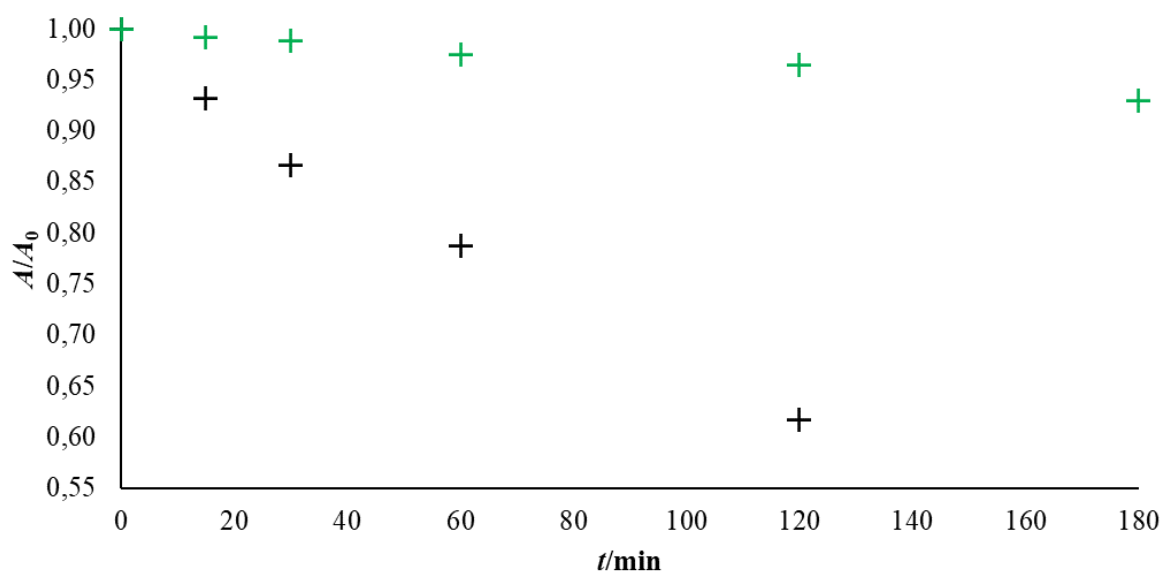
Kisela hidroliza FTC-a i RIB-a provodila se 1 M HCl. Hidroliza se pratila tijekom 5 h pri čemu nije došlo do razgradnje ni jednog od spojeva. Stoga je nastavljeno praćenje razgradnje do 24 h nakon čega je FTC ostao nerazgrađen, dok se RIB razgradio 1%.

4.2.3 Oksidacija vodikovim peroksidom

Prisilna razgradnja FTC-a provodila se 3%-tnom i 30%-tnom otopinom H_2O_2 . Razgradnja 3%-tnom otopinom provodila se 3 h, a 30%-tnom 2 h. U tablici 11 prikazani su rezultati razgradnje s obje koncentracije H_2O_2 preko normalizirane površine A/A_0 .

Tablica 11. Rezultati razgradnje FTC-a s H_2O_2

t / min	FTC + 3% H_2O_2	FTC + 30% H_2O_2
	A/A_0	A/A_0
0	1,00	1,00
15	0,99	0,93
30	0,99	0,87
60	0,97	0,79
120	0,96	0,62
180	0,93	-



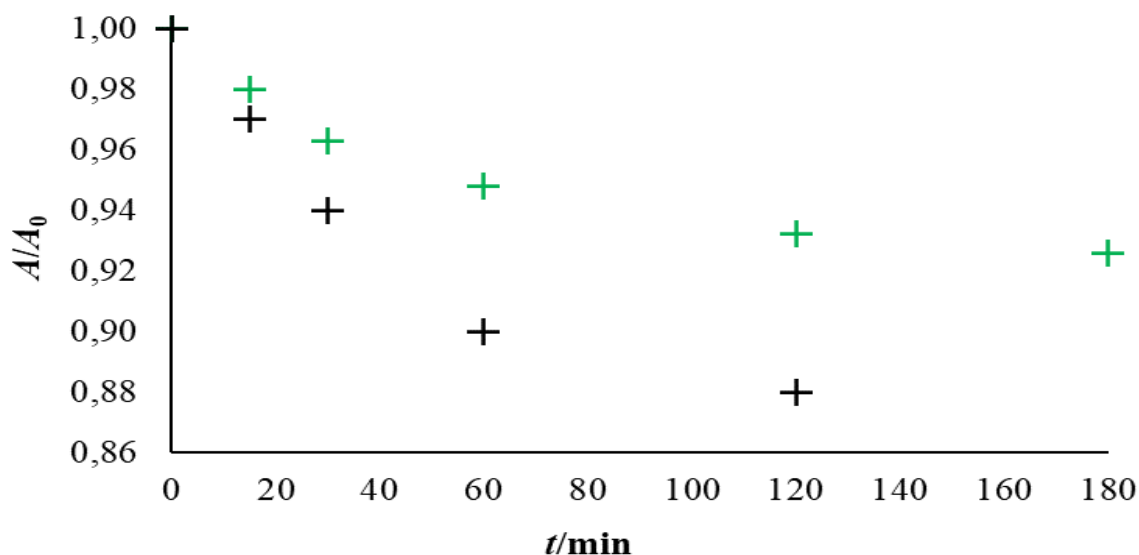
Slika 144. Grafički prikaz razgradnje FTC-a 3%-tnom (+) i 30%-tnom otopinom H_2O_2 (+)

Nakon 3 h, FTC se 3%-tnom otopinom H₂O₂ razgradio za 7%, dok se 30%-tnom otopinom H₂O₂ nakon 2 h razgradio za 38% (slika 14).

Razgradnja RIB-a se također provodila 3%-tnom i 30%-tnom otopinom H₂O₂ tijekom 3, odnosno 2 h. U tablici 12 prikazani su rezultati razgradnje s obje koncentracije H₂O₂ preko normalizirane površine A/A_0 . Nakon 3 h RIB se 3%-tnom otopinom H₂O₂ razgradio 7%, dok se 30%-tnom otopinom nakon 2 h razgradio 12%. Na slici 15 grafički je prikazana razgradnja RIB-a s obje koncentracije H₂O₂.

Tablica 12. Rezultati razgradnje RIB-a s H₂O₂

t/min	RIB + 3% H ₂ O ₂	RIB + 30% H ₂ O ₂
	A/A_0	A/A_0
0	1,00	1,00
15	0,98	0,97
30	0,96	0,94
60	0,95	0,90
120	0,93	0,88
180	0,93	-



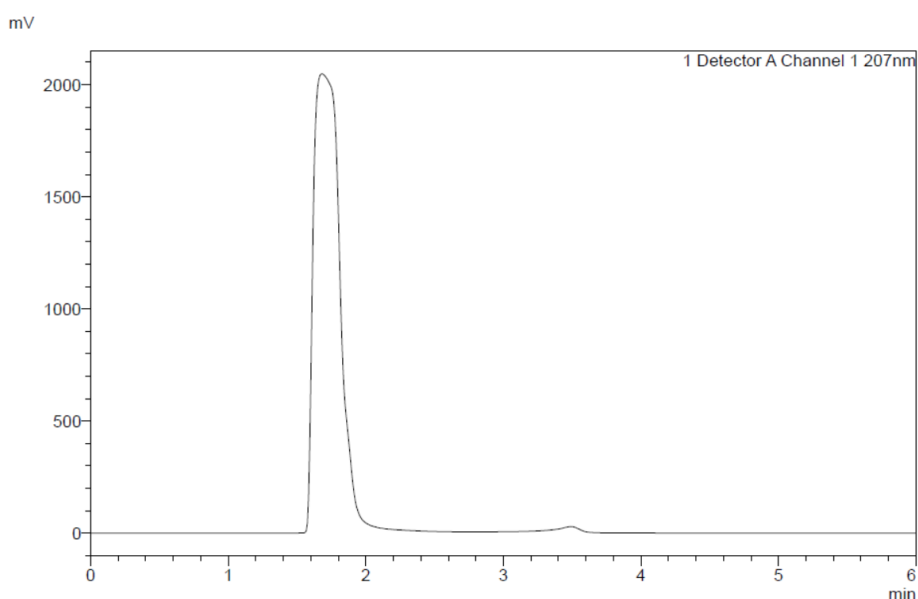
Slika 15. Grafički prikaz razgradnje RIB-a 3%-tnom (+) i 30%-tnom otopinom H₂O₂ (+)

Na slikama 16 i 17 prikazan je kromatogram razgradnje RIB-a 30%-tnom otopinom H₂O₂. Vidljiva je mala razlučivost i velika nesimetričnost pika RIB-a ($t_R=3,49$ min). Razlučivost R_s i asimetričnost A_s izračunate su jednadžbom (5), odnosno (6).

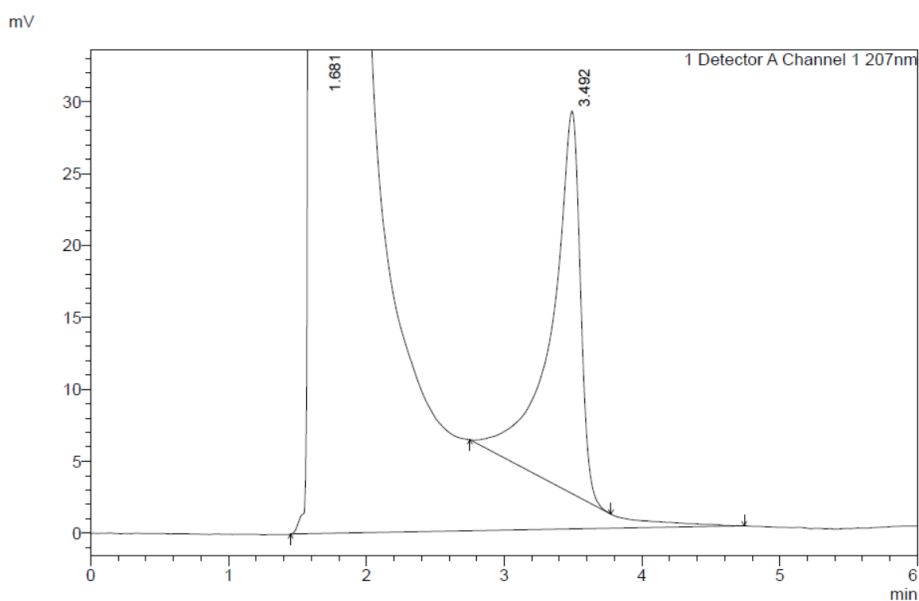
$$R_s = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w_{b(1)} + w_{b(2)}} \quad (5)$$

$$A_s = \frac{w_{0,1(D)}}{w_{0,1(L)}} \quad (6)$$

U jednađbama (5) i (6), $t_{R(1)}$ i $t_{R(2)}$ su retencijska vremena dvaju susjednih pikova, $w_{b(1)}$ i $w_{b(2)}$ širine njihovih baza, a $w_{0,1(D)}$ i $w_{0,1(L)}$ širine desne odnosno lijeve strane kromatografskog pika na 10% njegove visine. [45] Kako bi kromatogram bilo moguće kvantitativno upotrijebiti razlučivost pikova trebala bi biti veća od 1,5 (u slučaju pikova izrazito različitih dimenzija čak i 2), a vrijednost asimetričnosti pojedinih pikova u rasponu 0,9-1,2.



Slika 16. Kromatogram razgradnje RIB 30%-tnom otopinom H_2O_2



Slika 157. Uvećani kromatogram sa slike 16.

Izračunate vrijednosti $R_S=1,16$ i $A_S=0,30$ ne odgovaraju zahtijevanim uvjetima zbog čega kvantitativna analiza RIB u ovom slučaju nije pouzdana. Kod primjene 3%-tne otopine H_2O_2 , R_S zadovoljava uvjet, no A_S ni u tom slučaju ne pada u traženi raspon. Zbog toga bi bilo poželjno u ovom slučaju razviti novu HPLC metodu.

4.2.4 Termička razgradnja

Termička razgradnja FTC-a i RIB-a provodila se na temperaturama od 30 °C i 40 °C tijekom 7 dana te u tom periodu nije došlo do razgradnje spojeva.

4.2.5 Fotolitička razgradnja

Fotolitička razgradnja FTC-a i RIB-a pratila se 6 h usporedno s njihovim tamnim slijepim probama. FTC se nakon 6 h, u odnosu na slijepu probu, razgradio za 56%. U tablici 13 prikazani su rezultati razgradnje preko normalizirane površine A/A_0 . S druge strane, RIB se nakon 6 h nije razgradio.

Tablica 1311. Rezultati fotolitičke razgradnje FTC-a i RIB-a

FTC		RIB	
t/h	A/A_0	t/h	A/A_0
0,0	1,00	0,0	1,00
0,5	0,94	0,5	1,00
1,0	0,89	1,0	1,00
2,0	0,79	2,0	1,00
3,0	0,69	3,0	1,00
4,0	0,60	4,0	1,00
5,0	0,52	5,0	1,00
6,0	0,44	6,0	1,00

4.2.6 Usporedba svih primijenjenih postupaka razgradnje

Prisilna razgradnja emtricitabina i ribavirina provodila se pri istim uvjetima. U tablici 14 objedinjeni su svi rezultati dobiveni prisilnom razgradnjom spojeva. Oba spoja sklonija su razgradnji u lužnatom mediju, dok su u kiselom pokazali veću stabilnost. Spojevi se u lužnatom mediju ponašaju slično, ali ribavirin se u odnosu na emtricitabin brže raspada. Do kisele razgradnje ribavirina dolazi tek nakon 24 h što inicira da bi pri intenzivnijim uvjetima

stresa (npr. povišena temperatura, duže izlaganje i jača koncentracija kiseline) došlo do većeg postotka razgradnje. Emtricitabin je i nakon 24 h pokazao stabilnost u kiselom, međutim prema literaturnim podacima [16,46-48] bi se i on razgradio pri intenzivnijim uvjetima.

Tablica 14. Objedinjeni rezultati primijenjenih uvjeta prisilne razgradnje

Uvjeti/medij/trajanje	Razgradnja FTC-a /%	Razgradnja RIB-a /%
Kiseli/1 M HCl/5 h	0	0
Kiseli/1 M HCl/24 h	0	1
Lužnati/1 M NaOH/2 h	10	48
Lužnati /1 M NaOH/4 h	20	-
Oksidativni/3% H ₂ O ₂ /3 h	7	7
Oksidativni/30% H ₂ O ₂ /2 h	38	12
Termički/30 °C/7 dana	0	0
Termički/40 °C/7 dana	0	0
Fotolitički/200 W/m ² /6 h	56	0

Oksidacijska razgradnja emtricitabina i ribavirina provodila se s 3%-tnom i 30%-tnom otopinom H₂O₂. Manja koncentracije H₂O₂ nije bila dovoljna za željeni postotak razgradnje (10-15%) zbog čega su oba spoja tretirana s 10 puta većom koncentracijom H₂O₂. U oba slučaja oba spoja se ponašaju vrlo slično te podliježu razgradnji. Unatoč tome, obzirom na malu razlučivost i veliku nesimetričnost pika ribavirina, kao što je objašnjeno u prethodnom poglavlju, ti rezultati nisu pouzdani. Prema literaturnim podacima [49] emtricitabin bi, zbog svoje strukture, trebao biti manje podložan radikalima/radikalnim reakcijama nego ribavirin te pri istim uvjetima bi trebao biti manje podložan razgradnji s H₂O₂.

Tijekom termičke razgradnje emtricitabina i ribavirina nije došlo do razgradnje ni jednog spoja. Dobiveni rezultati su u skladu su s literaturom [16,48].

U konačnici provedena je i fotolitička razgradnja oba spoja. Emtricitabin se nakon 6 h razgradio 56% dok je ribavirin ostao postojan. Emtricitabin i ribavirin osvijetljavani su svjetlošću jačine 600 W/m² koja je 3 puta jača od minimalne jačine propisane ICH smjernicom Q1B zbog čega se dobiveni rezultati ne podudaraju s literaturom. U literaturi je navedeno da su oba spoja stabilna, odnosno da ne dolazi do njihove fotolitičke razgradnje. [16,46,48]

5. Zaključak

Široka primjena farmaceutika u medicini neizbježna je za poboljšanje kvalitete života. Međutim, povećana upotreba farmaceutika rezultira i njihovom povećanom koncentracijom u okolišu što dovodi do sve veće zabrinutosti jer farmaceutici, njihovi metaboliti i razgradni produkti pokazuju određenu razinu toksičnosti.

Cilj ovog rada bio je provesti za prisilnu razgradnju emtricitabina i ribavirina. Za potrebe istog razvijene su i validirane odgovarajuće HPLC metode analize emtricitabina i ribavirina. Validacija metoda provedena je ispitivanjem njezinih glavnih izvedbenih karakteristika. Linearnosti metoda potvrđene su dobivenim koeficijentima determinacije većim od 0,9900. Točnosti metode iskazane su preko analitičkog povrata koji je bio u granicama 70-130 %,. Uz to, utvrđeno je odsustvo sustavne pogreške. Preciznost razvijenih metoda iskazana je preko relativne standardne devijacije koji je imala vrijednosti manje od 10%. Granica detekcije i granica kvantifikacije ribavirina su nešto niže od granice detekcije i granice kvantifikacije emtricitabina, ali u oba slučaja granice detekcije su reda 10^{-12} mM, a granice kvantifikacije su reda 10^{-11} mM.

Prisilna razgradnja emtricitabina i ribavirina provodila se prema ICH smjernicama primjenjujući uvjete koji bi se mogli pojaviti u okolišu. Kod većine eksperimenata emtricitabin i ribavirin se nisu razgradili što ukazuje na njihovu postojanost u okolišu te malu sklonost jednostavnim procesima razgradnje (dodatkom kemijskih sredstava ili promjenom fizikalnih uvjeta temperature i svjetlosti). Odnosno, jednom kad dospiju u okoliš, vrlo slabo će se razgraditi pod utjecajem vanjskih-okolišnih uvjeta. Zbog toga je od izrazite važnosti istraživati napredne metode njihovog uklanjanja, kao što su to primjerice napredni oksidacijski procesi ili biološka razgradnja ciljanim organizmima.

Razgradni produkti jedni su od glavnih komponenata koje se uobičajeno prate kod istraživanja prisilne razgradnje. Njihovo praćenje i određivanje upotrebom spektrometra masa planirano je u nastavku istraživanja. Ovim radom određeni su uvjeti prisilne razgradnje koji daju željeni postotak razgradnje (10-15%) kako bi se dobile optimalne vrijednosti razgradnih produkata za njihovo određivanje.

6. Literatura

1. Periša M., Babić S., Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* **65** (2016) 471-482.
2. Di L., Kerns E.H., Carter G.T., Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design, *Curr. Pharm. Design* **15** (2009) 2184-2194.
3. URL: <https://www.oecd.org/els/health-systems/pharmaceuticals.htm> (pristup 10. ožujka 2023.)
4. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:52019DC0128&from=EN> (pristup 10. ožujka 2023.)
5. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/partners-networks/international-activities/multilateral-coalitions-initiatives/international-council-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use#:~:text=ICH%20aims%20to%20achieve%20greater,the%20most%20resource%20Defficient%20manner> (pristup 10. ožujka 2023.)
6. Reza Faruk M.A., Khatun Shorna H., Zahan Anka I., Use and impact of veterinary drugs, antimicrobials, and supplements in fish health management, *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **8** (2021) 36-43.
7. Naidu R., Espana V.A.A., Liu Y., Jit J., Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management, *Chemosphere* **154** (2016) 350-357.
8. URL: <https://www.verywellhealth.com/drug-classes-1123991> (pristup 10. ožujka 2023.)
9. URL: <https://my.clevelandclinic.org/health/drugs/21531-antivirals> (pristup 10. ožujka 2023.)
10. De Clercy E., Li G., Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years, *Clin. Microbiol. Rev.* **29(3)** (2016) 695-747.
11. URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00879> (pristup 10. ožujka 2023.)
12. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Emtricitabine> (pristup 13. ožujka 2023.)
13. URL: <https://www.drugfuture.com/chemdata/Emtricitabine.html> (pristup 13. ožujka 2023.)
14. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021500s010,021896s0041bl.pdf (pristup 13. ožujka 2023.)

15. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539853/> (pristup 13. ožujka 2023.)
16. Hamarapurkar P.D., Parate A.N., HPLC Method for the Determination of Emtricitabine and Related Degradation Substances, *J. Chromatogr. Sci.* **51** (2013) 419-424.
17. URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-085-0_4 (pristup 13. ožujka 2023.)
18. Parienti J.-J., Prazuck T., Peyro-Saint-Paul L., Fournier A., Valentin C., Brucato S., Verdon R., Colin M., Lesne F., Guinard J., Ar Gouilh M., Sève A., Dina J., Vabret A., Hocqueloux L., Effect of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Emtricitabine on nasopharyngeal SARS-CoV-2 viral load burden amongst outpatients with COVID-19: A pilot, randomized, open-label phase 2 trial, *eClinicalMedicine* **38** (2021) 100993.
19. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ribavirin> (pristup 15. ožujka 2023.)
20. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/ribavirin-teva-epar-public-assessment-report_en.pdf (pristup 15. ožujka 2023.)
21. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3099343/> (pristup 15. ožujka 2023.)
22. Rabuffetti M., Bavaro T., Semproli R., Cattaneo G., Massone M., Morelli C.F., Speranza G., Ubiali G., Synthesis of Ribavirin, Tecadenoson, and Cladribine by Enzymatic Transglycosylation, *Catalysts* **9** (2019) 355.
23. Elfiky Abdo A., Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARSCoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): A molecular docking study, *Life Sci.* **253** (2020) 117592.
24. Blessy M, Patel R.D., Prajapati P.N., Agrawal Y.K., Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review, *J. Pharm. Anal.* **4** (2014) 159-165.
25. URL: <https://www.pharmoutsourcing.com/Featured-Articles/37640-Forced-Degradation-to-Develop-Stability-indicating-Methods/> (pristup 17. ožujka 2023.)
26. URL: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/an-introduction-to-forced-degradation-studies-for-drug-substance-drug-product-0001> (pristup 17. ožujka 2023.)
27. Ravisankar P., Swathi V., Babu S.P., Sulthana S., Gousepeer S.K., Current Trends in Performance of Forced Degradation Studies and Stability Indicating Studies of Drugs, *Int. J. Pharm. Biol.* **12(6)** (2017) 17-36.

28. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf (pristup 17. ožujka 2023.)
29. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-b-photostability-testing-new-active-substances-medicinal-products-step-5_en.pdf (pristup 17. ožujka 2023.)
30. URL: <https://www.lab-worldwide.com/chromotography-what-is-it-a-1e09909f9a6f4394d3c3899eccf952bd/> (pristup 17. ožujka 2023.)
31. Coskun O., Separation techniques: Chromatography, *North. Clin. Istanbul*. **3(2)** (2016) 156-160.
32. URL: <http://www.chromatographer.com/monolithic-stationary-phases/> (pristup 17. lipanj 2023.)
33. URL: <https://www.lab-worldwide.com/the-reason-why-hplc-is-the-most-used-chromatography-method-a-54d51d9df3ddfb34e650138f04f60414/> (pristup 17. ožujka 2023.)
34. URL: <https://www.jove.com/v/10156/high-performance-liquid-chromatography-hplc> (pristup 17. ožujka 2023.)
35. URL: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-system-components/how-hplc-columns-work.html> (pristup 17. ožujka 2023.)
36. URL: <https://www.pharmaguideline.com/2016/01/different-types-of-hplc-detectors.html> (pristup 17. ožujka 2023.)
37. URL: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17029:ed-1:v1:en> (pristup 20. ožujka 2023.)
38. URL: <https://www.nist.gov/system/files/documents/2018/01/12/procedure-for-method-validation-20180101.pdf> (pristup 20. ožujka 2023.)
39. Huber L., Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare USA, Inc., New York, 2007.
40. URL: <https://alevelchemistry.co.uk/definition/calibration/> (pristup 20. ožujka 2023.)
41. https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/resources/titration_met_val_feb_10_2021.pdf (pristup 20. ožujka 2023.)
42. Chikanbanjar, N., Semwal, N., Jyakhwa, U., A Review Article on Analytical Method Validation, *J. Pharm. Innov.* **1** (2020) 48-58.

43. Rao, T.N., Validation of Analytical Methods, u Stauffer, M.T. (ur.): Validation of Analytical Methods - a Sampling of Current Approaches, IntechOpen, 2018, pp. 600-608.
44. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf (pristup 20. ožujka 2023.)
45. Bolanča T., Ukić Š., Ionska kromatografija, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
46. Devrukhakar S.P., Borkar R., Shastri N., Surendranath V.K., A Validated Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Tenofovir, Emtricitabine, and a Efavirenz and Statistical Approach to Determine the Effect of Variables, *ISRN* **2013** (2013) 878295.
47. Haggag S.R., Belal F.S., Hewala I.I., El Rouby A.O., Stability-Indicating HPLC–DAD Determination of Ribavirin in Capsules and Plasma, *J. Chrom. Sci.* **52** (2014) 493-500.
48. Sadanshio P.P., Wankhede B.S., Chaudhari D.P., A Validated Stability Indicating HPTLC Method for Estimation of Ribavirin in Capsule in Presence of its Alkaline Hydrolysis Degradation Product, *Anal. Chem. Lett.* **4** (2014) 343-358.
49. Blakely F.W., Fuciarelli F.A., Wegher J.B., Dizdaroglu M., Hydrogen Peroxide-Induced Base Damage in Deoxyribonucleic Acid, *Radiat. Res.* **121** (1990) 338-343.

