

Razvoj i validacija analitičke metode za određivanje onečišćenja u ceritinib aktivnoj farmaceutskoj tvari

Bilmez, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:567855>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Ivan Bilmez

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Ivan Bilmez

**RAZVOJ I VALIDACIJA ANALITIČKE METODE ZA
ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U CERITINIB AKTIVNOJ
FARMACEUTSKOJ TVARI**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

prof. dr. sc. Jelena Macan

Zagreb, rujan 2022.

Eksperimentalni dio ovog završnog rada izrađen je u laboratorijima odjela Analitike u Plivi, Teva API I&R, Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, pod vodstvom Aide Omerbašić, dipl. ing. i mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić u sklopu sveučilišnog prediplomskog studija Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvala:

Prije svega, želio bih se zahvaliti prof. dr. sc. Sandri Babić na pruženoj prilici i pomoći, susretljivosti te velikom razumijevanju svih mojih obaveza. Bilo mi je jako drago surađivati s Vama.

Uvelike se zahvaljujem i Aidi Omerbašić, dipl. ing. na svom prenesenom znanju, smirenošću i strpljenju u radu sa mnom, znam da nije bilo lako. Zahvalu dugujem i cijelom Teamu Raketa, koji su mi uljepšali sve dane provedene u laboratoriju te uvijek bili od velike pomoći kada god je to bilo potrebno. Hvala Vam!

Zahvaljujem se i roditeljima, sestri i bratu te svojoj rodbini na ogromnoj podršci i povjerenju tijekom studija, a posebno baki Dragici i didi Ivanu koji su uvijek tu uz mene.

Svim prijateljima i kolegama također veliko hvala na pomoći i podršci!

Na kraju, hvala Martini Taritaš što mi je veliki oslonac u životu i bezrezervna podrška.

SAŽETAK

Ceritinib je farmaceutska tvar koja se koristi za liječenje odraslih bolesnika s uznapredovalim rakom pluća nemalih stanica. Ovaj lijek se koristi samo u slučajevima kada stanice raka imaju mutaciju uzrokovanu genom zvanim kinaza anaplastičnog limfoma, i u tom slučaju su osobe pozitivne na taj gen.

Kako bismo mogli odvojiti naš farmaceutik od potencijalnih onečišćenja koja se u njemu nalaze potrebno je imati dobru kromatografsku metodu koju je zatim potrebno validirati. Validacija kromatografske metode je nužan korak u osiguravanju kvalitete proizvoda. To je postupak kojim se definiraju potrebni zahtjevi, provodi eksperimentalno ispitivanje izvedbenih karakteristika metode te daje potvrda o zadovoljenosti postavljenih zahtjeva. Cilj ovog rada bio je razviti i validirati metodu za određivanje poznatih onečišćenja u ceritinib aktivnoj farmaceutskoj tvari. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je tehnika korištena u ovom radu. Tijekom validacije ispitane su sljedeće izvedbene karakteristike metode: specifičnost/selektivnost, linearnost, radno područje, preciznost (ponovljivost), granica kvantifikacije, granica detekcije, stabilnost otopine te robusnost.

Granica detekcije iznosi 105 ppm, dok granica kvantifikacije iznosi 350 ppm.

Ključne riječi: ceritinib, onečišćenja, HPLC, validacija kromatografske metode.

SUMMARY

Ceritinib is a pharmaceutical substance used to treat adult patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). This medicine is only used in cases where cancer cells have a mutation caused by gene called anaplastic lymphoma kinase (ALK), and in that case person is positive for that gene.

In order to be able to separate our pharmaceutical from potential impurities found in it, it is necessary to have a good chromatographic method, which then needs to be validated. Validation of the chromatographic method is a necessary step in ensuring product quality. It is a procedure that defines the necessary requirements, conducts an experimental test of the performance characteristics of the method, and provides confirmation of the satisfaction of the set requirements. The aim of this study is to develop and validate a method for the determination of known impurities in the active pharmaceutical substance ceritinib. High performance liquid chromatography (HPLC) is the technique used in this work. During the validation, the following performance characteristics of the method were examined: specificity/selectivity, linearity, working range, precision (reproducibility), quantification limit, detection limit, solution stability and robustness.

Detection limit is 105 ppm and quantification limit of is 350 ppm.

Key words: ceritinib, impurities, HPLC, validation of chromatographic method.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1	Ceritinib i onečišćenja	2
2.2	Kromatografija	3
2.2.1	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	4
2.2.2	Vrijeme zadržavanja.....	5
2.3	Detektori u kromatografiji	6
2.3.1	DAD detektor.....	7
2.4	Validacija	8
3	EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1	Materijali.....	11
3.1.1	Kemikalije.....	11
3.1.2	Ceritinib i onečišćenja	11
3.1.3	Nepokretne faze korištene za razvoj HPLC metode	14
3.2	Instrumenti	14
3.2.1	Mikrovaga.....	14
3.2.2	Analitička vaga	15
3.2.3	Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti	15
3.2.4	Ostali korišteni instrumenti:.....	16
3.3	Metode rada	17
3.3.1	Razvoj i optimizacija metode.....	17
3.3.2	Validacija metode.....	18
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1	Razvoj metode.....	21
4.1.1	Odabir pogodnog otapala.....	21

4.1.2	Odabir prikladne pH-vrijednosti pokretne faze	21
4.1.3	Odabir valne duljine detekcije	24
4.1.4	Odabir nepokretne faze.....	24
4.1.5	Odabrani optimalni uvjeti za validaciju metode	25
4.2	Validacija metode.....	26
4.2.1	Specifičnost.....	26
4.2.2	Linearnost	28
4.2.3	Preciznost.....	28
4.2.4	Točnost	31
4.2.5	Granica detekcije.....	32
4.2.6	Granica kvantifikacije	33
4.2.7	Radno područje	34
4.2.8	Stabilnost	34
4.2.9	Robusnost	36
4.3	Sažetak rezultata.....	39
5	ZAKLJUČAK	40
6	LITERATURA.....	41
7	PRILOZI	42
8	ŽIVOTOPIS.....	51

1 UVOD

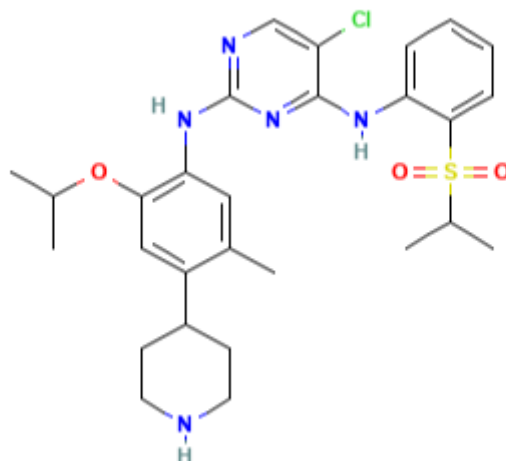
Onečišćenja u lijekovima su nepoželjne tvari u aktivnoj farmaceutskoj tvari koje mogu nastati tijekom proizvodnje lijeka ili mogu zaostati u proizvodnim postupcima ljevakovite tvari. Takve tvari imaju nepoželjne učinke na pacijente te je stoga vrlo važno njihovo praćenje kako bi se ta onečišćenja uklonila ili minimalizirala. Svaki lijek ima točno propisane maksimalne udjele poznatih i nepoznatih onečišćenja s obzirom na dani rok valjanosti koje propisuju regulatorna tijela. Praćenje onečišćenja u farmaceutskoj industriji je vrlo važno i provodi se raznim metodama koje moraju dati pouzdane i točne rezultate kako bi bili sigurni da naša metoda služi onome za što je i predviđena. Kako bi sa sigurnošću mogli reći da metoda služi svrsi, ona mora zadovoljavati sve kriterije za kvalitetu proizvoda koji se ispituju i potvrđuju validacijom analitičke metode.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 CERITINIB I ONEČIŠĆENJA

Ceritinib (CRT) je djelatna tvar u lijeku pod nazivom Zykadia kojeg je proizvela švicarsko-američka farmaceutska kompanija Novartis. Zykadia kao lijek dolazi u obliku kapsula za oralnu upotrebu u kojemu se nalazi 150 mg ceritiniba. Ceritinib je zapravo selektivni inhibitor kinaze u liječenju odraslih pacijenata s metastatskim rakom pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) pozitivnim na anaplastični limfom kinazu (engl. *anaplastic lymphoma kinase*, ALK) [1]. Kinaza anaplastičnog limfoma je gen koji se može spojiti s drugim genima i tako formirati fuzijske onkogene koji potiču rast tumorskih stanica. Pojava ALK gena se može primijetiti ako pacijent postane osjetljiv na prijašnji lijek protiv raka pluća nemalih stanica zvan krizotinib ili ako se primijeti iznenadan i nekontrolirajući rast tumorskih stanica [2].

Ceritinib (*Slika 1*) pripada klasi aminopirimidina koji je 2,6-diamino-5-kloropirimidin u kojem amino skupine na položajima 2 i 6 nose sljedeće supstituente: 2-metoksi-4-(piperidin-4-il)-5-metilfenil i 2-(izopropilsulfonil)fenil. Ime prema IUPAC-u je 5-kloro-2-N-(5-metil-4-piperidin-4-il-2-propan-2-iloksifenil)-4-N-(2-propan-2-ilsulfonilfenil)pirimidin-2,4-diamin [1].



Slika 1. Kemijska struktura ceritiniba

Ceritinib je aminopirimidin, aromatski eter, sekundarni amin te član piperidina i sulfona. Njegov CAS broj je 1032900-25-6. Molekulska formula ceritiniba je $C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$ te mu molekulska masa iznosi 558,1 g/mol [1].

Svaki lijek u farmaceutskoj industriji može imati potencijalna onečišćenja u sebi koja nikako nisu dobra i ugrožavaju pacijente, ali i mogućnost stavljanja lijeka na tržište u prvom koraku. Onečišćenja uvijek treba pokušati ukloniti, odnosno svesti na nulu. No, ona onečišćenja za koja to nije moguće, treba ih specificirati [3]. Postojali su raznorazni standardi i pravilnici prije nego što je organizirana Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) koja obuhvaća Europsku uniju, Sjedinjene Američke Države i Japan, radi lakšeg usklađivanja standarda i zakonskih regulativa u vezi lijekova. ICH izdaje svoje smjernice i tako ubrzava stavljanje lijekova na tržište uz očuvanje dobrobiti pacijenata [4].

Prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (ICH), onečišćenje je definirano kao svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nema ljekovita svojstva, odnosno nije ljekovita tvar. Onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine, a to su: organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Postoji i potencijalna četvrta skupina onečišćenja koje ICH razmatra, a to su onečišćenja metalima [4].

Onečišćenja ispitana u ovome radu su ceritinib organska onečišćenja definirana od strane farmaceutske tvrtke Sinco Pharmachem inc. iz Sjedinjenih Američkih Država. Detaljnije informacije navedene su u poglavlju 3.1. Materijali: 3.1.2. Ceritinib i onečišćenja [5].

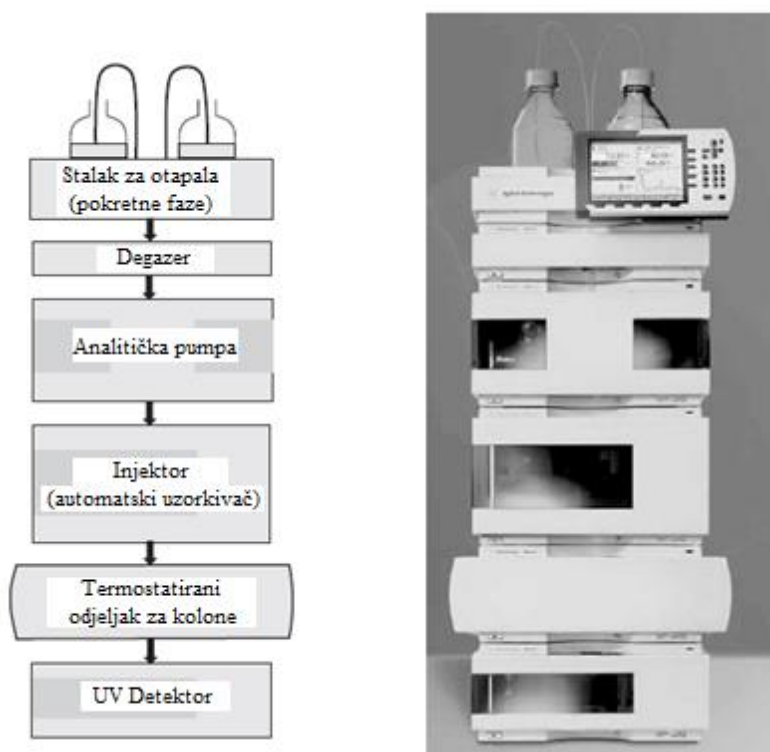
2.2 KROMATOGRAFIJA

Povijest kromatografije veže se uz ruskog botaničara M. S. Cveta koji se smatra ocem kromatografije. Teorijske temelje moderne tekućinske kromatografije su malo kasnije postavila dvojica britanskih kemičara i dobitnika Nobelove nagrade 1952. Godine A. J. P. Martin i R. L. M. Synge [6]. Kromatografija, tehnika odvajanja komponenti u smjesi, postala je jedna od vodećih analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju različitih spojeva u tekućem i plinovitom stanju. Osnovno načelo kromatografije temelji se na koncentracijskoj ravnoteži komponenata u smjesi između dvije faze, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna koja se kreće kroz prethodno spomenutu [7].

2.2.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je najpoznatija tekućinska kromatografska tehnika. HPLC tehnike su doživjele veliki uspjeh zbog toga što analitičari imaju veliku mogućnost djelovanja na postizanje zadovoljavajuće separacije pomoću raznoraznih odabira kolona, pokretnih faza, i interakcija između otopine, pokretne faze i nepokretne faze. Iako je efikasnost HPLC kolona manja nego u plinskoj kromatografiji (GC), nove nepokretne faze, odnosno punila HPLC kolona, omogućila su primjenu različitih mehanizama separacije što je poboljšalo mogućnosti HPLC tehnika [7].

Generalni princip rada i postavljanja HPLC instrumenta prikazan je na *Slici 2*.

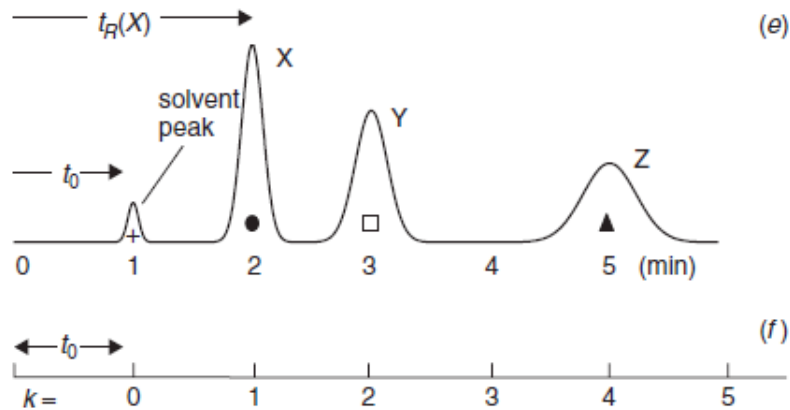


Slika 2. Shema HPLC instrumenta [7]

Jedan HPLC instrument se sastoji od nekoliko odjeljaka koji mogu postojati zasebno, a kada se spoje čine jednu cjelinu HPLC instrumenta. Takav modularni sustav instrumenta omogućava lako otklanjanje problema bez da se drugi odjeljci diraju. Cirkulacijski sistem uskih cjevčica (0,1 mm) osigurava nesmetano strujanje pokretne faze kroz odjeljke instrumenta [7].

2.2.2 Vrijeme zadržavanja

Vrijeme zadržavanja t_R (engl. *retention time*) je vrijeme koje protekne od injektiranja uzorka do pojave pika na kromatogramu. Najbolje je to objasniti na primjeru. Na *Slici 3.* prikazan je primjer kromatograma uzorka koji sadrži komponente X, Y i Z [8].



Slika 3. Kromatogram [8]

Za prikazani kromatogram na *Slici 3.* možemo utvrditi kako je vrijeme zadržavanja t_R komponente X 2 minute, za Y je 3 minute i za Z 5 minuta. Na primjeru *Slike 3.* možemo primijetiti i vrijeme t_0 označeno za prvu minutu. Vrijeme t_0 predstavlja tzv. mrtvo vrijeme kolone koje se definira kao vrijeme pojave pika otapala [8].

Vrijeme zadržavanja, kao i mrtvo vrijeme mogu se definirati kao omjer udaljenosti i brzine, pri čemu udaljenost predstavlja duljina kolone L :

$$t_R = \frac{L}{u_x} \quad (1)$$

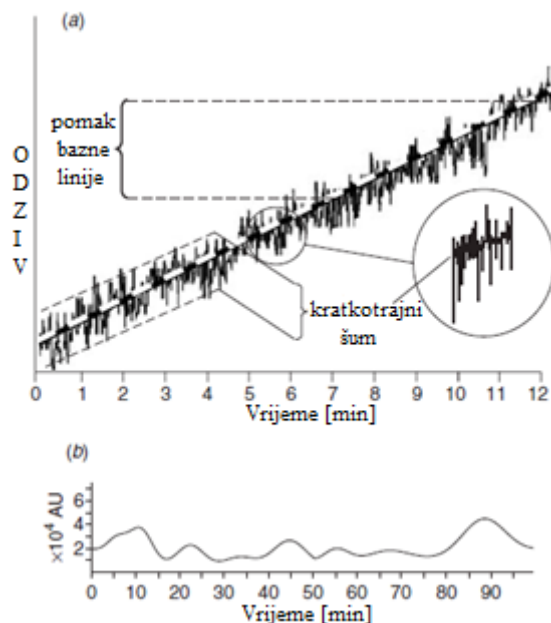
$$t_0 = \frac{L}{u} \quad (2)$$

gdje je u_x prosječna brzina gibanja komponente X i u prosječna brzina pokretne faze [8].

2.3 DETEKTORI U KROMATOGRAFIJI

Cilj kromatografske analize često nije samo odrediti koje se komponente, odnosno spojevi nalaze u uzorku, već i mjerenje koncentracije komponenata koje su u uzorku. U tu svrhu moramo imati dobro prilagođeni detektor. Univerzalni detektori mogu biti veliki nedostatak pri analizi jer mogu rezultirati kromatogramom s velikim brojem pikova u kojima je teško detektirati željene analite. Stoga, detektor koji se koristi mora objediniti određeni broj osnovnih svojstava. Spomenuta svojstva koje detektor mora dati za svaki od detektiranih spojeva su: odziv proporcionalan trenutnom masenom protoku, osjetljivost, mora filtrirati pozadinske šumove i biti stabilan u vremenu. Većina detektora koji se koriste su temeljeni na optičkim svojstvima analita: apsorpciji, fluorescenciji ili indeksu loma [7].

Sposobnost detektora da proizvodi precizan i točan kvantitativni podatak temelji se na signalu generiranom od strane uzorka (analita), pozadinskom šumu i pomaku bazne linije. Pozadinski šumovi mogu se podijeliti na kratkotrajne i dugotrajne šumove (*Slika 4*). Kratkotrajni šumovi su osnovne smetnje koje se javljaju u periodu manjim od minute, a na kromatogramu izgledaju kao oscilacije bazne linije. Kratkotrajni šum može se reducirati uvođenjem RC (engl. *resistance-capacitance*) filtra ili smanjenjem brzine uzorkovanja podataka (smanjenjem frekvencije) [8]. Dugotrajni šum je periodička fluktuacija bazne linije kromatograma u istom rasponu kao i pikovi. Često je rezultat analize jako koncentriranog uzorka koji zaostaje na koloni, pa je stoga potrebno s vremenom pročitati kolonu jakim otapalom, npr. 100% ACN-om. Pomak bazne linije je postepeni pomak tijekom jedne ili više analiza i karakterističan je kada se koristi gradijentno eluiranje jer odziv detektora neće biti jednak na početku i na kraju zbog razlike u sastavu pokretne faze [8].

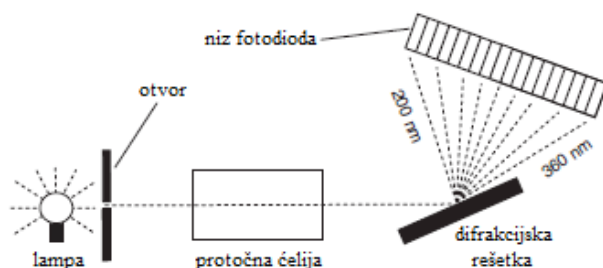


Slika 4. Prikaz kratkotrajnog šuma (engl. *short-term noise*), pomaka bazne linije (engl. *baseline drift*) i dugotrajnog šuma prikazanog na donjem kromatogramu (engl. *long-term noise*) [8]

Važan podatak koji povezuje signal i šum zove se omjer signal/šum (eng. *signal-to-noise ratio*, S/N). Šum se mjeri kao što je prethodno opisano, a signal se mjeri od sredine bazne linije šuma do vrha pika uzorka. S/N omjer se koristi pri određivanju donje granice detekcije (engl. *detection limit*, DL) i donje granice kvantifikacije (engl. *quantification limit*, QL), pri čemu za DL mora biti zadovoljen uvjet da je omjer $S/N \geq 3$, a za QL omjer S/N mora biti 10 ili veći.

2.3.1 DAD detektor

DAD detektor je detektor s nizom dioda (engl. *diode-array detector*) koji se još naziva i PDA detektor (engl. *photodiode array*). Shema DAD detektora prikazana je na Slici 5. [8].



Slika 5. Shema DAD detektora gdje crtkana linija predstavlja optički put [8]

Optički put u DAD detektoru započinje u lampi koja proizvodi polikromatki UV/Vis izvor svjetlosti koji zatim prolazi kroz protočnu ćeliju i raspršuje se na difrakcijskoj rešetci. Na taj način difrakcijska rešetka raspršuje spektar prema nizu fotodioda koje bilježe niz valnih duljina spektra. Broj dioda u detektoru ovisi o modelu i tipu detektora, ali najčešći su DAD detektori s 512 ili 1024 diode. Pojedinačne diode detektora prate apsorpciju vrlo uskih intervala valne duljine te se ti signali obrađuju kako bi se stvorio spektar valnih duljina analita [7, 8].

DAD detektorom se može upravljati tako da skuplja podatke na jednoj ili na više valnih duljina spektra kroz kromatogram, ali i za prikupljanje cijelog spektra nekog analita [8].

2.4 VALIDACIJA

Validacija analitičke metode je niz eksperimentalnih postupaka koji imaju cilj pokazati da je analitička metoda prikladna za svoju namjenu za koju je određena [9]. Validacija metode nam pruža jamstvo pouzdanosti tijekom normalne upotrebe metode, a sama validacija se nekada odnosi na stvaranje dokumentacijske evidencije da metoda služi čemu je i namijenjena. Regulatorna tijela i agencije postavljaju zahtjeve i protokole prema kojima validacijski parametri, odnosno izvedbene karakteristike moraju biti usklađene [10]. Američko udruženje za hranu i lijekove (engl. *US Food and Drug Administration*, FDA) je 1987. godine prvo dalo listu specifikacija za validaciju koje se nalaze u Farmakopeji SAD (engl. *United States Pharmacopeia*, USP). Nedavno je dano novije izdanje u kojem su ažurirani i usklađeni podaci s Međunarodnom konferencijom o harmonizaciji (ICH). ICH smjernice su pružile usklađivanje svjetskih farmakopeja na globalnoj razini [10].

Validacijski parametri, odnosno izvedbene karakteristike metode koje je potrebno odrediti prilikom provođenja validacije metode su:

1. TOČNOST

Točnost (engl. *accuracy*) je mjera blizine slaganja između prihvaćene referentne vrijednosti i vrijednosti pronađene u uzorku. Za ljekovitu tvar, ispitivanje točnosti provodi se usporedbom rezultata analize standarda s njegovom referentnom vrijednosti ili usporedbom s rezultatima druge dobro karakterizirane metode. Za kvantifikaciju onečišćenja, točnost se utvrđuje analizom uzorka (ljekovite tvari) obogaćenim poznatom količinom onečišćenja.

2. PRECIZNOST

Preciznost (engl. *precision*) metode definira se kao bliskost slaganja između pojedinačnih rezultata ponovljenih analiza homogenog uzorka. Preciznost se određuje kao:

- Ponovljivost (engl. *repeatability*) – sposobnost metode da u kratkom vremenskom periodu daje iste rezultate pod identičnim uvjetima.
- Međupreciznost (engl. *intermediate precision*) – odnosi se na slaganje između rezultata zbog slučajnih događaja koji se inače mogu dogoditi u identičnom laboratoriju, kao npr. različiti dani, drugi analitičari, druga oprema itd.
- Obnovljivost (engl. *reproducibility*) – odnosi se na slaganje rezultata analiza koje provedu različiti analitičari u različitim laboratorijima.

3. SPECIFIČNOST

Specifičnost (engl. *specificity*) je sposobnost točnog i preciznog mjerenja analita koji nas zanima u prisutnosti drugih komponenti za koje se može očekivati da mogu biti prisutne u uzorku. Specifičnost uzima u obzir stupanj smetnje drugih aktivnih tvari, pomoćnih tvari, onečišćenja itd.

4. GRANICA DETEKCIJE

Granica detekcije (engl. *detection limit*, DL) se definira kao najniža moguća koncentracija analita u uzorku koja se može detektirati ali ne nužno i kvantificirati. Granica detekcije najčešće se dokazuje na razini 30% od granice kvantifikacije (QL).

5. GRANICA KVANTIFIKACIJE

Granica kvantifikacije (engl. *quantification limit*, QL) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može kvantificirati s prihvatljivom preciznosti i točnosti. Granica kvantifikacije u većini metoda za analizu onečišćenja u djelatnoj tvari iznosi 0,02-0,05% nominalne koncentracije djelatne tvari u uzorku.

6. LINEARNOST

Linearnost (engl. *linearity*) je sposobnost metode da daje rezultate koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u nekom danom području. Linearnost se obično prikazuje kao varijanca nagiba regresijske krivulje, odnosno kao koeficijent determinacije (vrijednost R^2).

7. RADNO PODRUČJE

Radno područje (engl. *range*) je interval između gornje i donje koncentracije analita unutar kojega se postiže prihvatljiva preciznost, točnost i linearnost.

8. ROBUSTNOST

Robusnost (engl. *robustness*) analitičke metode je mjera sposobnosti metode da daje prihvatljive rezultate pri malim i nenamjernim promjenama eksperimentalnih uvjeta koji se mogu očekivati tijekom redovne upotrebe metode. Robusnost zapravo prikazuje da je naša metoda prikladna i pouzdana tijekom normalne upotrebe [10].

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela ovoga rada prikazane su u *Tablici 1*.

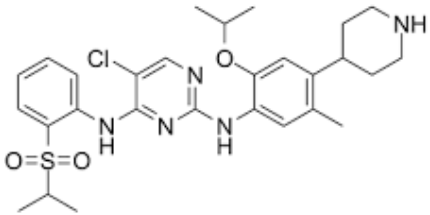
Tablica 1. Popis kemikalija i njihove specifikacije

Naziv	Kemijska formula	Čistoća	Proizvođač
Fosforna kiselina	H ₃ PO ₄	p.a.	J. T. Baker, Švicarska
MiliQ voda	H ₂ O	p.a.	Milipore Corporation,
Amonij acetat	CH ₃ COO ⁻ NH ₄ ⁺	HPLC	Honeywell, Njemačka
Acetonitril	CH ₃ CN	HPLC	J. T. Baker, SAD
Kalijev dihidrogenfosfat	KH ₂ PO ₄	HPLC	J. T. Baker, SAD
Metanol	CH ₃ OH	HPLC	J. T. Baker, Norveška
Octena kiselina	CH ₃ COOH	HPLC	Merck, Njemačka
Kalijev hidroksid	KOH	p.a.	Kemika, Hrvatska

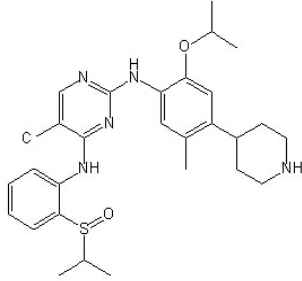
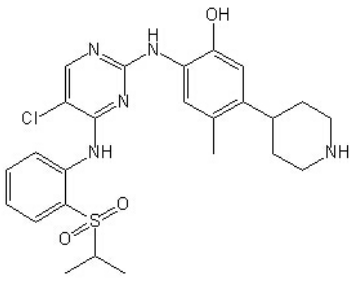
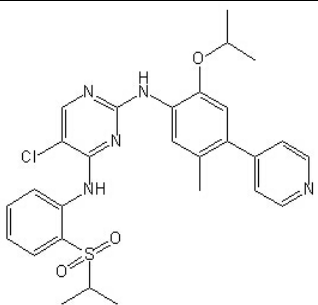
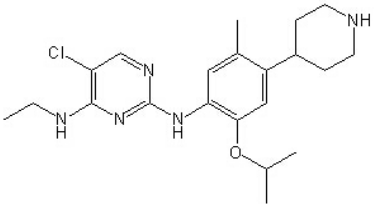
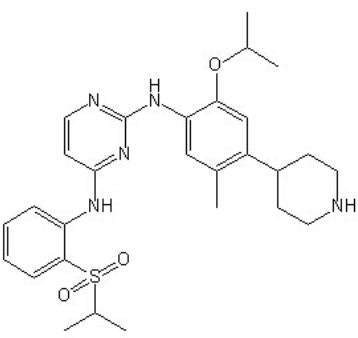
3.1.2 Ceritinib i onečišćenja

Osnovne karakteristike i svojstva ispitivanog farmaceutika dani su u *Tablici 2.*, dok su onečišćenja ceritiniba koja su korištena u eksperimentima prikazana u *Tablici 3*.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva ceritiniba

Naziv farmaceutika	Ceritinib
IUPAC-ov naziv	5-kloro-2-N-(5-metil-4-piperidin-4-il-2-propan-2-iloksifenil)-4-N-(2-propan-2-ilsulfonilfenil)pirimidin-2,4-diamin
CAS broj	1032900-25-6
Molekulska formula	C ₂₈ H ₃₆ ClN ₅ O ₃ S
Strukturna formula	 <p>The chemical structure of Ceritinib is a complex molecule. It features a central pyrimidine ring system. One nitrogen atom of the pyrimidine ring is substituted with a 4-(2-isopropylphenoxy)phenyl group. The other nitrogen atom is substituted with a 4-(2-isopropylphenyl)phenylsulfonamide group. Additionally, the pyrimidine ring has a chlorine atom at the 5-position and a methyl group at the 6-position. The 4-position of the pyrimidine ring is also substituted with a piperidin-4-yl group.</p>
Molekulska masa	558,1 g/mol

Tablica 3. Ceritinib onečišćenja

Oznaka	Proizvođač	Molekulska formula	Strukturna formula	Molarna masa
CRT IMP 1	Sinco Pharmachem INC.	$C_{28}H_{36}ClN_5O_2S$		542,14 g/mol
CRT IMP 2	Sinco Pharmachem INC.	$C_{25}H_{30}ClN_5O_3S$		516,07 g/mol
CRT IMP 4	Sinco Pharmachem INC.	$C_{28}H_{20}ClN_5O_3S$		552,10 g/mol
CRT IMP 7	Sinco Pharmachem INC.	$C_{21}H_{30}ClN_5O$		403,96 g/mol
CRT IMP 8	Sinco Pharmachem INC.	$C_{28}H_{37}N_5O_3S$		523,70 g/mol

3.1.3 Nepokretne faze korištene za razvoj HPLC metode

Pregled nepokretnih faza, odnosno kromatografskih kolona korištenih za razvoj HPLC metode prikazan je u *Tablici 4*.

Tablica 4. Kolone korištene za razvoj metode

Naziv	Nepokretna faza	Dimenzije
Waters SunFire C18	C18	150 x 4,6 mm, 3,5 μm
Waters XBridge C8	C8	150 x 4,6 mm, 3,5 μm
YMC – Pack Pro C8	C8	150 x 4,6 mm, 3 μm
Agilent Zorbax SB-CN	SB-CN	150 x 4,6 mm, 5 μm

3.2 INSTRUMENTI

3.2.1 Mikrovaga

Mikrovaga je vrlo precizan instrument koji služi za vaganje jako male količine uzorka. U ovom radu korištena je mikrovaga Mettler Toledo XPR2U čiji je raspon vaganja od 1 mg do 2,1 g, a minimalno očitavanje 0,1 μg . Sastoji se od dva digitalna zaslona i automatskog staklenog pokrova te priključenog printera za ispis rezultata.



Slika 6. Mikrovaga Mettler Toledo XPR2U

3.2.2 Analitička vaga

Analitička vaga Mettler Toledo XPE205 korištena je za vaganje većih količina uzorka jer je njeno radno područje 20 mg – 220 g. Ima minimalno očitavanje od 0,01 mg i sustav za otkrivanje elektrostatskog naboja unutar staklene komore za vaganje. Također se sastoji od digitalnog zaslona, automatske staklene komore i priključenog printera za ispis rezultata.



Slika 7. Analitička vaga Mettler Toledo XPE205

3.2.3 Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Za potrebe analize korišten je HPLC instrument proizvođača Agilent serije 1200 s DAD detektorom (*Slika 8*). Agilent serije 1200 je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti koji se sastoji od:

- degazera visoke djelotvornosti (engl. *high-performance degasser*)
- binarne pumpe (engl. *binary pump*)
- standardnog uređaja za uzorkovanje (engl. *standard autosampler*)
- termostiranog odjeljka za kolonu (engl. *thermostatted column compartment*)
- DAD detektora
- računalnog programa Empower 3 za prikupljanje i obradu podataka



Slika 8. HPLC instrument Agilent 1200

3.2.4 Ostali korišteni instrumenti:

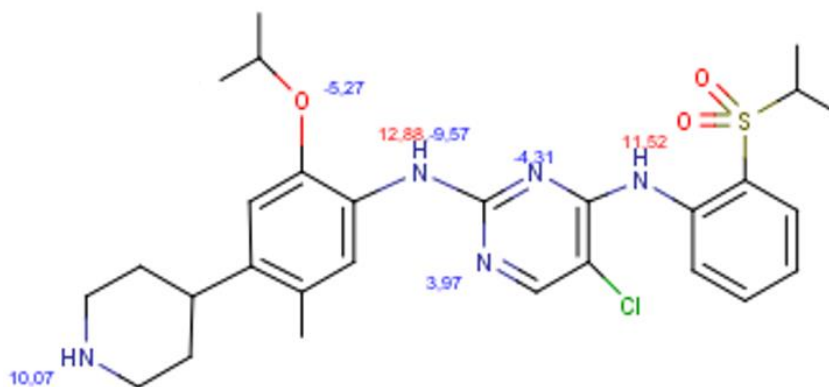
- **Tehnička vaga** – proizvođača Mettler Toledo, korištena za vaganje kemikalija za pripremanje pokretnih faza za HPLC instrument
- **MilliQ sustav za dobivanje visokopročišćene vode** – korišten pri bilo kojoj upotrebi vode, bilo za otapanje uzoraka, pripremanje pokretnih faza, razrjeđivanje itd.
- **Ultrazvučna kupelj** – korištena za lakše i brže otapanje uzoraka
- **pH-metar** – za određivanje pH-vrijednosti pri titraciji pokretnih faza

3.3 METODE RADA

3.3.1 Razvoj i optimizacija metode

3.3.1.1 Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje ceritiniba i onečišćenja

U programskom paketu MarvinSketch nacrtana je kemijska struktura ceritiniba (Slika 9) kako bi program dao uvid u optimalni pH vodene komponente (A) pokretne faze za odjeljivanje sastavnica. Putem strukture program izračunava koeficijent razdiobe ($\log D$) i pK_a analita i prikazuje u tabličnom, numeričkom i grafičkom obliku.



Slika 9. Struktura ceritiniba u MarvinSketch programu i pK_a -vrijednosti pojedinih skupina

3.3.1.2 Ispitivanje topljivosti ceritiniba i onečišćenja

Prije same pripreme otopina ispitana je topljivost ceritiniba i pet onečišćenja u raznim diluentima s različitim otapalima i omjerima. Topljivost analita ispitana je u smjesama acetonitrila i vode te metanola i vode. Za pomoć pri otapanju uzoraka korištena je ultrazvučna kupelj. Kao najpogodniji diluent izabrana je smjesa ACN:H₂O=1:1 (v/v).

3.3.1.3 Priprema otopina pokretnih faza

Pri odabiru pokretnih faza, za organsku komponentu pokretne faze (B) izabran je čisti acetonitril, dok je za vodenu komponentu (A) ispitivan 0,1% H₃PO₄, 5 mM amonij acetat pH=5,50 i 5 mM KH₂PO₄ pH=7,00. Za pripremu navedenih otopina korištena je tehnička vaga na kojoj su odvagane odgovarajuće kemikalije i otopljene u visokopročišćenoj vodi iz sustava MilliQ. Tako pripremljene otopine su titrirane odgovarajućom kiselinom ili lužinom uz

konstantno praćenje pH-vrijednosti na pH-metru. Na kraju, otopine su degazirne uz pomoć degazera u ultrazvučnoj kupelji.

3.3.1.4 Određivanje prikladne nepokretne faze

Za odabir nepokretne faze korištene su kromatografske kolone iz *Tablice 4*. Za ispitivanje kolona napravljena je rezolucijska otopina (engl. *resolution solution*, RS) na način da je odvagano 7 mg ceritiniba u tikvicu od 10 mL i otopljeno u radnoj standardnoj otopini onečišćenja (ISS) koja je na razini specifikacije od 0,15% nominalne koncentracije.

3.3.2 Validacija metode

3.3.2.1 Priprema otopina standarda

Otopina ceritiniba nominalne koncentracije 0,7 mg/mL pripravljena je vaganjem 7 mg ceritiniba na mikrovagi i otapanjem u tikvici volumena 10 mL u čistom diluentu.

Temeljna standardna otopina (engl. *stock solution*) ceritiniba ($\gamma=0,07$ mg/mL) pripravljena je vaganjem 7 mg ceritiniba u tikvicu od 100 mL i otapanjem u čistom diluentu. Standardna otopina ceritiniba pripravljena je uzimanjem alikvota od 1 mL iz temeljne standardne otopine ceritiniba i prenošenjem u tikvicu od 100 mL koja je zatim nadopunjena diluentom do oznake ($\gamma=0,0007$ mg/mL). QL otopina je pripravljena uzimanjem alikvota od 5 mL standardne otopine i razrjeđivanjem s diluentom u tikvici od 10 mL. Konačna koncentracija tako pripravljene QL otopine iznosila je 350 ppm.

Temeljna standardna otopina onečišćenja masene koncentracije $\gamma=0,035$ mg/mL pripravljena je vaganjem po 3,5 mg svakog od pet onečišćenja u tikvicu od 100 mL na mikrovagi i otapanjem u čistom diluentu. Radna standardna otopina onečišćenja (engl. *impurity standard solution*, ISS) masene koncentracije $\gamma=0,0011$ mg/mL pripravljena je razrjeđenjem temeljne standardne otopine onečišćenja tako da je uzet alikvot od 3 mL i prenesen u tikvicu od 100 mL te je tikvica nadopunjena do oznake diluentom (ACN:H₂O=1:1(v/v)).

3.3.2.2 Priprema otopina za ispitivanje linearnosti

Za ispitivanje linearnosti i odstupanja od linearnosti pripravljeno je 6 temeljnih standardnih otopina (Stock) masene koncentracije $\gamma=0,035$ mg/mL vaganjem 1,75 mg ceritiniba i pet definiranih onečišćenja u tikvicu od 50 mL. Prve tri otopine korištene su za pripremu pet otopina za ispitivanje linearnosti prema shemi u *Tablici 5*.

Tablica 5. Priprema otopine za ispitivanje linearnosti

Oznaka	γ [mg/mL]	% nominalne koncentracije uzorka	Priprema
L1=QL	0,00035	0,05	1 mL Stock 1 / 100 mL
L2	0,0005	0,07	3 mL Stock 2 / 200 mL
L3	0,0007	0,10	1 mL Stock 3 / 50 mL
L4	0,0011	0,15	3 mL Stock 2 / 100 mL
L5	0,0014	0,20	2 mL Stock 1 / 50 mL

Otopina DL-a pripravljena je razrjeđivanjem otopine L1 (QL) na način da je uzet alikvot od 3 mL QL otopine i razrjeđen u 10 mL diluenta.

Za provjeru odstupanja od linearnosti metode korištene su tri preostale otopine (Stock 4, Stock 5 i Stock 6) i iz njih su redom pripravljene otopine DVL1, DVL2 i DVL3 na način kao i otopine L1, L4 i L5.

3.3.2.3 Priprema otopina za ispitivanje ponovljivosti

Ispitivanje ponovljivosti provedeno je analizom standardnih otopina ceritiniba koje su pripravljene vaganjem 7 mg ceritiniba u tikvicu od 100 mL i nadopunom do oznake s diluentom (*stock solution*). Iz te otopine pripravljena je standardna otopina ceritiniba uzimanjem alikvota od 1 mL u tikvicu od 100 mL i nadopunom do oznake. Standardne otopine ceritiniba injektirani su 3 puta. Ponovljivost je ispitana sa šest testnih otopina koje su priređene otapanjem 7 mg ceritiniba u 10 mL čistog diluenta (ACN:H₂O=1:1 (v/v)) te sa šest testnih obogaćenih otopina priređenih otapanjem 7 mg ceritiniba u 10 mL radne standardne otopine onečišćenja (ISS) koncentracije 0,15% nominalne koncentracije (razina specifikacije).

3.3.2.4 Priprema otopina za ispitivanje točnosti

Za ispitivanje točnosti pripravljena je jedna otopina ceritiniba nominalne koncentracije i tri otopine ceritiniba nominalne koncentracije obogaćene otopinama pripremljenim za određivanje odstupanja od linearnosti analitičke metode. Odvagano je oko 7 mg uzorka u 4 tikvice volumena 10 mL te je sadržaj prve tikvice otopljen u čistom diluentu, a preostale tri tikvice nadopunjene su odgovarajućom otopinom kako je prikazano u *Tablici 6*. Svaka otopina injektirana je 3 puta.

Tablica 6. Priprema otopina za ispitivanje točnosti

Oznaka	Odvaga ceritiniba	Obogaćena otopina	Volumen tikvice
CRT non-spiked	7,0250 mg	-	10 mL
CRT QL-spiked	6,9994 mg	DVL1	10 mL
CRT 0,15% spiked	7,0093 mg	DVL2	10 mL
CRT 0,20% spiked	7,0118 mg	DVL3	10 mL

3.3.2.5 Priprema otopina za određivanje stabilnosti metode

Stabilnost unutar 24 sata praćena je za standardnu otopinu ceritiniba koncentracije $\gamma=0,0007$ mg/mL te otopinu ceritiniba nominalne koncentracije 0,7 mg/mL obogaćenu radnom otopinom onećišćenja na koncentraciji 0,15% nominalne koncentracije.

3.3.2.6 Ispitivanje robusnosti metode

U okviru ispitivanja robusnosti provjereno je kako promjena temperature kolone (25 °C i 35 °C), protoka pokretne faze (0,90 mL/min i 1,10 mL/min) i početnog sastava pokretne faze (15% B i 5% B) utječu na kritične značajke metode.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 RAZVOJ METODE

4.1.1 Odabir pogodnog otapala

Rezultati ispitivanja topljivosti uzorka ceritiniba i njegovih onečišćenja u raznim otapalima raznih volumnih omjera prikazani su u *Tablici 7*.

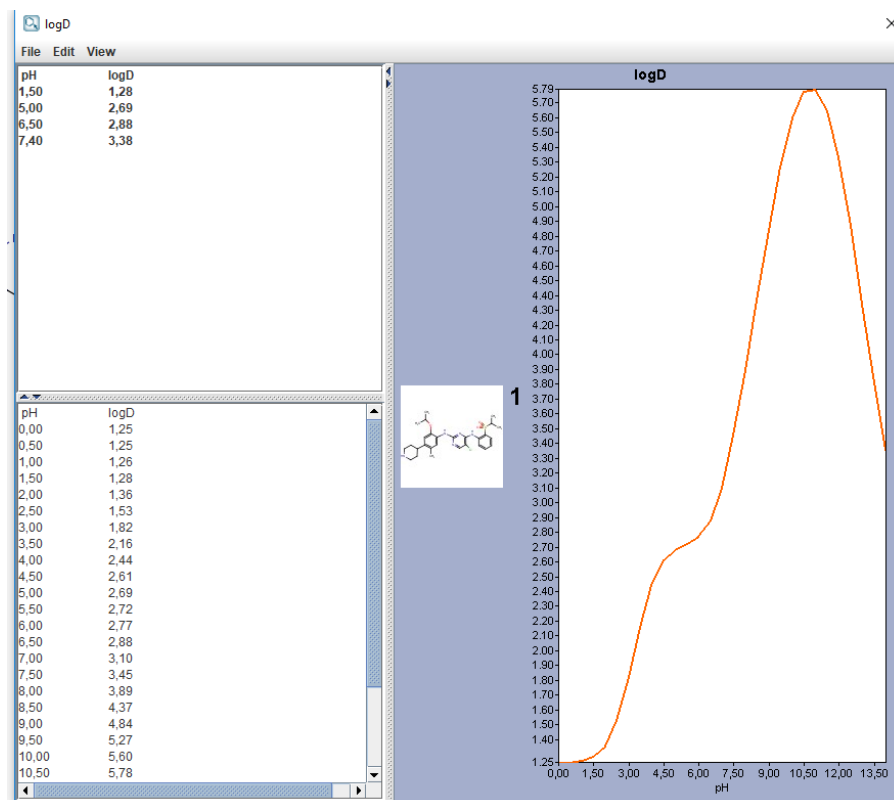
Tablica 7. Ispitivanje topljivosti ceritiniba i njegovih onečišćenja

Diluent	Topljivost	Odabir
H ₂ O:ACN=8:2 (v/v)	djelomična	-
H ₂ O:ACN=6:4 (v/v)	djelomična	-
H ₂ O:ACN=1:1 (v/v)	potpuna	+
H ₂ O:MeOH=8:2 (v/v)	potpuna	-

Analizom uzoraka u različitim diluentima kao najpogodnije otapalo pokazao se H₂O:ACN=1:1 (v/v) zbog lakoće pripreme te potpunog otapanja svih ispitivanih komponenti.

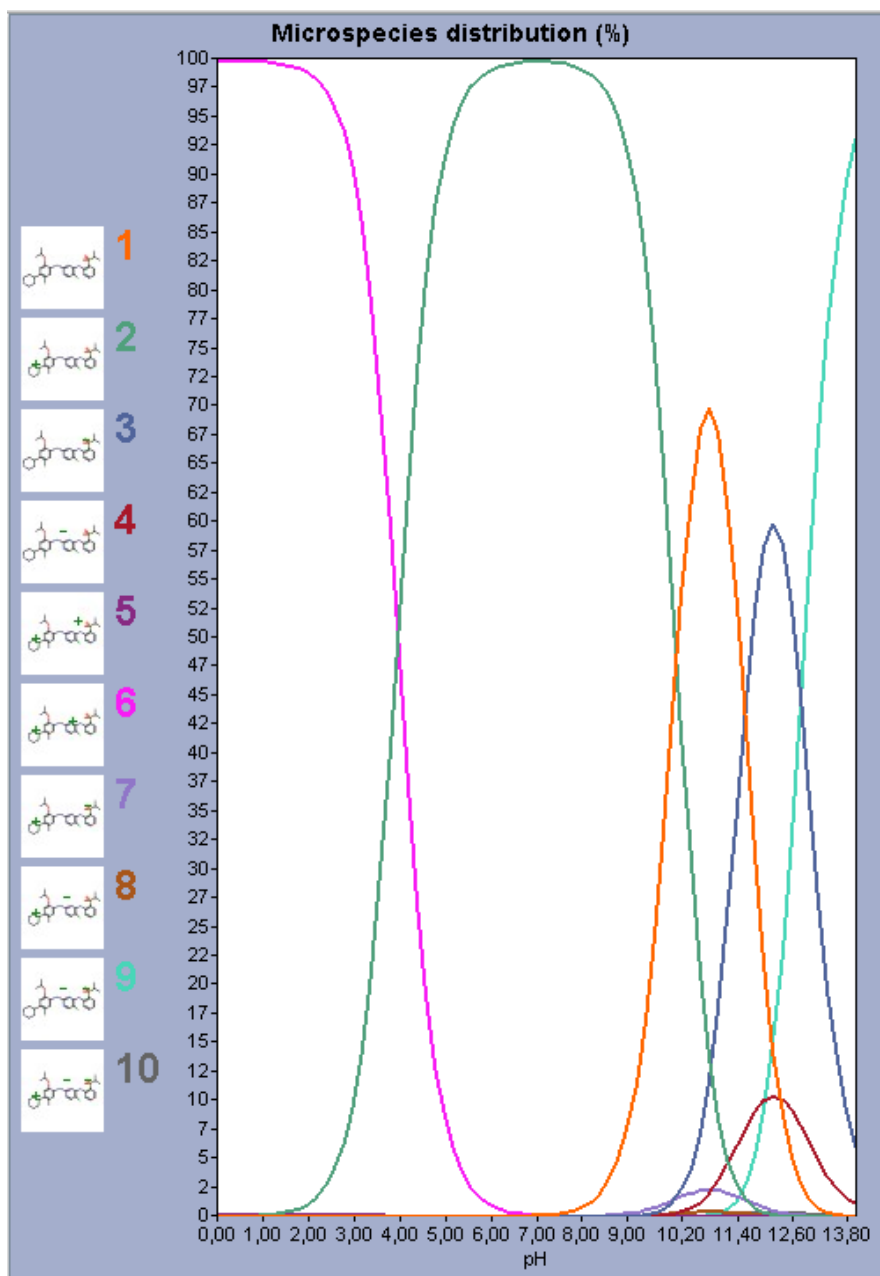
4.1.2 Odabir prikladne pH-vrijednosti pokretne faze

Pomoću programa Chemaxon koji podržava MarvinSketch program, moguće je odrediti prikladne pH-vrijednosti vodene komponente (A) pokretne faze preko ovisnosti koeficijenta razdiobe ($\log D$) ceritiniba o pH-vrijednosti. Za ravna područja $\log D$ vrijednosti očekuju se stabilna vremena zadržavanja. Ovisnost $\log D$ o pH za ceritinib prikazna je na *Slici 10*. Iz grafa vidimo kako su relativno ravna područja krivulje u području pH-vrijednosti 4,00 - 7,50 te u području niske pH-vrijednosti 1,00 – 2,50.



Slika 10. Ovisnost log D o pH-vrijednosti za ceritinib

Vrijednosti pK_a za ceritinib prikazane su na *Slici 11*. Iz slike se vidi da bi najbolje odjeljivanje bilo u područjima pH-vrijednosti 5,00 – 9,00 te 1,00 – 2,50.



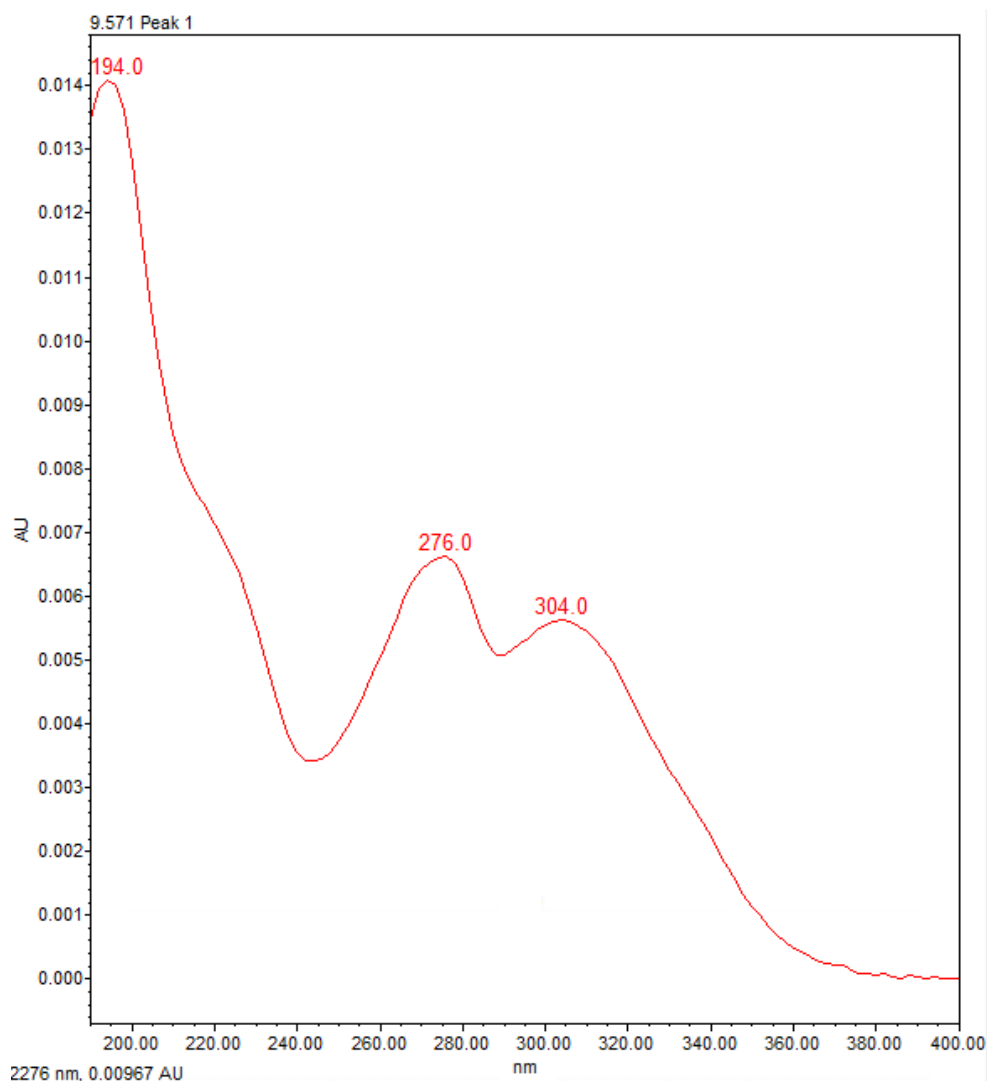
Slika 11. Ovisnost distribucije ionskih vrsta ceritiniba o pH-vrijednosti

Prema analizi log *D* i razdiobe ionskih vrsta ceritiniba u ovisnosti i pH-vrijednosti (*Slika 10.* i *Slika 11.*) izabrane su tri vodene komponente (A) pokretne faze koje su ispitane, a to su: 0,1% H₃PO₄ čija pH-vrijednost iznosi oko 2,20, 5 mM amonij acetat pH=5,50 i 5 mM KH₂PO₄ pH=7,00.

Korištenjem 5 mM KH₂PO₄ pH=7,00 dobiven je loš kromatogram s relativno velikim vremenima zadržavanja analita i malim pikovima, a između ostale dvije vodene komponente pokretne faze izabrana je 0,1% H₃PO₄ zbog veće simetričnosti pikova i lakše pripreme.

4.1.3 Odabir valne duljine detekcije

Na UV spektru ceritiniba (*Slika 12.*) mogu se uočiti tri vrha, odnosno tri moguće valne duljine snimanja pri kojoj ceritinib najbolje apsorbira UV zračenje i može se najlakše detektirati. Kako pri valnoj duljini od 196 nm apsorbiraju i druge tvari prisutne u pokretnoj fazi, odabrana vrijednost optimalne valne duljine detekcije je 276 nm.



Slika 12. Spektar valnih duljina ceritiniba

4.1.4 Odabir nepokretne faze

Testirano je četiri kromatografske kolone s različitim punjenjem: C-18 (Waters SunFire C18), C-8 (Waters XBridge C8 i YMC Pack Pro C8) i SB-CN (Agilent Zorbax SB-CN). Detaljan pregled kolona i dimenzija kolona nalazi se u *Tablici 4.* Za ispitivanje kolona injektiranja je rezolucijska otopina ceritiniba obogaćena sa svih 5 poznatih onečišćenja.

Ispitivanjem kolona najbolje odvajanje pikova i simetriju glavnog pika postignuto je na koloni Waters SunFire C18 te je ta kolona izabrana kao optimalna.

4.1.5 Odabrani optimalni uvjeti za validaciju metode

Prilikom razvoja analitičke metode, izborom nepokretne faze, odabirom prikladne pH-vrijednosti i sastava pokretne faze osiguran je optimalan izgled pikova onečišćenja i glavne komponente ceritiniba. Optimalni kromatografski uvjeti koji su dalje korišteni tijekom validacije metode prikazani su u *Tablici 8*. Analizirane su otopine ceritiniba i onečišćenja. Nominalna koncentracija ceritiniba određena je kao 0,7 mg/mL.

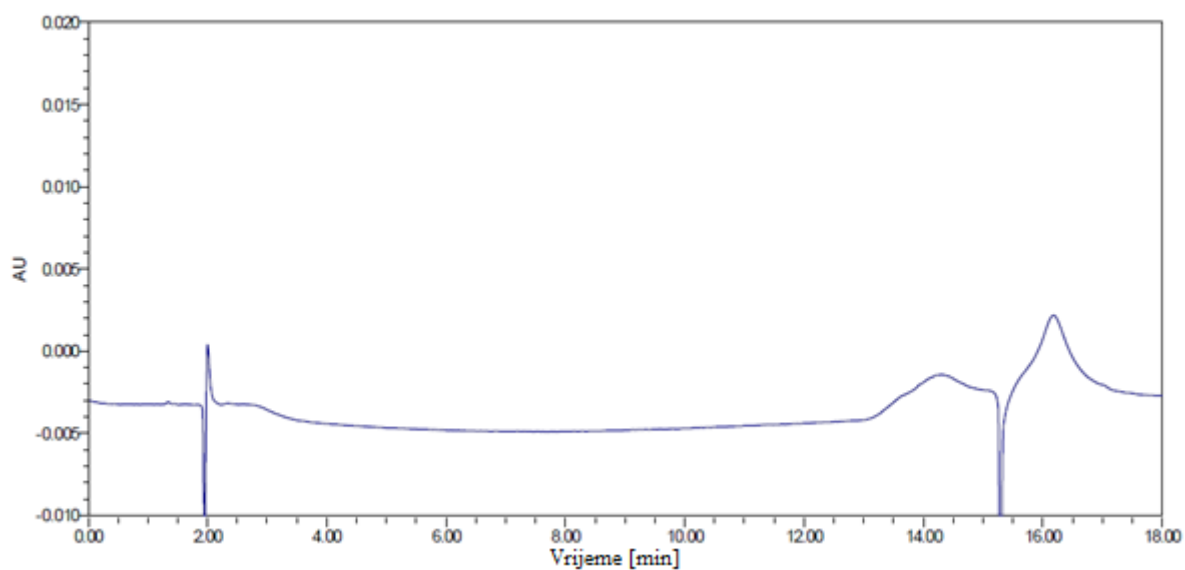
Tablica 8. Optimalni kromatografski uvjeti.

Kolona i pakiranje	Waters SunFire C18 150 x 4,6 mm, 3,5 µm		
Pokretna faza A	0,1 % H ₃ PO ₄ u H ₂ O		
Pokretna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme [min]	% A	% B
	0,00	90,0	10,0
	11,00	40,0	60,0
	12,00	10,0	90,0
	13,00	10,0	90,0
	13,01	90,0	10,0
	18,00	90,0	10,0
Vrijeme trajanja metode	18 min		
Volumen injektiranja	3,00 µL		
Protok	1,00 mL/min		
Detektor	DAD, 276 nm		
Temperatura kolone	30 °C		
Maksimalni tlak	400 bar		
Diluent	ACN:H ₂ O=1:1 (v/v)		

4.2 VALIDACIJA METODE

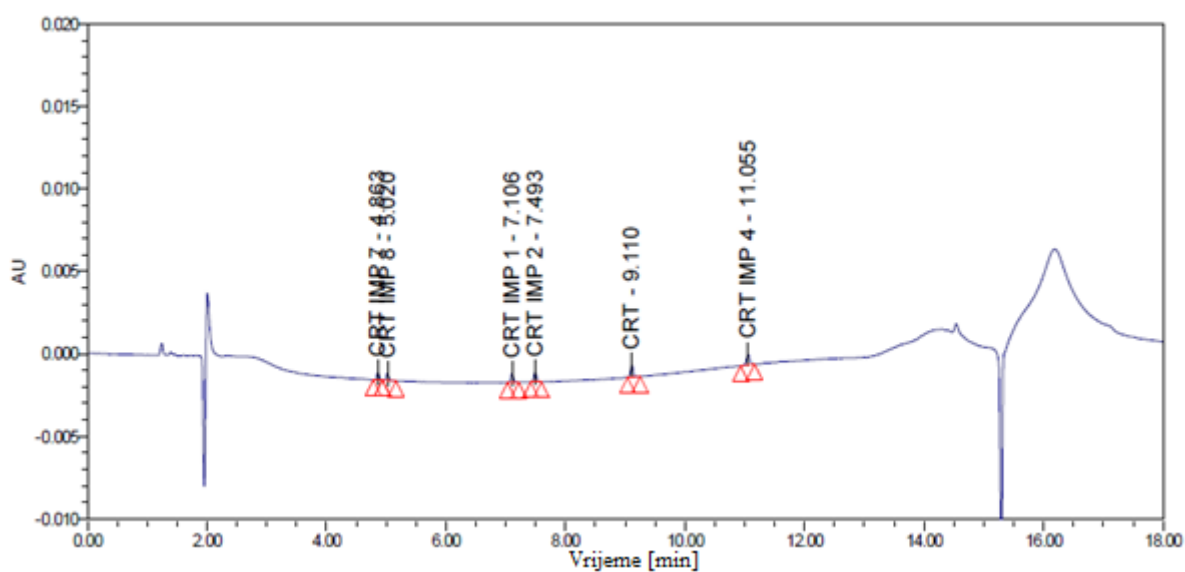
4.2.1 Specifičnost

Specifičnost metode određena je usporedbom kromatograma slijepe probe (diluenta), otopine QL-a, otopine DVL2 (0,15%), otopine uzorka ceritiniba te otopine ceritiniba obogaćenog otopinom DVL2 (Slike 13 – 17).

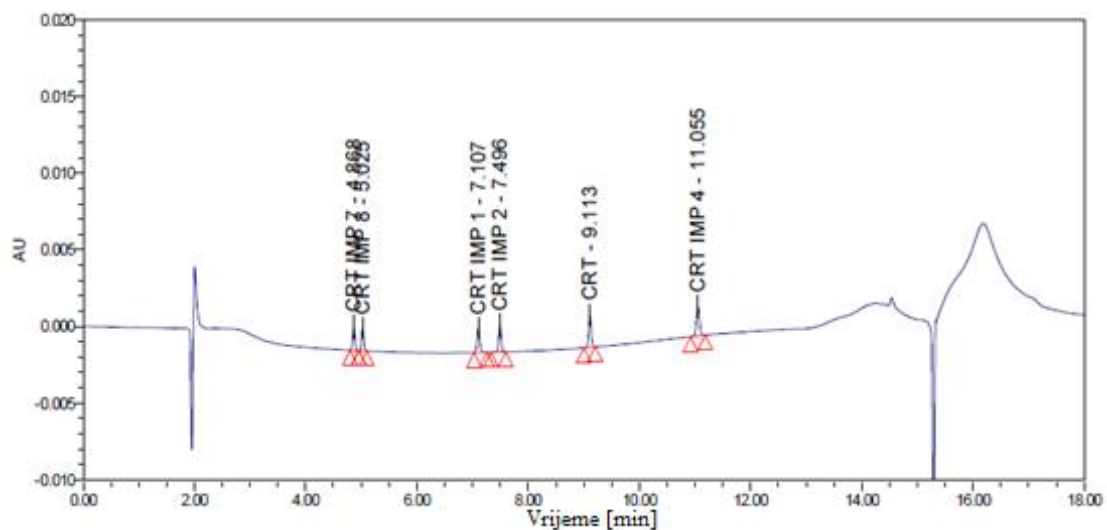


Slika 13. Kromatogram slijepe probe.

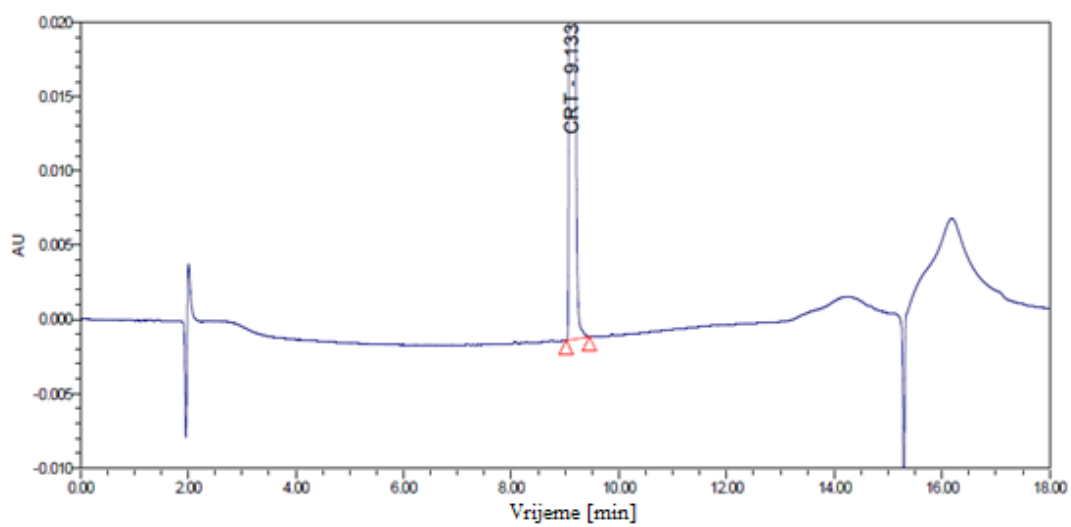
Na Slici 13. vidljivo je kako na kromatogramu slijepe probe nema kromatografskih pikova koji bi mogli interferirati u određivanju analita.



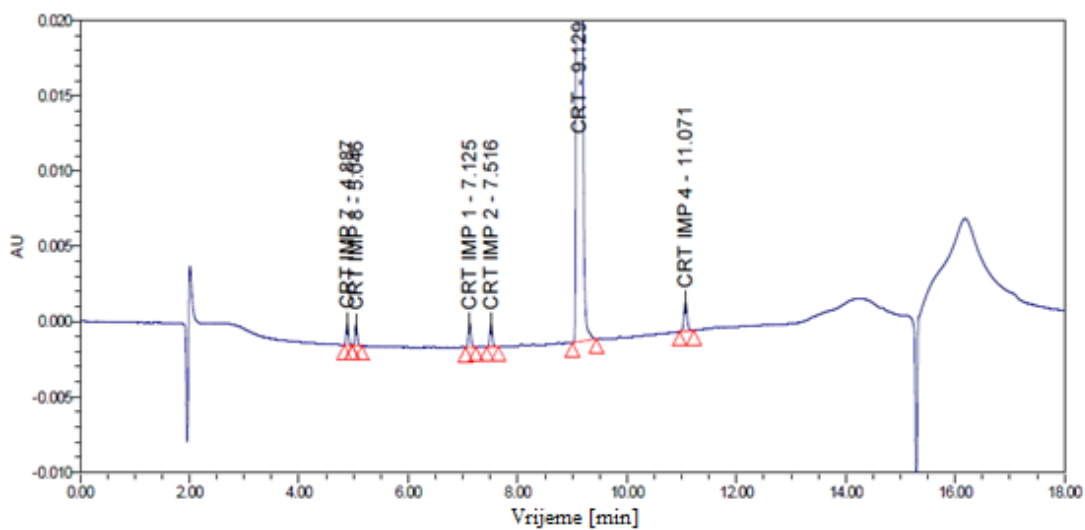
Slika 14. Kromatogram QL otopine.



Slika 15. Kromatogram DVL2 otopine.



Slika 16. Kromatogram otopine ceritiniba.



Slika 17. Kromatogram obogaćenog ceritiniba.

Iz dobivenih rezultata sa *Slika 14.* - *Slika 17.* može se zaključiti kako promjena koncentracije uzorka kao i obogaćivanje uzorka onečišćenjima znatno ne utječe na promjenu vremena zadržavanja (t_R) i da ne dolazi do interferencije drugih tvari tijekom analize. Na taj način je potvrđena specifičnost, odnosno selektivnost metode.

4.2.2 Linearnost

Linearnost metode ispitana je analizom pet otopina ceritiniba i njegovih onečišćenja u koncentracijskom području 0,05% - 0,20% od nominalne koncentracije uzorka. Za svaku otopinu određena je površina ispod kromatografskog pika te je nacrtan umjerni pravac iz kojeg je određen nagib pravca, odsječak i koeficijent determinacije R^2 . Rezultati ispitivanja linearnosti za ceritinib i onečišćenja prikazani su u *Tablici 9.*, a pripadajući umjerni pravci mogu se pronaći u poglavlju Prilozi na *Slikama P1.* - *P6.*

Tablica 9. Rezultati ispitivanja linearnosti metode.

Uzorak	R^2	Kriterij prihvatljivosti	Odsječak pri 0.15%	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljava uvjete (DA/NE)
CRT	0,9998	$R^2 > 0,990$	6,5	< 10%	DA
CRT IMP 1	0,9998		4,3		DA
CRT IMP 2	0,9986		5,7		DA
CRT IMP 4	0,9998		1,3		DA
CRT IMP 7	0,9907		1,9		DA
CRT IMP 8	0,9900		3,4		DA

4.2.3 Preciznost

Ponovljivost metode ispitana je u sklopu preciznosti analitičke metode. U šest otopina ceritiniba koji nisu bili obogaćeni onečišćenjima, već samo otopljeni u čistom diluentu nije bilo nikakvih tragova (pikova) poznatih onečišćenja. Za šest obogaćenih otopina ceritiniba izračunata su iskorištenja te uspoređena s kriterijem prihvatljivosti koji iznosi 80-120%. Prije izračuna iskorištenja za potrebu proračuna izračunate su vrijednosti relativnog faktora odziva (engl. *Relative Response Factor*, RRF) pomoću nagiba dobivenih umjernih pravaca u

ispitivanju linearnosti metode. Relativni faktor odziva računa se kao omjer nagiba pravca (RF) onečišćenja i nagiba pravca (RF) djelatne tvari, tj. ceritiniba.

Tablica 10. Izračunati relativni faktori odziva za svako onečišćenje.

	CRT	IMP 1	IMP 2	IMP 4	IMP 7	IMP 8
RF	6084565	4679344	5131796	7154443	4144322	3752712
RRF	1,00	0,77	0,84	1,18	0,68	0,62

Iskorištenje za svako onečišćenje računa se prema formuli:

$$R = \frac{c_{imp} (računska)}{c_{imp} (stvarna)} \cdot 100\% \quad (3)$$

Stvarna koncentracija onečišćenja određena je iz odvage onečišćenja u radnoj otopini onečišćenja s kojom je uzorak ceritiniba bio obogaćen, dok je računski koncentracija onečišćenja određena uz pomoć standarda ceritiniba prema formuli:

$$c_{imp} (rač.) = \frac{(A_{imp} (obogaćeni) - A_{imp} (neobogaćeni))}{\overline{RF}_{STD}} \cdot \frac{1}{RRF_{imp}} \quad (4)$$

Srednja vrijednost faktora odziva standarda (\overline{RF}_{STD}) određena je kao prosjek faktora odziva svakog pojedinog standarda. Faktor odziva standarda izračunat je kao omjer površine ispod pika standarda (A) i koncentracije standarda (RF=A/c). Površina ispod pika onečišćenja u neobogaćenom uzorku ($A_{imp} (neobogaćeni)$) iznosi nula, jer kako je prethodno navedeno, u uzorcima ceritiniba otopljenim u diluentu nisu detektirani pikovi onečišćenja. Rezultati ispitivanja ponovljivosti prikazani su u *Tablicama 11. - 16.*

Tablica 11. Podaci dobiveni za standarde ceritiniba

Standard 1			Standard 2		
c [mg/mL]	0,00070307		c [mg/mL]	0,00070507	
t_R [min]	A	RF	t_R [min]	A	RF
9,140	4620	6571180,7	9,145	4252	6030606,9
9,142	4646	6608161,4	9,144	4267	6051881,4
9,144	4718	6710569,4	9,145	4243	6017842,2
	\overline{RF}			6331706,98	
	RSD [%]			5,2	

Tablica 12. Rezultati ponovljivosti za CRT IMP-1

c_{imp} u ISS [mg/mL]	1,0454E-03				
t_R [min]	A	A (neobogaćeni)	c_{imp} (rač.) [mg/mL]	RRF	Iskorištenje R [%]
7,144	5135	0,00	1,0532E-03	0,77	100,75
7,147	5129	0,00	1,0520E-03	0,77	100,63
7,142	4993	0,00	1,0241E-03	0,77	97,97
7,146	5002	0,00	1,0260E-03	0,77	98,14
7,146	5205	0,00	1,0676E-03	0,77	102,13
7,148	5053	0,00	1,0364E-03	0,77	99,14
\bar{R} [%]					99,8
SD:					1,65
RSD [%]					1,6

Tablica 13. Rezultati ponovljivosti za CRT IMP-2

c_{imp} u ISS [mg/mL]	1,0519E-03				
t_R [min]	A	A (neobogaćeni)	c_{imp} (rač.) [mg/mL]	RRF	Iskorištenje R [%]
7,530	5606	0,00	1,0540E-03	0,84	100,20
7,533	5518	0,00	1,0375E-03	0,84	98,63
7,528	5594	0,00	1,0518E-03	0,84	99,99
7,531	5663	0,00	1,0647E-03	0,84	101,22
7,530	5161	0,00	9,7036E-04	0,84	92,25
7,531	5577	0,00	1,0486E-03	0,84	99,68
\bar{R} [%]					98,7
SD:					3,25
RSD [%]					3,3

Tablica 14. Rezultati ponovljivosti za CRT IMP-4

c_{imp} u ISS [mg/mL]	1,0523E-03				
t_R [min]	A	A (neobogaćeni)	c_{imp} (rač.) [mg/mL]	RRF	Iskorištenje R [%]
11,092	7770	0,00	1,0400E-03	1,18	98,82
11,094	7913	0,00	1,0591E-03	1,18	100,64
11,091	7504	0,00	1,0044E-03	1,18	95,44
11,094	7605	0,00	1,0179E-03	1,18	96,73
11,096	7952	0,00	1,0643E-03	1,18	101,14
11,096	7705	0,00	1,0313E-03	1,18	98,00
\bar{R} [%]					98,5
SD:					2,21
RSD [%]					2,2

Tablica 15. Rezultati ponovljivosti za CRT IMP-7

$c_{imp\ u\ ISS}$ [mg/mL]	1,0594E-03				
t_R [min]	A	A (neobogaćeni)	c_{imp} (rač.) [mg/mL]	RRF	Iskorištenje R [%]
4,893	4387	0,00	1,0189E-03	0,68	96,18
4,893	4432	0,00	1,0294E-03	0,68	97,17
4,891	4389	0,00	1,0194E-03	0,68	96,23
4,893	4440	0,00	1,0312E-03	0,68	97,34
4,891	4419	0,00	1,0263E-03	0,68	96,88
4,892	4457	0,00	1,0352E-03	0,68	97,72
\bar{R} [%]					96,9
SD:					0,62
RSD [%]					0,6

Tablica 16. Rezultati ponovljivosti za CRT IMP-8

$c_{imp\ u\ ISS}$ [mg/mL]	1,0391E-03				
t_R [min]	A	A (neobogaćeni)	c_{imp} (rač.) [mg/mL]	RRF	Iskorištenje R [%]
5,049	4159	0,00	1,0594E-03	0,62	101,95
5,050	4138	0,00	1,0541E-03	0,62	101,44
5,048	4207	0,00	1,0717E-03	0,62	103,13
5,050	4147	0,00	1,0564E-03	0,62	101,66
5,047	4223	0,00	1,0757E-03	0,62	103,52
5,048	4189	0,00	1,0671E-03	0,62	102,69
\bar{R} [%]					102,4
SD:					0,84
RSD [%]					0,8

Kriterij prihvatljivosti za ispitivanje ponovljivosti je da iskorištenje mora biti 80-120% te da RSD vrijednosti ne smije biti veći od 10%. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da je potvrđena ponovljivost.

4.2.4 Točnost

U svrhu ispitivanja točnosti analizirane su otopine svih onečišćenja i ceritiniba poznatih koncentracija pri tri koncentracije unutar radnog područja metode, na koncentraciji 0,05%, 0,15% i 0,20% od nominalne koncentracije. Za svaku koncentraciju izvršena su tri mjerenja. Određeno je iskorištenje (engl. *recovery*, *R*) kao omjer srednjih vrijednosti površina ispod

pikova u obogaćenom uzorku i srednjih vrijednosti površina u radnoj standardnoj otopini onečišćenja za definirane razine te je iznos izražen u postotku (*Tablica 17.*).

Tablica 17. Rezultati ispitivanja točnosti metode

Onečišćenje	Iskorištenje razina 0.05%	Kriterij prihvatljivosti	Iskorištenje razina 0.15% i 0.20%	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljava (DA/NE)
CRT IMP-1	98,7%	70-130%	100,9% i 100,4%	80-120%	DA
CRT IMP-2	105,7%		100,1% i 100,5%		DA
CRT-IMP-4	103,4%		99,4% i 99,7%		DA
CRT IMP-7	103,1%		100,0% i 101,6%		DA
CRT IMP-8	108,2%		101,4% i 102,0%		DA

4.2.5 Granica detekcije

Granica detekcije (DL) definirana je pri koncentraciji 30% od koncentracije QL-a, odnosno pri koncentraciji 0,015% od nominalne koncentracije ceritiniba. Otopina DL-a je injektirana tri puta. Odnos visine kromatografskih pikova i šuma bazne linije (S/N) u otopini za ispitivanje granice detekcije prikazan je u *Tablici 18.*

Tablica 18. Rezultati ispitivanja granice detekcije otopine

Uzorak	Injektiranje br. 1	Injektiranje br. 2	Injektiranje br. 3	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljava kriterij (DA/NE)
CRT	30	23	21	≥ 3	DA
CRT IMP-1	8	8	10	≥ 3	DA
CRT IMP-2	9	10	11	≥ 3	DA
CRT-IMP-4	10	11	13	≥ 3	DA
CRT IMP-7	7	7	9	≥ 3	DA
CRT IMP-8	6	7	8	≥ 3	DA

4.2.6 Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije (QL) u metodi za analizu onečišćenja ceritiniba je 0.05% od nominalne koncentracije uzorka (0,7 mg/mL). Uzorak otopine QL-a je injektiran 6 puta, a iz pravca linearosti za svaku od komponenata je izračunana točnost, te preciznost između injektiranja.

Odnos visine kromatografskih pikova i šuma bazne linije (S/N) u otopini za ispitivanje granice kvantifikacije prikazan je u *Tablici 19*.

Tablica 19. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije otopine

Uzorak	Inj. br. 1	Inj. br. 2	Inj. br. 3	Inj. br. 4	Inj. br. 5	Inj. br. 6	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljava (DA/NE)
CRT	42	45	43	38	31	44	≥ 10	DA
CRT IMP-1	31	31	31	27	24	33	≥ 10	DA
CRT IMP-2	35	36	35	32	26	37	≥ 10	DA
CRT-IMP-4	37	38	38	34	28	41	≥ 10	DA
CRT IMP-7	26	28	26	24	20	28	≥ 10	DA
CRT IMP-8	24	24	25	21	18	25	≥ 10	DA

Rezultati ispitivanja točnosti na granici kvantifikacije prikazani su u *Tablici 20*.

Tablica 20. Rezultati točnosti na razini granice kvantifikacije otopine

Uzorak	Iskorištenje na QL razini [%]	Kriterij prihvatljivosti	RSD[%]	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljava (DA/NE)
CRT	96,0	80,0-120,0%	1,1	10%	DA
CRT IMP-1	99,5		4,5		DA
CRT IMP-2	90,1		2,0		DA
CRT-IMP-4	102,7		4,8		DA
CRT IMP-7	99,6		2,6		DA
CRT IMP-8	95,7		1,0		DA

Rezultati ispitivanja preciznosti, odnosno ponovljivosti na granici kvantifikacije prikazani su u *Tablici 21.*

Tablica 21. Rezultati preciznosti na razini QL-a

Uzorak	Iskorištenje na QL razini [%]	Kriterij prihvatljivosti	RSD[%]	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljava (DA/NE)
CRT	100,1	80,0-120,0%	2,9	10%	DA
CRT IMP-1	97,4		4,1		DA
CRT IMP-2	96,2		1,5		DA
CRT-IMP-4	100,3		2,6		DA
CRT IMP-7	93,4		1,3		DA
CRT IMP-8	90,3		3,8		DA

4.2.7 Radno područje

Radno područje metode definirano je intervalom unutar kojeg se djelatna tvar i onečišćenja u uzorku mogu kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuće kriterije linearnosti, preciznosti i točnosti. Radno područje ove metode bi stoga bilo od 0,05% nominalne koncentracije uzroka do 0,20% nominalne koncentracije. Uzevši u obzir nominalnu koncentraciju uzorka od $\gamma=0,7$ mg/mL, preračunato na ppm, radno područje metode je 350 ppm - 1400 ppm.

4.2.8 Stabilnost

Stabilnost standardne otopine uzorka ceritiniba i stabilnost obogaćenih uzoraka ispitana je ostavljanjem pripremljenih otopina u začepljenim prozirnim volumetrijskim tikvicama 24 sata na sobnoj temperaturi. Za standardne otopine uzorka ceritiniba izračunat je prosječni faktor odziva (RF) za standarde stare 24 sata i nove standarde. Svaka proba starog standarda je injektirana jednom, dok su probe novih standarda injektirane tri puta. Relativna razlika RF-vrijednosti starih i novih standarda izračunata prema formuli (1):

$$\text{Relativna razlika} = \frac{|RF_{stari} - RF_{novi}|}{\left(\frac{RF_{stari} + RF_{novi}}{2}\right)} \cdot 100\% \quad (5)$$

iznosi 9,62% što zadovoljava kriterij jer je dopuštena maksimalna vrijednost 10%. Dobivene vrijednosti za standardne otopine ceritiniba prikazane su u *Tablici 22*.

Tablica 22. Rezultati ispitivanja stabilnosti standardne otopine

Oznaka	<i>m</i> [mg]	<i>V</i> [mL]	γ [mg/mL]	Površina	RF	\overline{RF}	RSD [%]
STD1 stari 1x	7,0682	100	0,0007	4921	6999303,057	6971647,217	0,6%
STD1 stari 2x	7,0797	100	0,0007	4896	6943991,377		
STD1 novi 1x	7,0307	100	0,0007	4620	6571180,679	6331706,975	5,2%
				4646	6608161,35		
				4718	6710569,36		
STD2 novi 2x	7,0507	100	0,0007	4252	6030606,89		
				4267	6051881,373		
				4243	6017842,2		

Za potvrdu stabilnosti obogaćenog uzorka preko dobivenih površina ispod pikova onečišćenja u radnoj otopini onečišćenja i dobivenih površina ispod pikova onečišćenja u obogaćenoj otopini ceritiniba izračunato je iskorištenje. Rezultati su prikazani u *Tablici 23*.

Tablica 23. Rezultati ispitivanja stabilnosti obogaćenog uzorka ceritiniba

Uzorak	Površina ispod pika u radnoj otopini onečišćenja	Površina ispod pika u uzorku	Površina ispod pika u obogaćenom uzorku	Iskorištenje [%]
IMP1	5111	0	5135	101,37
	5152	0	5129	
	5203	0	4993	
IMP2	5569	0	5606	99,53
	5486	0	5518	
	5585	0	5594	
IMP4	7708	0	7770	99,26
	7722	0	7913	
	7586	0	7504	
IMP7	4435	0	4387	101,03
	4435	0	4432	
	4474	0	4389	
IMP8	4144	0	4159	101,87
	4275	0	4138	
	4319	0	4207	

Kako je kriterij prihvatljivosti iskorištenja 80-120 % ovime je dokazana stabilnost svih otopina tijekom 24 sata.

4.2.9 Robusnost

Robusnost metode je sposobnost metode da ostane prikladna za namijenjenu upotrebu nakon sitnih, nenamjernih varijacija eksperimentalnih uvjeta koji se očekuju u redovnoj primjeni metode. Ispituje se namjernim uvođenjem takvih, očekivanih promjena eksperimentalnih uvjeta, te provjerom utjecaja uvedenih varijacija na kromatografsko razlučivanje. Ispitivanje robusnosti provedeno je s otopinom QL-a ceritiniba koncentracije 0,05% nominalne, otopinom standarda ceritiniba koncentracije 0,10% nominalne te rezolucijskom otopinom, odnosno uzorkom ceritiniba nominalne koncentracije 0,7 mg/mL obogaćen sa otopinom onečišćenja koncentracije 0,15% nominalne koncentracije. U *Tablici 24.* prikazane su varijacije eksperimentalnih uvjeta tijekom ispitivanja robusnosti, a u *Tablici 25.* prikazani su vremena zadržavanja i površine ispod pikova određeni nakon promjene eksperimentalnih uvjeta. Za početne uvjete uzete su srednje vrijednosti t_R i A . Kromatogrami ispitivanja robusnosti nalaze se u poglavlju Prilozi na *Slikama P7. - P12.*

Tablica 24. Namjerne varijacije eksperimentalnih uvjeta

Temperatura kolone	Protok	Početni sastav pokretne faze
25 °C	0,90 mL/min	15% B
35 °C	1,10 mL/min	5% B

Tablica 25. Rezultati ispitivanja robusnosti

Parametar		Uzorak	t_R	A
Početni uvjeti (temp. kolone=30 °C; protok=1,0 mL/min)		QL (0,05%)	9,112	2423
		STD (0,10%)	9,142	4661
		RS	9,129	4461049
Temperatura kolone	25 °C	QL (0,05%)	9,150	2736
		STD (0,10%)	9,148	5131
		RS	9,107	4507637
	35 °C	QL (0,05%)	9,104	2487
		STD (0,10%)	9,102	4911
		RS	9,099	4516434
Protok	0,90 mL/min	QL (0,05%)	9,511	2892
		STD (0,10%)	9,510	5336
		RS	9,511	5004719
	1,10 mL/min	QL (0,05%)	8,835	2404
		STD (0,10%)	8,836	4575
		RS	8,827	4093817
Početni sastav pokretne faze	15% B	QL (0,05%)	8,536	2644
		STD (0,10%)	8,536	5212
		RS	8,532	4510530
	5% B	QL (0,05%)	9,618	2403
		STD (0,10%)	9,616	5024
		RS	9,615	4523714

Iz dobivenih rezultata prikazanih u *Tablici 25.* možemo vidjeti kako promjena temperature kolone ne utječe uvelike na kromatografske parametre, dok promjena protoka i promjena pokretne faze utječu na vrijeme zadržavanja. Smanjenjem protoka i udjela organske komponente (B) u pokretnoj fazi povećava se vrijeme zadržavanja ceritiniba, te povećanjem protoka i udjela organske komponente (B) pokretne faze t_R se smanjuje. Variranjem eksperimentalnih uvjeta nisu uočene promjene u obliku kromatografskih pikova kao ni značajne promjene površina ispod pikova. Prema tome može se zaključiti da je metoda robusna na male varijacije kromatografskih uvjeta.

4.3 SAŽETAK REZULTATA

U *Tablici 26.* sažeto su prikazani svi rezultati validacije razvijene metode.

Tablica 26. Sažetak rezultata validacije metode

Izvedbena karakteristika	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat	Zadovoljava kriterij (DA/NE)
Specifičnost	-	<i>Slika 13.- Slika 17.</i>	DA
Linearnost			
Koeficijent determinacije	$R^2 \geq 0,990$	0,9900 – 0,9998	DA
RSD	$RSD \leq 10\%$	1,3% – 6,5%	DA
Ponovljivost			
RSD STD	$RSD \leq 10\%$	5,2%	DA
Iskorištenje	80% – 120%	96,9% - 102,4%	DA
RSD	$RSD \leq 10\%$	0,6% - 3,3%	DA
Točnost			
Iskorištenje	za QL: 70 – 130% ; za veće konc.: 80 – 120%	za QL: 98,7% - 108,2% za veće konc.: 99,4% - 102,0%	DA
Granica detekcije			
S/N	$S/N \geq 3$	7 - 30	DA
Granica kvantifikacije			
S/N	$S/N \geq 10$	18 - 45	DA
Iskorištenje	80% - 120%	90,1% - 102,7%	DA
RSD	$RSD \leq 10\%$	1,0% - 4,8%	DA
Stabilnost			
STD	Relativna razlika $\leq 10\%$	9,62%	DA
Obogaćeni uzorak	Iskorištenje 80% - 120%	99,26% - 101,87%	DA
Robusnost	-	<i>Tablica 25. i Slika P7. – Slika P12.</i>	DA

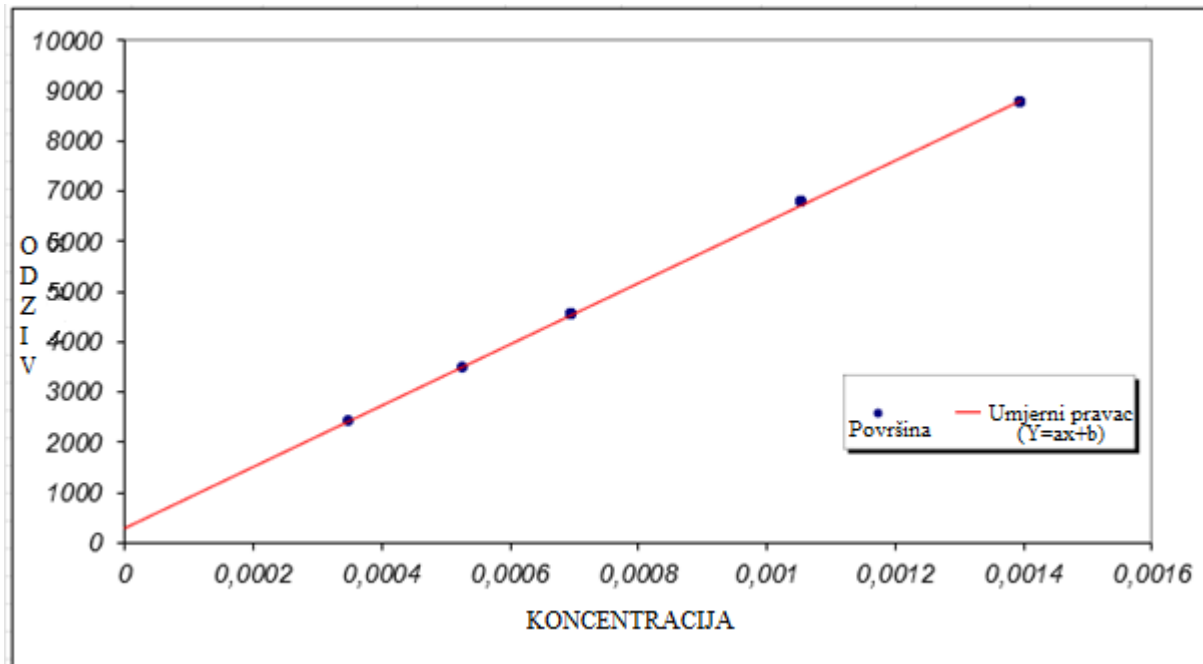
5 ZAKLJUČAK

Razvijena je kromatografska metoda na instrumentu za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) sa detektorom s nizom dioda (DAD) za određivanje ceritiniba i njegovih onečišćenja te su određeni optimalni uvjeti koji su dali dobro razdvajanje osnovne komponente od onečišćenja. Validacijom metode je provjerena i potvrđena primjenjivost metode za navedenu namjenu. Granica kvantifikacije iznosi 0,05% nominalne koncentracije uzorka, odnosno 350 ppm. Granica detekcije iznosi 0,015% nominalne koncentracije, odnosno 105 ppm. Dokazana je stabilnost standardne otopine ceritiniba u vremenu od 24 sata. Metoda je linearna u radnom području 0,05% - 0,20% od nominalne koncentracije. U istom tom radnom području dokazano je da je metoda ponovljiva, točna i robusna.

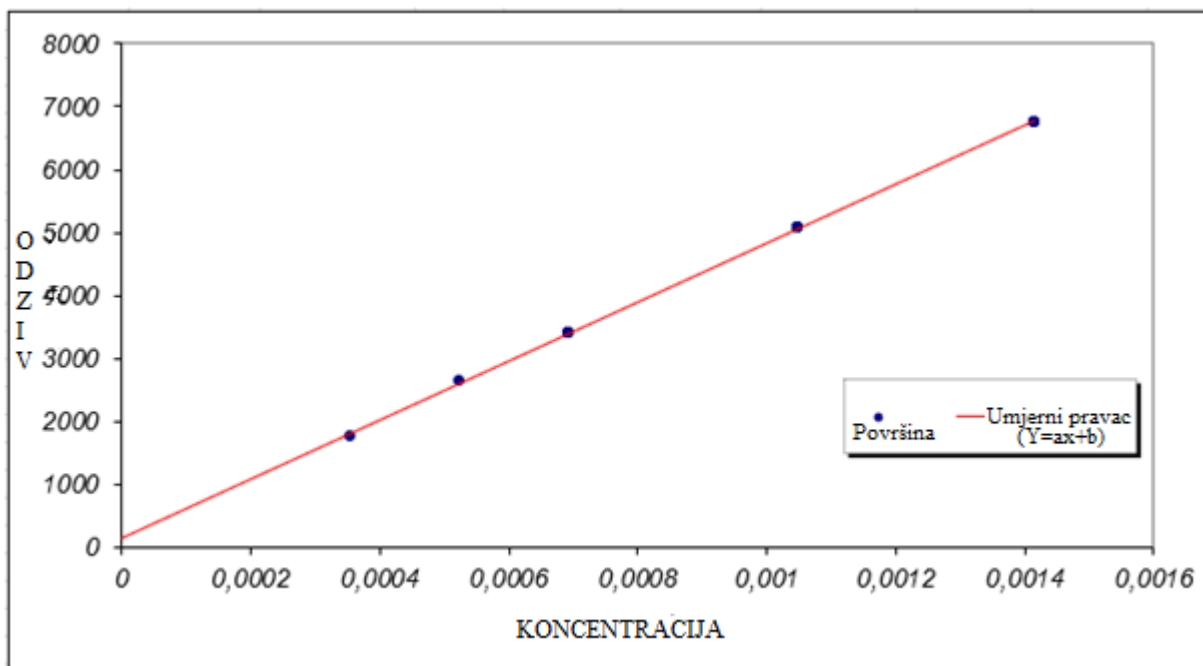
6 LITERATURA

- [1] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ceritinib> / (pristup 9. kolovoza 2022.).
- [2] A. T. Shaw, B. Solomon, Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer, *Clinical Cancer Research*, 17 (8) (2011) 2081-2086.
- [3] D. Jacobson-Kram, T. McGovern, Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (1) (2007) 38-42.
- [4] B. Nigović, M. Sertić, Onečišćenja u lijekovima, *Farmaceutski glasnik*, 68 (2012) 77-88.
- [5] <http://www.sincopharmachem.com/> (pristup 17. kolovoza 2022.).
- [6] D. Ašperger, S. Babić, T. Bolanča, D. Mutavdžić Pavlović, Š. Ukić, Kromatografska analiza u sustavu kvalitete analitičkog procesa u Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, *Kemija u industriji* 68 (9-10) (2019) 535-546.
- [7] F. Rouessac, A. Rouessac, *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, John Wiley & Sons, 2007, str. 3-83.
- [8] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, 2010, str. 23 - 166.
- [9] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH Topic Q 2 (R1), 1995.
- [10]] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, 2010, str. 531 - 542.

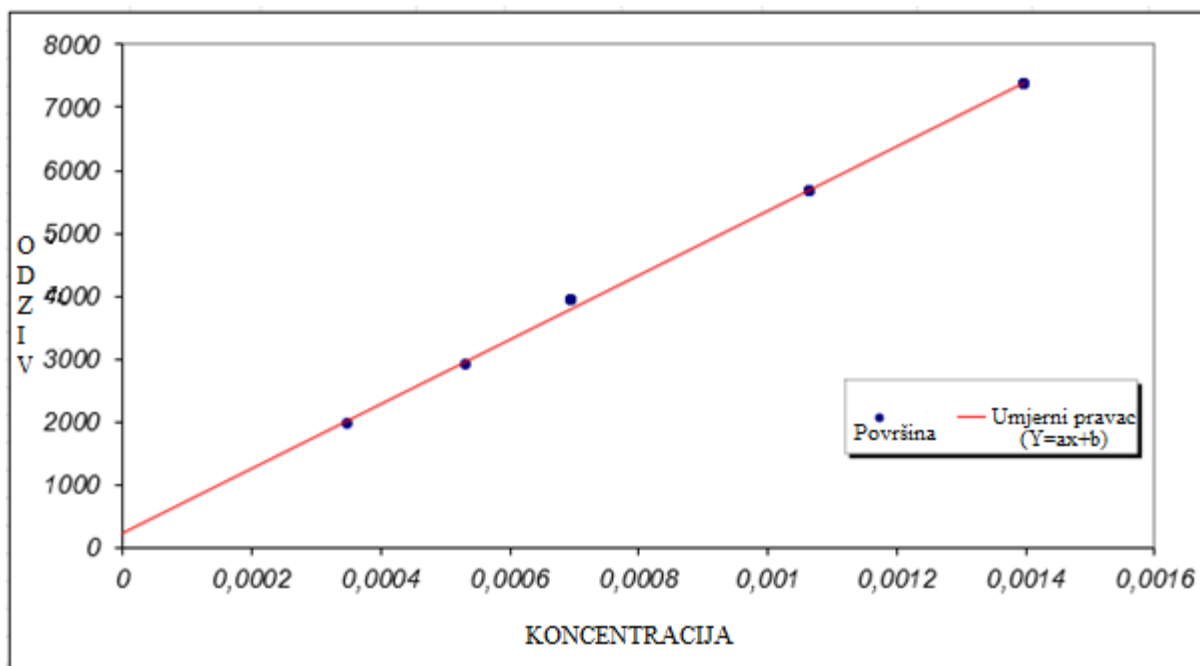
7 PRILOZI



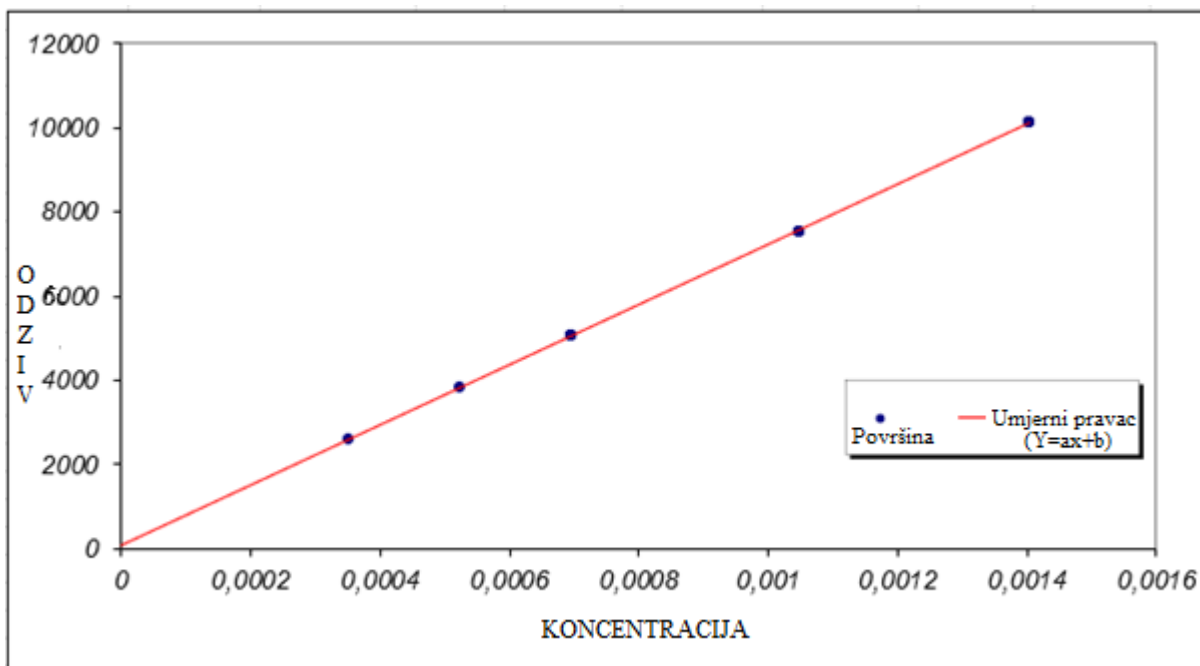
Slika P1. Umjerni pravac za CRT



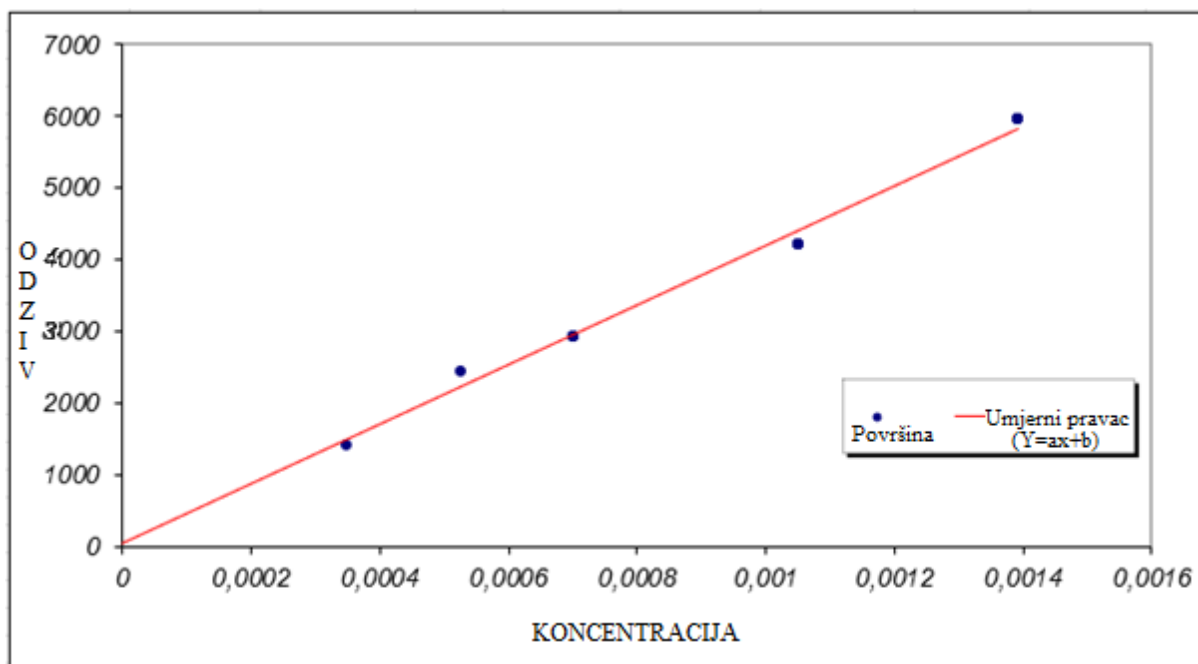
Slika P2. Umjerni pravac za CRT IMP-1.



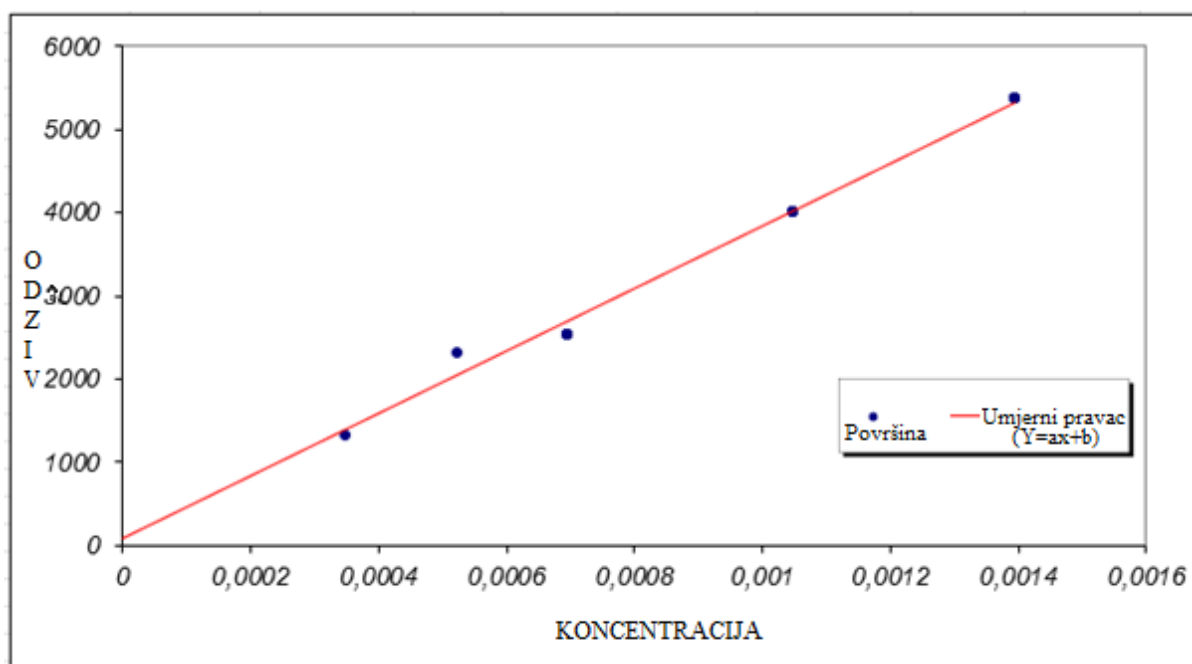
Slika P3. Umjerni pravac za CRT IMP-2.



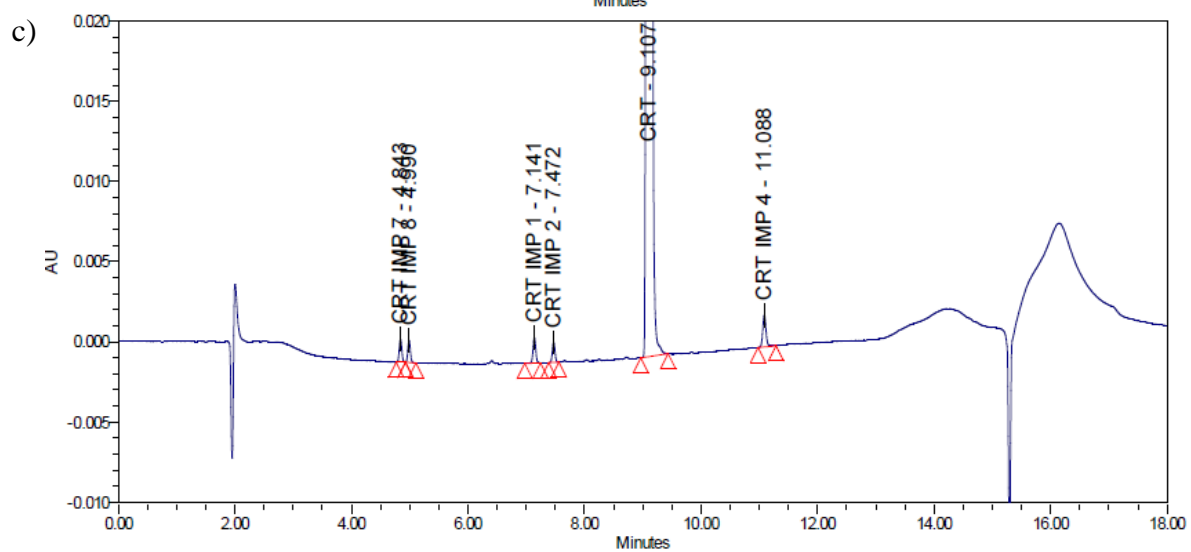
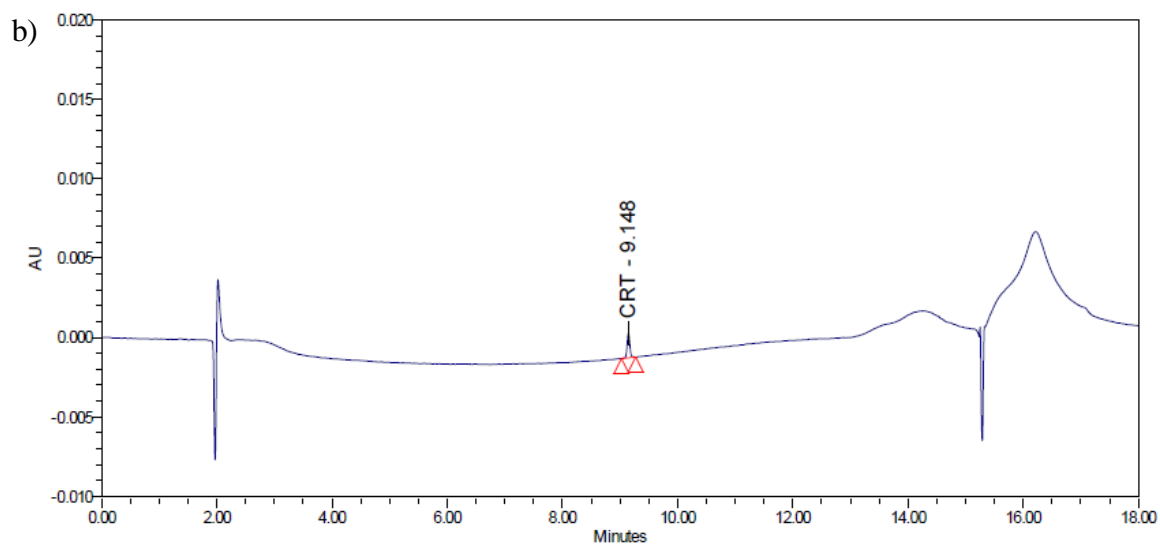
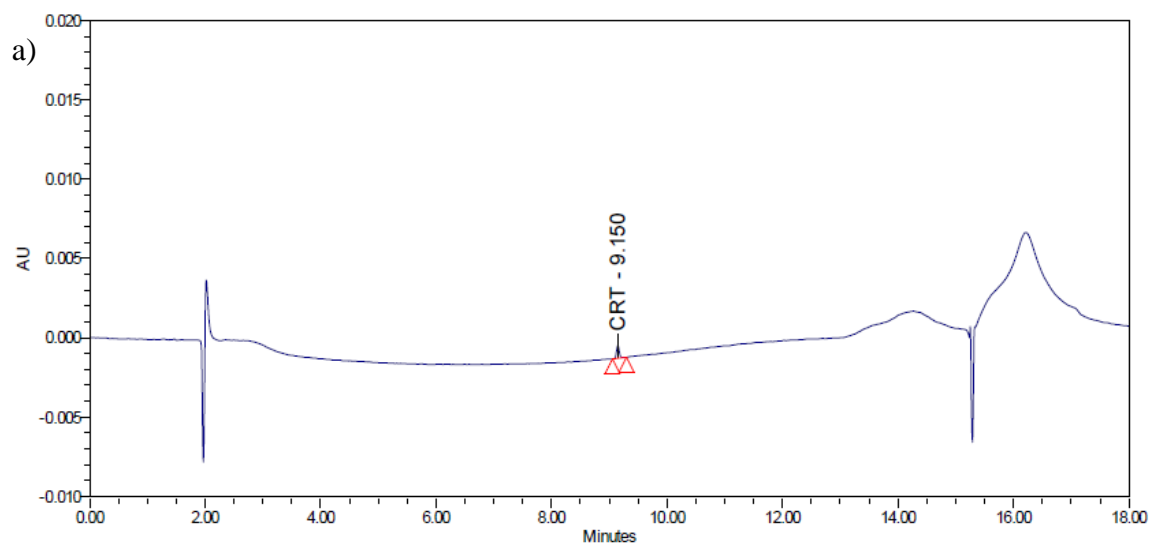
Slika P4. Umjerni pravac za CRT IMP-4.



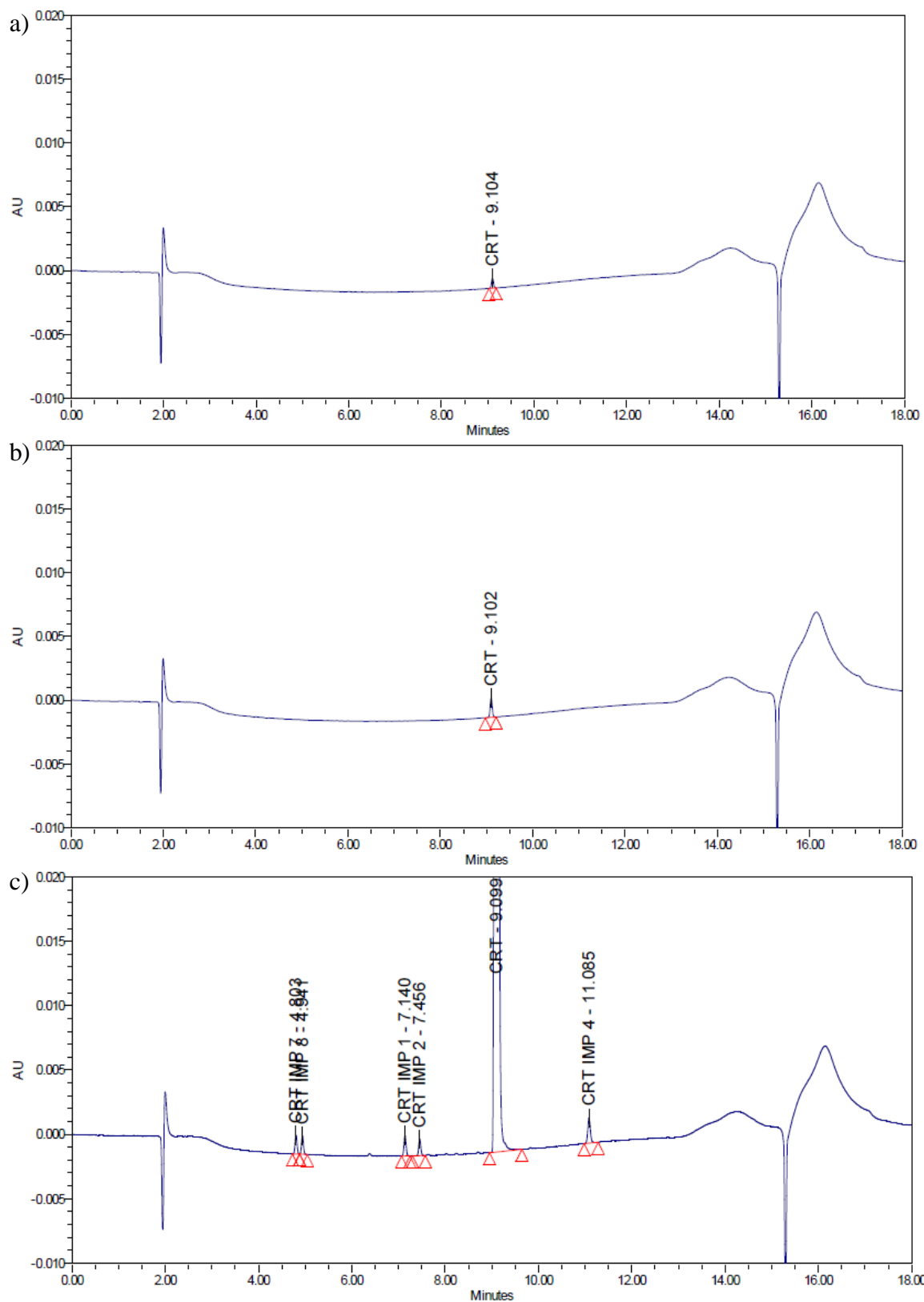
Slika P5. Umjerni pravac za CRT IMP-7.



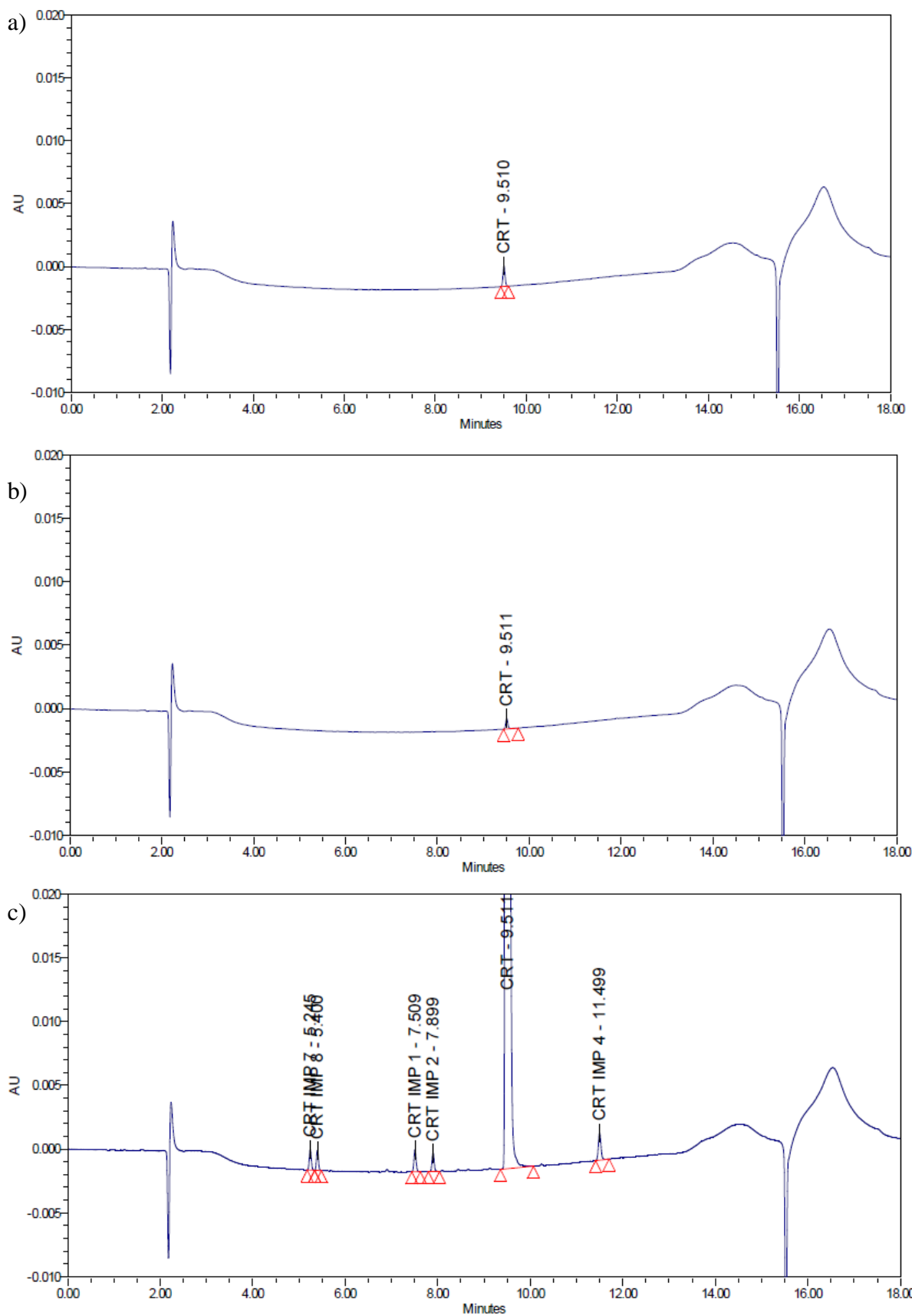
Slika P6. Umjerni pravac za CRT IMP-8.



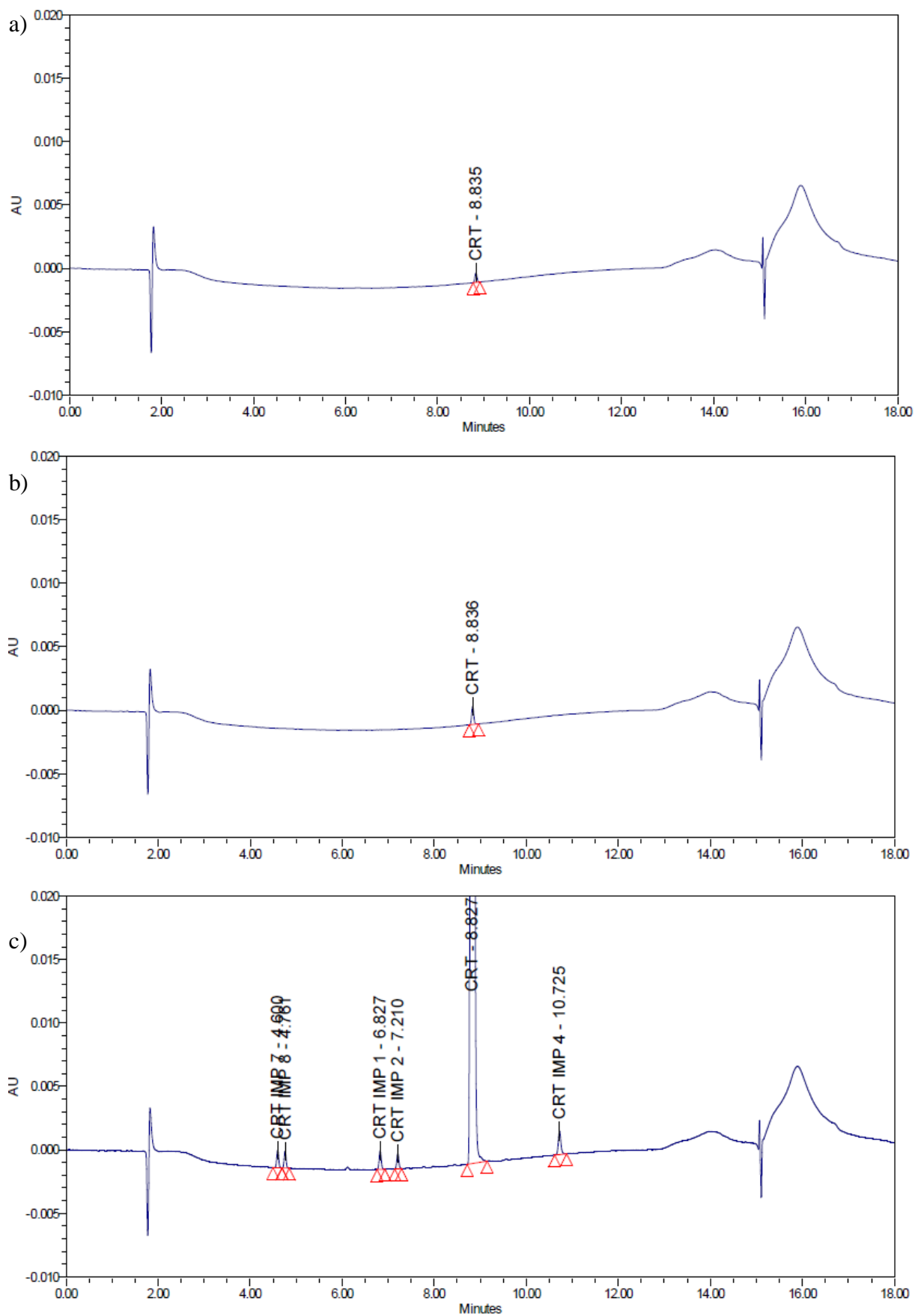
Slika P7. Prikaz kromatogramske krivulje otopine QL-a (a), otopine standarda (b) i otopine RS-a (c) pri temperaturi kolone 25 °C



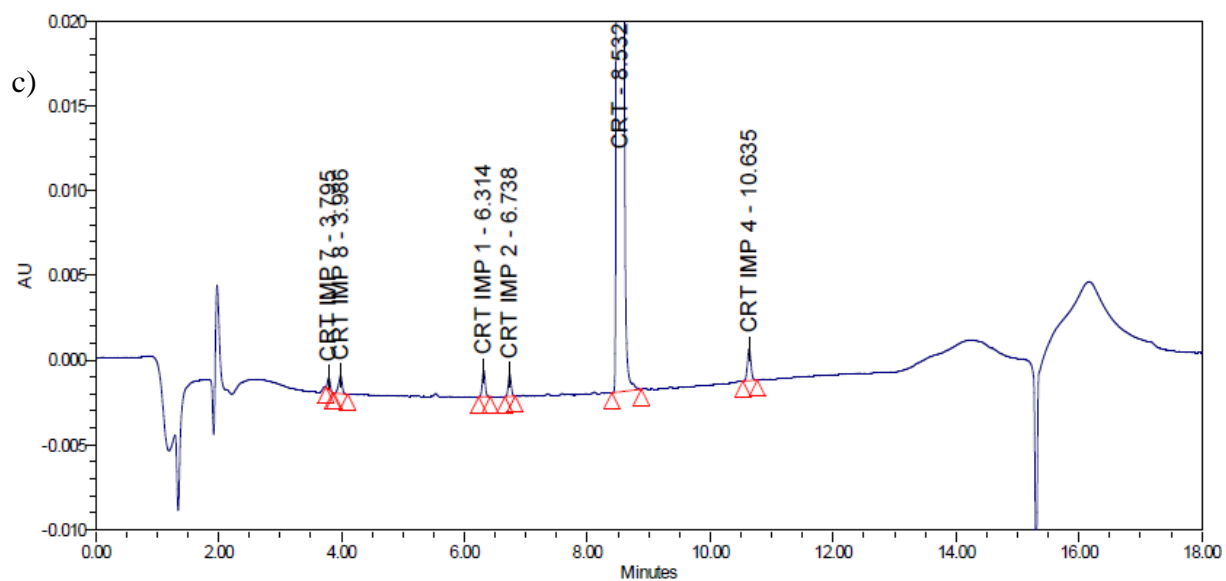
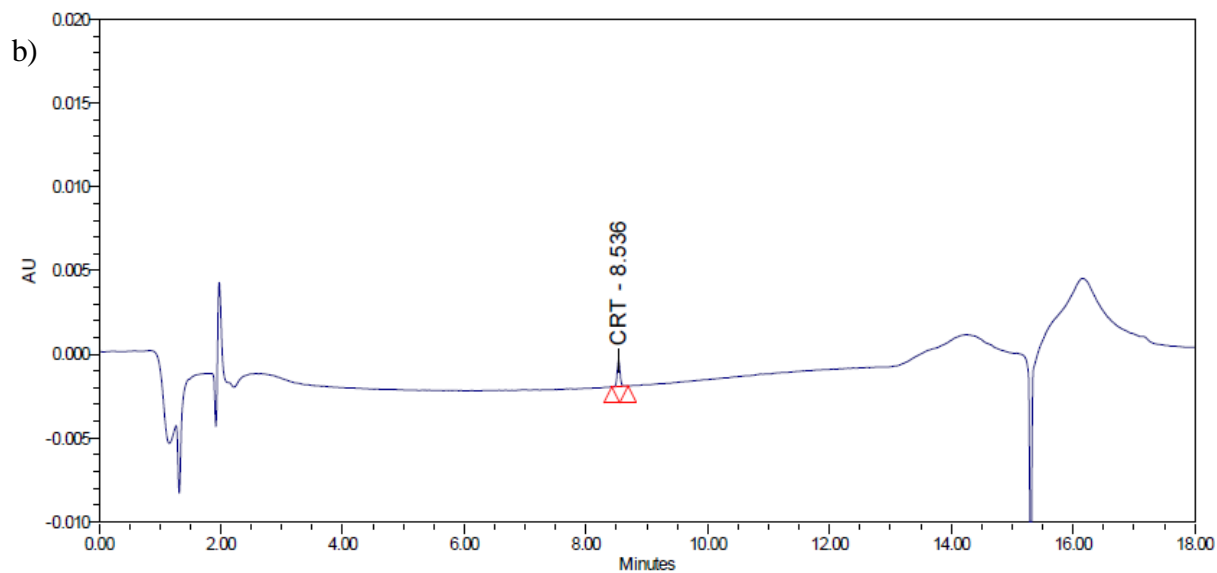
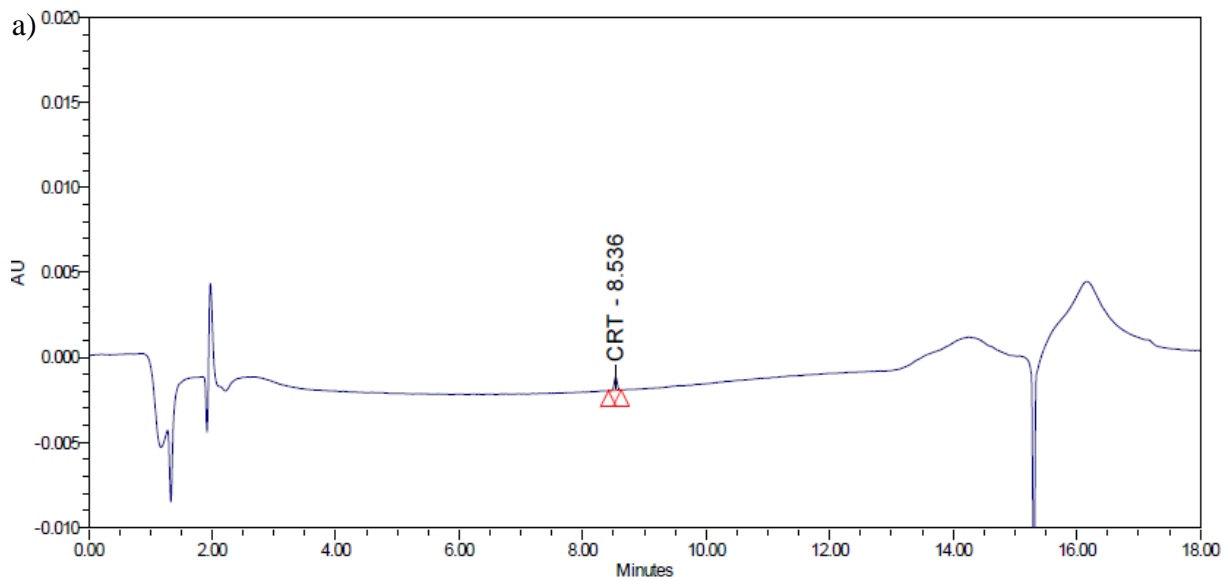
Slika P8. Prikaz kromatogramske krivulje otopine QL-a (a), otopine standarda (b) i otopine RS-a (c) pri temperaturi kolone 35 °C



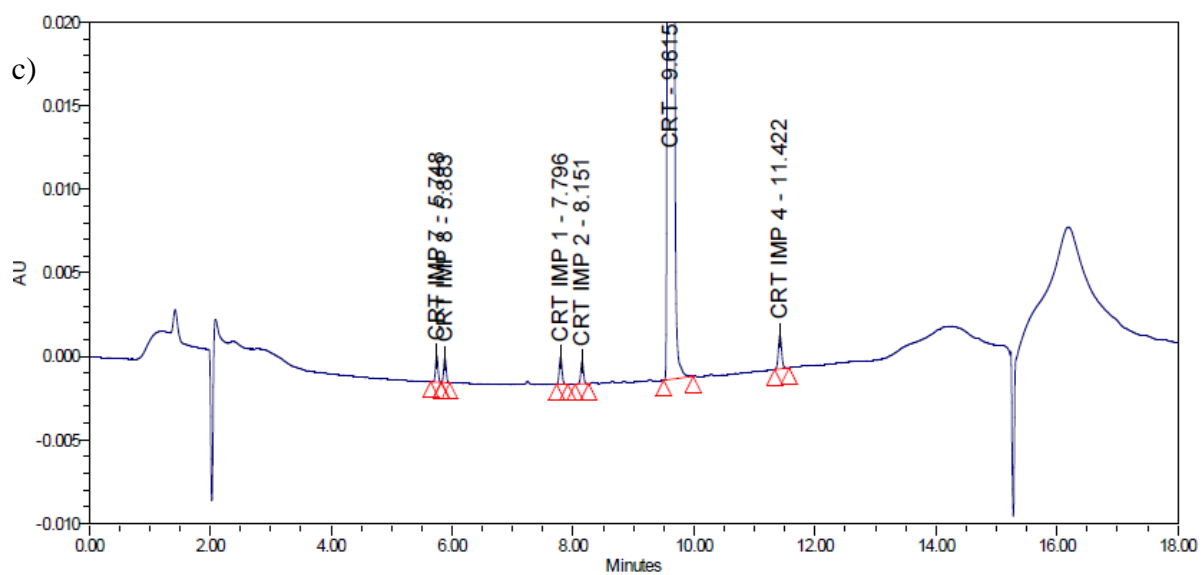
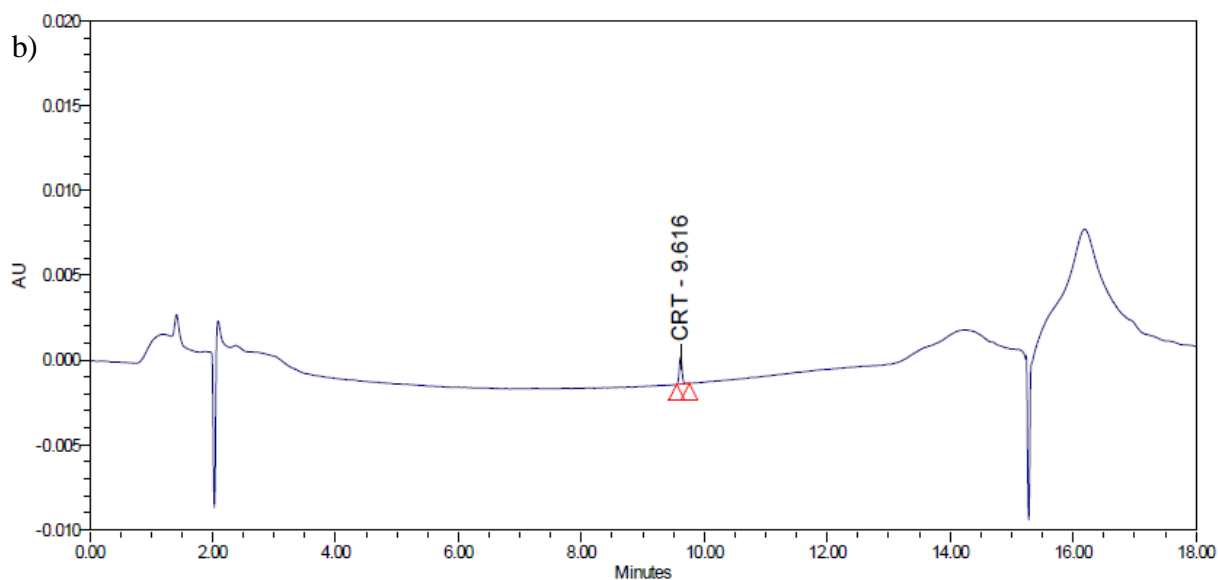
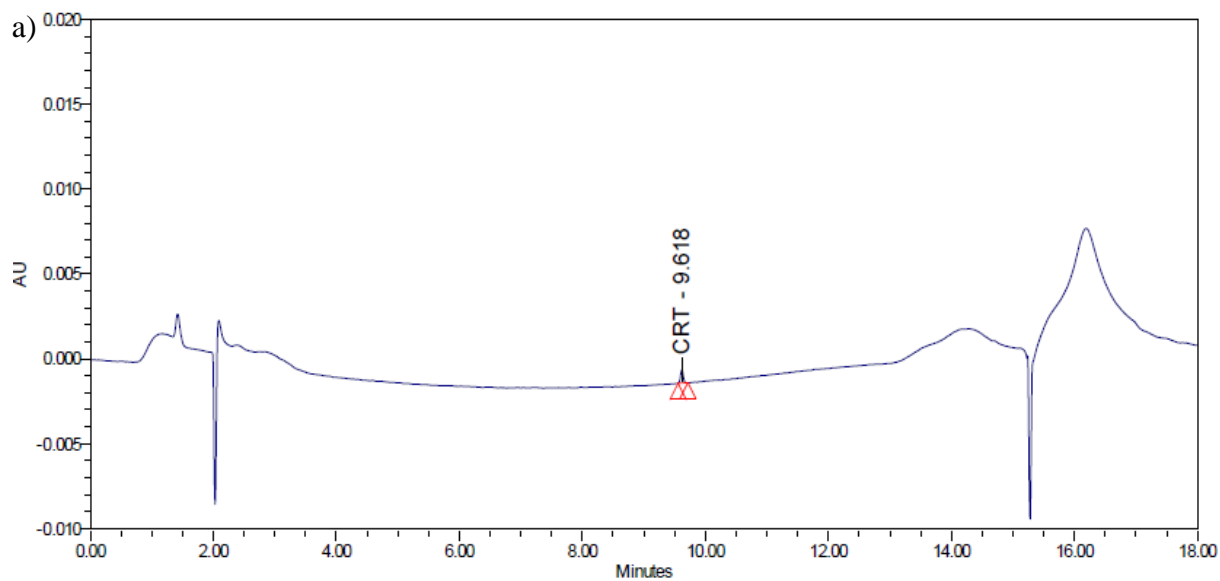
Slika P9. Prikaz kromatogramske krivulje otopine QL-a (a), otopine standarda (b) i otopine RS-a (c) pri protoku od 0,90 mL/min



Slika P10. Prikaz kromatografske krivulje otopine QL-a (a), otopine standarda (b) i otopine RS-a (c) pri protoku od 1,10 mL/min



Slika P11. Prikaz kromatografske krivulje otopine QL-a (a), otopine standarda (b) i otopine RS-a (c) pri početnom udjelu pokretne faze B od 15%



Slika P12. Prikaz kromatogramske krivulje otopine QL-a (a), otopine standarda (b) i otopine RS-a (c) pri početnom udjelu pokretne faze B od 5%

8 ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Ivan Bilmez

██

██

██

Edukacija

2018. – danas Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb

Preddiplomski studij: Kemijsko inženjerstvo

2014.-2018. Gimnazija u Požegi, Požega

Smjer: Prirodoslovno-matematički

Radno iskustvo

09/2020. – danas

Pliva Hrvatska d.o.o.

Istraživanje i razvoj – Rad na pomoćnim poslovima u analitici