

Razvoj stabilitetno-indikativne UHPLC metode za određivanje farmaceutski aktivnog spoja i njegovih srodnih spojeva

Bukač, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:149:624697>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Bukač

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Bukač

Razvoj stabilitetno-indikativne UHPLC metode za određivanje farmaceutski aktivnog spoja i njegovih srodnih spojeva

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, listopad 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u TAPI Pliva R&D Analitika pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić i neposrednim voditeljstvom dipl. kem. inž. Luke Jerića.

Hvala prof.doc.dr.sc. Sandri Babić što mi je pristala biti mentorica na diplomskom radu. Zahvaljujem joj se na uloženom trudu, pomoći i susretljivosti, te na svemu što me je naučila tijekom fakultetskog obrazovanja i tijekom izrade diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj mami i bratu, mojim Posejpalima i mom Ivanu! Zahvaljujem se na podršci i razumijevanju koje ste imali za mene ovih 5 godina. Hvala vam što ste vjerovali u mene!

SAŽETAK

U ovom radu opisan je razvoj metode za analizu farmaceutski aktivne tvari cediraniba, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata. Razvijena je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) s detektorom s nizom dioda (DAD) s C18 kromatografskom kolonom i gradijentnim eluiranjem. Optimalni eksperimentalni uvjeti analize određeni su primjenom računalnog programa Drylab: gradijentno eluiranje u trajanju od 15 minuta, temperatura kolone 60 °C i pH-vrijednost pokretne faze 5,8.

Provedena je prisilna razgradnja cediraniba u lužnatom i kiselom mediju, te pomoću okidativnog sredstva. Za analizu cediraniba i razgradnih produkata korištena je metoda UHPLC i metoda dvodimenzionalne UHPLC, obje vezane sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti (spektrometar masa koji mjeri vrijeme preleta, QTOF). Na temelju dobivenih spektara mase i točnih masa određenih pomoću QTOF-a, pretpostavljene su strukture razgradnih produkata i način fragmentacije.

ABSTRACT

This work describes the development of an analytical method for the determination of active pharmaceutical ingredient cediranib, its impurities and degradation products using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with diode-array detector (DAD), C18 stationary phase and gradient elution. Optimal experimental conditions were determined by using computer software DryLab®: gradient elution with a run time of 15 minutes, column temperature 60 °C and pH-value of mobile phase 5,8.

Influence of pH and the presence of oxidants on the degradation of cediranib active substance was investigated. Cediranib and degradation impurities were identified using ultra-high performance liquid chromatography and two-dimensional liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (quadrupole time of flight mass spectrometer, QTOF). The structures of degradation products were proposed based on mass spectra and exact masses determined by QTOF.

SADRŽAJ

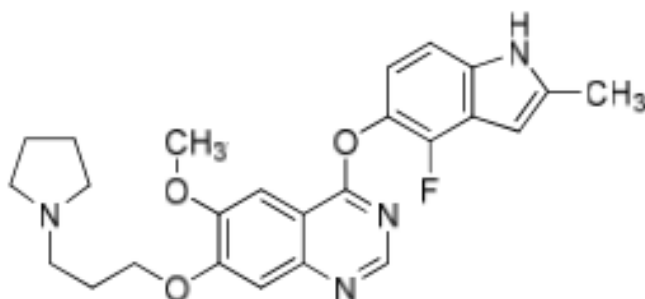
1. UVOD	3
2. OPĆI DIO	4
2.1. Onečišćenja u lijekovima	4
2.2. Cedinarib	4
2.3. Kromatografija.....	5
2.3.1. Parametri kromatografije	7
2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	10
2.3.3. Van Deemeterova jednadžba	12
2.3.4. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti	14
2.4. Detektori.....	14
2.5. Spektrometrija mase	15
2.5.1. Analizator mase koji mjeri vrijeme preleta (TOF).....	17
2.6. Puferske otopine	17
2.6.1. Važnost pH-vrijednosti pokretne faze za odjeljivanje komponenata smjese	19
2.6.2. Najčešće korišteni puferi za HPLC analize	21
2.7. Draylab	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Kemikalije	23
3.1.2. Cediranib i poznata onečišćenja.....	23
3.1.3. Priprema pokretne faza.....	25
3.1.4. Priprema otopina za UHPLC analizu	25
3.1.5. Priprema otopina za prisilnu razgradnju	26
3.2. Instrumenti	26
3.3. Metode rada.....	27
3.3.1. UHPLC analiza.....	27
3.3.2. 2D-LC analiza	28
3.3.3. Q-TOF analiza	29

4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Rezultati UHPLC analize.....	30
4.2. Rezultati DryLab analize	36
4.3. Prisilna razgradnja cediraniba	43
4.4. Rezultati 2D-LC analize	45
6. LITERATURA	52
7. PRILOZI.....	54
7.1. Uvjeti za UHPLC analizu	54
7.2. Kromatogrami CDR i onečišćenja za početnih 12 eksperimenata UHPLC analizom	58
8. ŽIVOTOPIS.....	70

1. UVOD

Onečišćenja u lijekovima su neželjeni sastojci u farmaceutski aktivnoj tvari koji mogu zaostati iz proizvodnog postupka proizvodnje lijeka, stajanjem farmaceutskog proizvoda ili same aktivne tvari. Sve to može biti uzrok stvaranja raznih neželjenih produkata razgradnje lijekovite tvari. Kako bi se postigla što bolja kvaliteta i osigurala sigurnost i zdravlje pacijenata, zakonska regulativa definira sve složenije i strože zahtjeve o kontroli kvalitete lijekova s posebnim naglaskom na praćenje udjela onečišćenja u njima. Ispitivanja čistoće lijeka uključuju primjenu analitičkih metoda za detekciju, identifikaciju, strukturnu karakterizaciju i kvantitativno određivanje onečišćenja.

Aktivni farmaceutski spoj cediranib (CDR) (slika 1) koristi se za liječenje karcinoma jetre, uznapredovanog karcinoma pluća bez malih stanica, te uznapredovanog kolorektalnog karcinoma. Za analizu cediraniba i njegovih razgradnih produkata, optimirana je analitička metoda koja se temelji na tekućinskoj kromatografiji ultravisoke djelotvornosti (eng. *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC). Optimalni eksperimentalni uvjeti metode određeni su pomoću računalnog programa DryLab; temperatura kolone, vrijeme gradijentnog eluiranja i pH pokretne faze. Dobiveni uvjeti korišteni su za UHPLC i 2D-LC analizu razgradnih produkata cediraniba nastalih prisilnom razgradnjom. Prisilna razgradnja provedena je u lužnatom i kiselom mediju, te uz prisutnost vodikovog peroksida. Analizom razgradnih produkata 2D-LC-MS tehnikom, pretpostavljene su molekulske mase, te strukture razgradnih produkata i njihova fragmentacija.



Slika 1. Struktura cediraniba

2.OPĆI DIO

2.1. Onečišćenja u lijekovima

Zahtjevi o kvaliteti lijekova definiraju dozvoljene granice prisutnih onečišćenja u lijeku koja su dozvoljena u roku trajanja farmaceutskog proizvoda. Godine 1995. osnovana je Međunarodna konferencija o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonization*, ICH). Organizacija predstavlja zajedničku inicijativu regulatornih tijela i proizvođača lijekova da se usklade standardi i zakonska regulativa u svrhu bržeg stavljanja lijekova u promet, s naglaskom na osiguravanje kvalitetnih lijekova za ljude.

Prema ICH, onečišćenje je svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski identitet kao ljekovita tvar [1] ili svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nije ljekovita ili pomoćna tvar u samom proizvodu [2]. Definiranje onečišćenja je izuzetno važno jer onečišćenja mogu imati neželjene farmakološke učinke, toksična svojstva, mogu uzrokovati nuspojave, utjecati na aktivnost i stabilnost ljekovite tvari, bioraspoloživost i učinkovitost samog lijeka.

Prema ICH, onečišćenja se mogu podijeliti u tri skupine; organska onečišćenja, anorganska onečišćenja i ostatna otapala. Trenutno je u izradi četvrti dokument koji bi davao posebne smjernice za onečišćenja metalima [3]. Onečišćenja se u ljekovitu tvar mogu unijeti polaznim sirovinama, a mogu nastati kao međuprodukti ili nusprodukti u proizvodnom postupku. Također mogu nastati kao produkti razgradnje ljekovite tvari djelovanjem svjetla, temperature, prisutnosti vode ili promjenom pH.

Kako bi se tijekom svih faza proizvodnje i kontrole kvalitete osigurali zahtjevi ICH o onečišćenjima, potrebne su pouzdane i sofisticirane analitičke metode za njihovu analizu [4].

2.2. Cedinarib

Cedinarib je indol-eterski kinazolin, kemijske formule $C_{25}H_{27}FN_4O_3$, molekulske mase $450,514 \text{ g mol}^{-1}$, naziv prema IUPAC-u 4-[(4-fluoro-2-metil-1H-indol-5-il)oksi]-6-metoksi-7-[3-(pirolidin-1-il)propoksi]kinozolin. Klinički se razvija kao oralna terapija jednom dnevno za liječenje karcinoma jetre, uznapredovanog karcinoma pluća bez malih stanica, te uznapredovanog kolorektalnog karcinoma.

S farmakološkog i biokemijskog stajališta, CDR inhibira ili sprječava proliferaciju neoplazme, tj. sprječava uzastopno stvaranje novih stanica raka. Prema farmakodinamici,

CDR je selektivni vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), signalni inhibitor koji inhibira sva tri VEGF receptora. Prema rezultatima predkliničkih ispitivanja, CDR ima potencijal da postane „najbolji u klasi“ inhibitor VEGF signalizacije. Rezultati I faze ispitivanja pokazuju da je CDR općenito dobro podnošljiv, a najčešće neželjene nuspojave su promuklost, glavobolja i hipertenzija [5, 6].

Mehanizam djelovanja se bazira na inhibiciji tirozin kinaze, točnije receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. *vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR). Vežanjem CDR na VEGFR receptor dolazi do sprečavanja vežanja VEGFR-a čime se ograničava rast novih krvnih žila, tj. sprječava se angiogeneza tumorskih stanica. Angiogeneza ima važnu ulogu u rastu novih krvnih žila tumorskih stanica koja im omogućava rast i metastaziranje. Sprječavanjem angiogeneze dolazi do usporavaju ili zaustavljaju rasta tumorskih stanica [7].

2.3. Kromatografija

Kromatografija je separacijska tehnika koja u odnosu na druge analitičke tehnike omogućava istovremenu separaciju, identifikaciju i kvantitativno određivanje više sastojaka ispitivane smjese unutar jedne analize [8]. Pojam kromatografija općenito predstavlja veliki broj analitičkih tehnika analize i odijeljivana analita. Svim kromatografskim postupcima zajedničko je postojanje nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Plinovita ili tekuća pokretna faza nosi uzorke kroz nepokretnu fazu, a odjeljivanje komponenata smjese temelji se na njihovom različitom afinitetu prema pokretnoj ili nepokretnoj fazi što ujedno dovodi i do različite brzine kretanja komponenata kroz kolonu i vremena izlaska s nje.

Tijekom putovanja kroz kolonu, komponente uspostavljaju ravnotežu između pokretne i nepokretne faze, putuju pokretnom, a zadržavaju se na nepokretnoj fazi te se na tome i temelji odijeljivanje komponenata smjese. Prosječna brzina kretanja komponente kroz kolonu ovisi o vremenu koje je komponenta provela u pokretnoj fazi. To vrijeme je kratko za komponente koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi (kasnije izlaze iz kolone), a kraće za komponente koje imaju veći afinitet prema pokretnoj fazi (prve izlaze iz kolone).

Kao rezultat analize, dobiva se kromatogram. Kromatogram je grafički prikaz analitičkog signala (odziva detektora) u obliku pikova u ovisnosti o volumenu ili vremenu, a služi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Položaj pika na vremenskoj osi, tj. vrijeme zadržavanja

(t_R) (retencijsko vrijeme) pojedine komponente, može poslužiti za kvalitativno određenje, dok površina ispod pika za kvantitativno određivanje analita [9, 10].

S obzirom na pojedina svojstva, najčešće su tri podjele kromaografije: prema agregatnom stanju pokretne faze, prema obliku kromatografske podloge i prema fizikalno-kemijskim procesima. S obzirom na obliku kromatografske podloge, kromatografija se dijeli na plošnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu. S obzirom na agregatno stanje pokretne faze razlikujemo tekućinsku kromatografiju (pokretna faza tekućina), plinsku kromatografiju (pokretna faza plin) i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (pokretna faza fluid). Prema fizikalno-kemijskim procesima, odnosno prema mehanizmu odvajanja komponenata, kromatografija može biti adsorpcijska, razdjelna, afinitetna, ionsko-izmjenjivačka i kromatografija isključenjem (tablica 1) [11].

Tablica 1. Podjela kromatografskih tehnika [10]

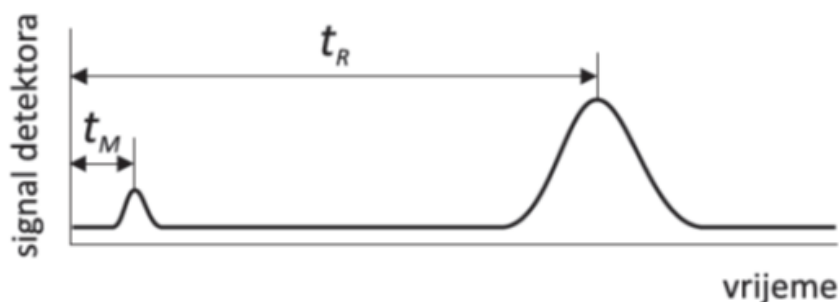
Mehanizam djelovanja	Nepokretna faza	Pokretna faza	Izvedbena tehnika	Kratica
adsorpcija	čvrsta	tekuća	kolonska	LSC
	čvrsta	tekuća	plošna	TLC
	čvrsta	plin	kolonska	GSC
razdioba/ adsorpcija	tekućina na čvrstom nosaču	tekuća	kolonska	HPLC, LLC
	tekućina na čvrstom nosaču	tekuća	plošna	PC, TLC
	tekućina na čvrstom nosaču	plin	kolonska	GLC (GC)
	tekućina na čvrstom nosaču	fluid pri superkričnim uvjetima	kolonska	SFC
ionska izmjena	čvrsta	tekuća	kolonska	IEC
	čvrsta	tekuća	plošna	TLC
isključenje	čvrsta	tekuća	kolonska, plošna	EC

2.3.1. Parametri kromatografije

Prilikom razvoja kromatografske metode postoji niz parametara koje treba optimirati kako bi se postigli željeni rezultati. Razdvajanje komponenti smjese tekućinskom kromatografijom ovisi o prirodi sastojaka, pH-vrijednosti pokretne faze, punilu kolone, protoku, volumenu injektiranja, temperaturi kolone te tlaku.

Svaki analit ima svoje vrijeme zadržavanja koje je karakteristično za pojedini analit, a predstavlja vrijeme između trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za

pojedinu tvar (slika 2). Sve molekule provode jednako vrijeme u pokretnoj fazi. To je tzv. zadržano vrijeme (t_M) koje je jednako vremenu koje prođe od injektiranja tvari koja se ne veže na nepokretnu fazu do trenutka njene detekcije (slika 2). Često se u kromatografiji koristi prilagođeno vrijeme zadržavanja (t'_R), a ono predstavlja razliku vremena zadržavanja (t_R) i vremena zadržavanja nezadržavanog sastojka (t_M) [8, 9].



Slika 2. Odnos vremena zadržavanja analita (t_R) i zadržanog vremena (t_M) [12]

Vrijeme potrebno analiziranom spoju da prođe kroz kolonu ovisi o faktoru zadržavanja (k), koji predstavlja omjer vremena koje sastojak provede u nepokretnoj fazi i vremena u kojemu putuje u pokretnoj fazi.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Parametri procjene djelotvornost kolone su razlučivanje (R_S) i separacijski faktor (α). Razlučivanje predstavlja mjeru djelotvornosti separacije dvaju kromatografskih pikova. Ukoliko je veće od 1.5, dva susjedna pika su odijeljena na baznoj liniji. Računa se prema jednadžbi (2) gdje su w_{b1} i w_{b2} širine pikova pri osnovici.

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (2)$$

Mjera selektivnosti kromatografskog sustava naspram dva analita naziva se separacijski faktor, a ovisi o interakciji spoja s nepokretnom fazom. Moguće ga je definirati izrazom:

$$\alpha = \frac{k(B)}{k(A)} \quad (3)$$

Na faktor zadržavanja i separacijski faktor utječu:

- sastav pokretne faze (pH i udio organskog otapala),
- izbor kromatografske kolone (vrsta nepokretne faze i dimenzije kolone) i
- temperatura kolone.

Prolazak uzorka kroz kolonu može dovesti do širenja vrpce, te utjecati na učinkovitost odjeljivanja. Djelotvornost kolone izražava se brojem teorijskih odsječaka (N) i njihovom visinom (H) (eng. *height equivalent to a theoretical plate*, HETP). Broj teorijskih odsječaka je broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze, a računa se prema jednadžbi (4):

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (4)$$

Visina odsječaka predstavlja omjer dužine kolone (L) i broja teorijskih odsječaka (jednadžba 5):

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

Za odjeljivanje sastojaka uzorka potrebno je imati dovoljno odsječaka u kojima se uspostavlja ravnoteža razdiobe analita između nepokretne i pokretne faze. Djelotvornost kolone može se povećati smanjenjem visine odsječaka i povećanjem broja teorijskih odsječaka.

Na broj teoretskih odsječaka može se utjecati promjenom:

- protoka pokretne faze,
- duljine kolone i
- vrste i veličine čestica nepokretne faze.

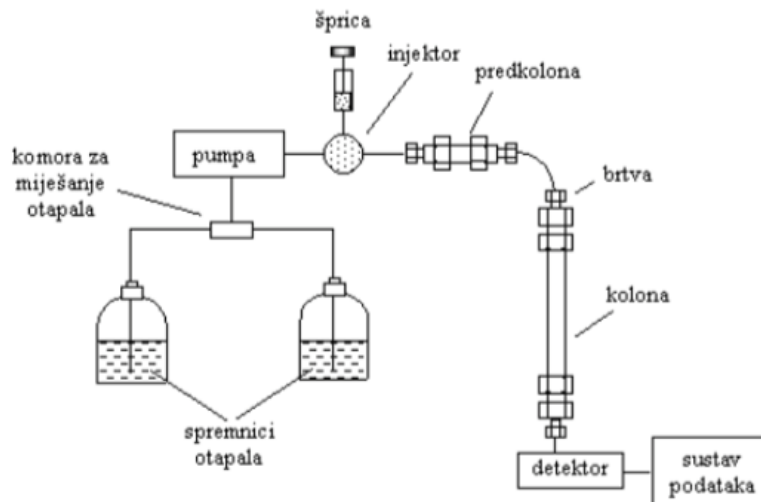
Uz optimalnu brzinu protoka pokretne faze, povećanjem duljine kromatografske kolone i smanjivanjem promjera čestica nepokretne faze, smanjit će se visina odsječaka u koloni te postići bolje razlučivanje.

Važan parametar je i odabir pogodnih otapala za pokretnu fazu. Treba uzeti u obzir polarnost otapala i pH-vrijednost koja bi trebala biti dvije jedinice oko pK_a analita [8, 9].

2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

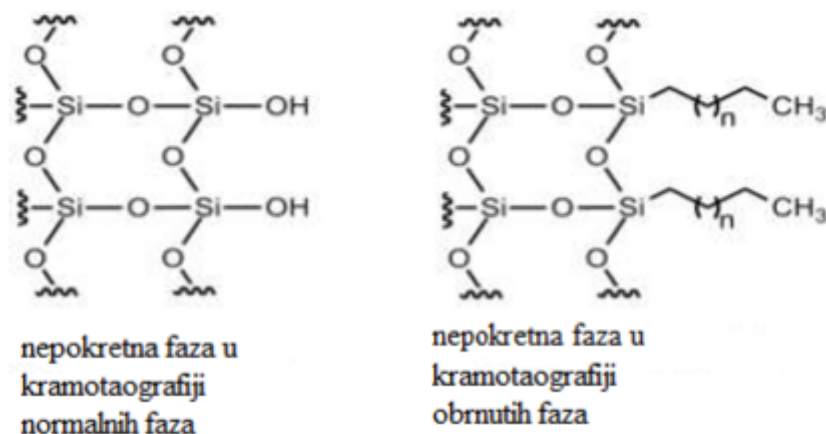
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je najčešće korištena tehnika za analizu lijekova u zadnjih 30 godina. HPLC ima niz prednosti među kojima se ističe brzina, visoka moć razlučivanja, osjetljivost, ponovljivost, točnost i automatiziranost, zbog čega je postala nezaobilaznom tehnikom kako u farmaceutskoj industriji, tako i u analitici općenito. Danas se u farmaceutskoj industriji primjenjuje u fazi otkrića, razvoja i proizvodnje lijekova [8, 9]. Tehnikom HPLC provjerava se čistoća i kvaliteta lijekova te se uspješno primjenjuje za razdvajanje, kvalitativno i kvantitativno određivanje aktivne farmaceutske tvari, razgradnih produkata, reakcijskih onečišćenja i sintetskih intermedijera. Također, koristi se u svrhu praćenja sintetskih reakcija u kontroli kvalitete [13].

Osnovni dijelovi HPLC instrumenta (slika 3) su spremnik za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, kolona za odjeljivanje i detektor. Kao pokretna faza koriste se otapala visoke čistoće, bez suspendiranih čestica ili otopljenih plinova. Pumpa služi za pokretanje pokretne faze kroz sustav pod visokim tlakom i stalnom brzinom ($0,1 \text{ mL min}^{-1} - 10,0 \text{ mL min}^{-1}$). Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz ventil na kolonu, tzv. injektor. Kolone su najčešće izrađene od čelika, a razlikuju se po duljini, unutarnjem promjeru i punjenju. Na kraju sustava se nalazi detektor kojim se analitički signal pretvara u kromatografski zapis - kromatogram.



Slika 3. Shema HPLC instrumenta [14]

HPLC može imati sustav obrnutih (reverznih) ili normalnih faza. Kromatografski sustav normalnih faza ima polarnu nepokretnu i nepolarnu (heksan, diklormetan, metanol, izopropanol) pokretnu fazu. U farmaceutskoj industriji se najčešće koristi kromatografija obrnutih faza gdje je nepokretna faza nepolarna (slika 4), a pokretna polarna (voda, acetonitril, tetrahidrofur). Nosač nepokretne faze u kolonama je najčešće silika gel čija je površina hidratizirana, te sadrži silanolne skupine (Si-OH) na koje su najčešće vezane nepolarne $-C_{18}H_{37}$ ili $-C_8H_{17}$ ugljikovodične skupine. U kromatografiji normalnih faza na silika gel mogu biti vezane polarne skupine poput cijano ili amino skupina [15].



Slika 4. Shematski prikaz nepokretne faze u kromatografiji normalnih i obrnutih faza [16]

Postoje dva načina eluiranja: izokratno i gradijentno. Kod izokratnog eluiranja sastav pokretne faze je nepromijenjen cijelo vrijeme trajanja analize. Izokratnim eluiranjem često nije moguće u potpunosti razdvojiti sastojke ispitivane smjese pa se koristi gradijentno eluiranje. U tom slučaju sastav pokretne faze mijenja se kontinuirano ili skokovito tijekom analize čime se postiže bolje odjeljivanje sastavnica i kraće vrijeme eluiranja [16].

2.3.3. Van Deemeterova jednadžba

Odnos visine teorijskog odsječka (H) prema različitim kinetičkim parametrima koji utječu na kromatografski proces, opisan je Van Deemeter-ovom jednadžbom (12):

$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (6)$$

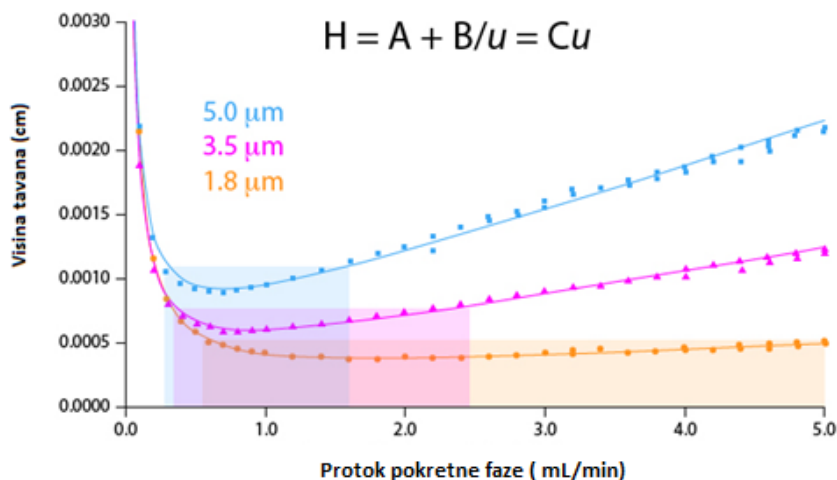
gdje je;

- A – koeficijent vrtložne difuzije
- B – koeficijent uzdužna difuzije
- C – koeficijent otpora prijenosu mase
- v – linearna brzina pokretne faze

Van Deemeter-ova jednadžba je empirijska formula koja opisuje odnos između linearne brzine (protok pokretne faze) i H . Također, u svojoj jednadžbi uzima u obzir veličinu čestica punila, neidealnost punjenja kolone, te brzinu prijenosa tvari između zona koje utječu na širenje kromatografske zone. Obzirom da je veličina čestica jedna od varijabli, Van Deemeter-ova krivulja objašnjava potrebu za razvojem kolona s manjim promjerom čestica.

Iz jednadžbe (6) se vidi da koeficijent vrtložne difuzije (A) ne ovisi o linearnoj brzini pokretne faze. On predstavlja proces gibanja molekule iz sredine veće koncentracije u sredinu manje koncentraciji. Na koeficijent A utječe promjer punjenja. Najmanji je kada je promjer čestica u koloni mali i ujednačen jer tada se smanjuje prazan protok kroz kolonu. Što je kolona više homogeno punjena, to je pik jedne komponente uži. Koeficijent longitudinalne difuzije (B) predstavlja tendenciju molekule k prirodnoj difuziji. Ovaj efekt se smanjuje pri visokim brzinama pokretne faze jer veća brzina pokretne faze „prisiljava“ da se sve molekule iste komponente pomiču prema naprijed i da izađu u relativno isto vrijeme s kolone. Na taj način se dobivaju uži pikovi. Koeficijent prijenosa mase (C) označava kinetički otpor zato što se ravnoteža između pokretne faze uspostavlja tako sporo da se kromatografska kolona uvijek nalazi u neravnotežnim uvjetima. Što je protok veći, više molekula se nalazi većinu vremena u pokretnoj fazi i ne dolazi do zadovoljavajuće separacije pikova. Za optimalnu separaciju komponenata traži se optimalna brzina pokretne faze.

Idealnu Van Demeter-ovu krivulju moguće je ostvariti uporabom nepokretnih faza s česticama malih dimenzija koje nisu dostupne za HPLC. Obzirom na to, razvijene su kolone s veličinom čestica manjom od 2 μm . Utjecaj veličine čestica na oblik i položaj Van Deemter-ove krivulje prikazan je na slici 5. Van Deemter-ova jednadžba pokazuje da uporabom čestica promjera manjih od 2 μm raste efikasnost, što dovodi do kraćeg trajanja analize, ali istovremeno dolazi do rasta tlaka što ograničava uporabu HPLC uređaja koji mogu raditi pri tlakovima do 400 bara. S obzirom na to, razvijena je kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC). Korištenjem kratkih kolona s punilima malog promjera, dolazi do povećanja broja teoretskih odsječaka što ima za posljedicu kraće vrijeme analize uz bolju separaciju [8].



Slika 5. Van Deemter-ova krivulja [8]

2.3.4. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti modificirani je oblik HPLC-a. Razvoj UHPLC tehnike donosi velike prednosti pred HPLC tehnikom. UHPLC instrumenti mogu podnijeti tlakove do 10^8 Pa što je dvostruko veći tlak u odnosu na HPLC instrumente. Veličine čestica punjenja kolone promjera su manjeg od $2 \mu\text{m}$. Zbog malih dimenzija čestica, otopine koje se koriste za pokretne faze moraju biti ultračiste kako ne bi došlo do začepjenja pora kolone. Često je potrebna i filtracija pokretne faze.

Kod UHPLC-a, smanjena je potrošnje količine reagensa, kraće je trajanje analize, omogućeno je bolje razlučivanje između pikova, te je povećana selektivnost i osjetljivost metode. Faktor koji utječe na poboljšanje separacije je materijal nepokretne faze [8, 9].

2.4. Detektori

Detektori se spajaju na izlazu iz kolone. Odziv detektora ovisi o koncentraciji komponente u uzorku te se bilježi kao funkcija vremena ili volumena dodane pokretne faze. Kao rezultat dobije se kromatogram.

Dokazivanje i određivanje sadržaja ispitnog uzorka provodi se primjenom različitih detektora, poput spektrofotometra, detektora s nizom fotoosjetljivih dioda (engl. *diode array detector*, DAD), fluorescencijskog detektora (engl. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijskog detektora (engl. *electrochemical detector*, ED), detektora indeksa loma (engl. *refractive*

indeks detector, RID) ili detektora raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *evaporative light-scattering detector*, ELSD) [1]. Najčešće korišteni detektori u kromatografskoj analizi su detektori s nizom dioda koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog analita u UV/Vis području. Danas se HPLC tehnika povezuje u složene sustave s nizom drugih načina dokazivanja i određivanja razdvojenih sastojaka smjese, poput vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS), nuklearne magnetske rezonancije (LC-NMR) ili infracrvene spektroskopije (LC-IR) i dr.

Detektor je spojen na računalni sustav za obradu podataka koji pomoću električnog signala generira grafički zapis na ekranu, kromatogram. Dobar detektor osjetljiv je na niske koncentracije analita, nije osjetljiv na promjene temperature ili sastav pokretne faze, osigurava linearan odgovor u širokom koncentracijskom području, te ne uzrokuje širenje pikova [9].

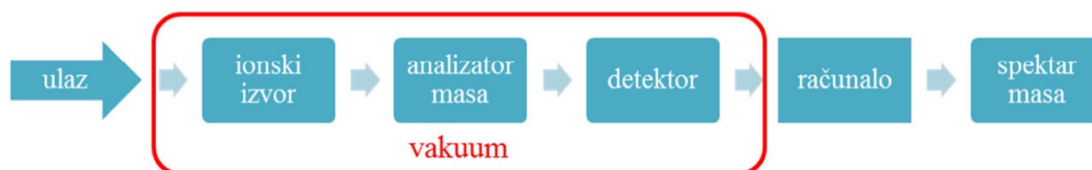
2.5. Spektrometrija mase

Spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) analitička je tehnika kojom se molekule ioniziraju, nakon čega se ioni odvajaju na temelju omjera njihove mase i naboja. Na ovaj način određuje se molekulska masa spoja, molekulska formula i struktura molekule. Koristi se za identifikaciju i kvantifikaciju farmaceutskih aktivnih tvari te njihovih razgradnih produkata [15]. Temelji se na ionizaciji i fragmentaciji molekula uzorka, odabiru pojedinih ioniziranih strukturnih fragmenata te njihovoj detekciji [17, 18].

Ova metoda je izrazito osjetljiva pri čemu je moguće analizirati volumene uzorka manje od 10 μ L. Jedna od prednosti ove metode je mogućnost sprezanja s drugim analitičkim tehnikama. Od velike važnosti za analizu i identifikaciju farmaceutskih spojeva je i mogućnosti povezivanja tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC-MS) [15].

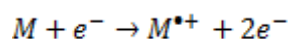
Spektrometar masa sastoji se od četiri dijela (slika 6):

- izvora iona u kojem se ioniziraju molekule uzorka,
- analizatora mase za odabir i odvajanje iona,
- detektora iona i
- računalnog sustava za upravljanje instrumentom i obradu podataka.



Slika 6. Shematski prikaz spektrometra masa [8]

Prilikom ulaska u ionski izvor, molekula se može ionizirati brzim elektronima pri čemu nastaje molekulski ion :



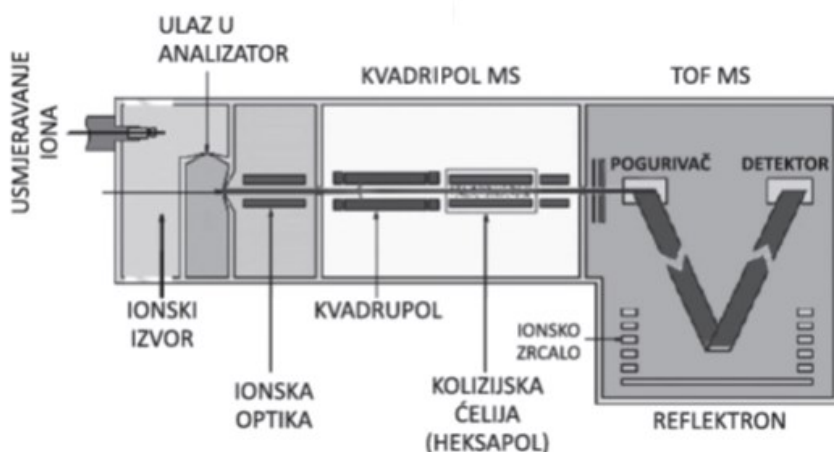
Molekulski ion podliježe fragmentaciji te nastaju ioni kao produkti. Fragmentacijom može nastati ion s parnim brojem elektrona i radikal ili ion s neparним brojem elektrona i neutralna molekula. Dobiveni ioni razdvajaju se u analizatoru masa na temelju omjera mase i naboja (m/z) i detektiraju se [17]. Broj iona, fragmentacija te konačni izgled spektra mase ovise o tehnici ionizacije. Odabir tehnike ionizacije ovisi o vrsti analiziranog uzorka i podacima koje je potrebno dobiti. Tehnike ionizacije: ionizacija elektronima (eng. *electron impact ionisation*, EI), kemijska ionizacija (eng. *chemical ionisation*, CI), ionizacija brzim atomima (eng. *fast atom bombardment*, FAB), ionizacija elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionisation*, ESI), ionizacija termoraspršenjem (eng. *thermospray*, TS) i maticom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *matrix assisted laser desorption ionisation*, MALDI) [8]. Analizatori masa imaju svrhu razdvajanja nastalih iona u vakuumu na temelju njihovih omjera mase i naboja (m/z). Postoji nekoliko vrsta analizatora masa [17]:

- kvadripolni analizator mase (eng. *quadrupole mass analyzer*, Q),
- kvadripolni analizator masa s ionskom klopkom (eng. *ion trap*, IT),
- analizator koji mjeri vrijeme preleta (eng. *time of flight*, TOF) i
- analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama (eng. *Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR).

Najvažniji analizatori masa su TOF i kvadripolni analizator masa [17].

2.5.1. Analizator mase koji mjeri vrijeme preleta (TOF)

Princip rada analizatora TOF (slika 7) temelji se na činjenici da brzina iona ovisi o masi iona. Svi ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi, manji ioni imaju veću brzinu, a veći ioni manju brzinu. Separacija iona provodi se s obzirom na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima. Ioni mogu ući aksijalno ili ortogonalno u analizator (eng. *pusher*), on ih sakuplja u određenom vremenu, te zatim istovremeno otpušta. U trenutku otpuštanja uključuje se mjerenje vremena preleta do detektora [12].



Slika 7. TOF analizator [12]

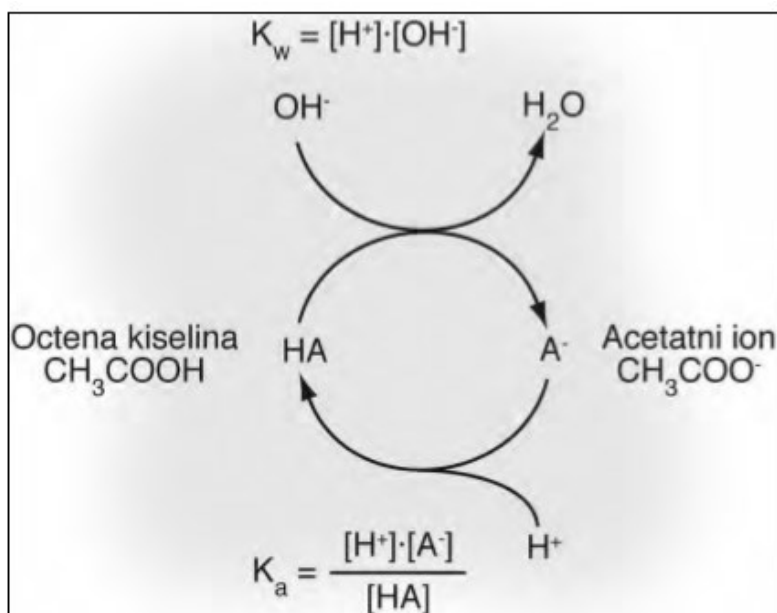
Detektor je zadnji dio spektrometra masa i u njega dolaze samo određeni ioni koji prođu analizator masa. Zbog malog broja iona koji uspije proći kroz analizator masa, nužno je pojačati signale koje daje detektor. Najpoznatiji detektori su Faradayev cilindar, fotografska ploča te multiplikatori elektrona [9].

2.6. Puferske otopine

Puferi su dvokomponentni sustavi u ravnoteži koji se sastoje od smjese slabe kiseline i njene soli ili slabe baza i njene soli. Puferske otopine ublažavaju efekte dodatka jake kiseline ili baze, a nastale promjene u pH-vrijednosti značajno su manje od onih do kojih bi došlo kada otopina ne bi bila puferirana.

Slika 8. prikazuje mehanizam djelovanja pufera na primjeru pufera octena kiselina/acetatni ion. Sposobnost pufera da veže dodane H^+ ili OH^- ione može se objasniti Le Chatelierovim

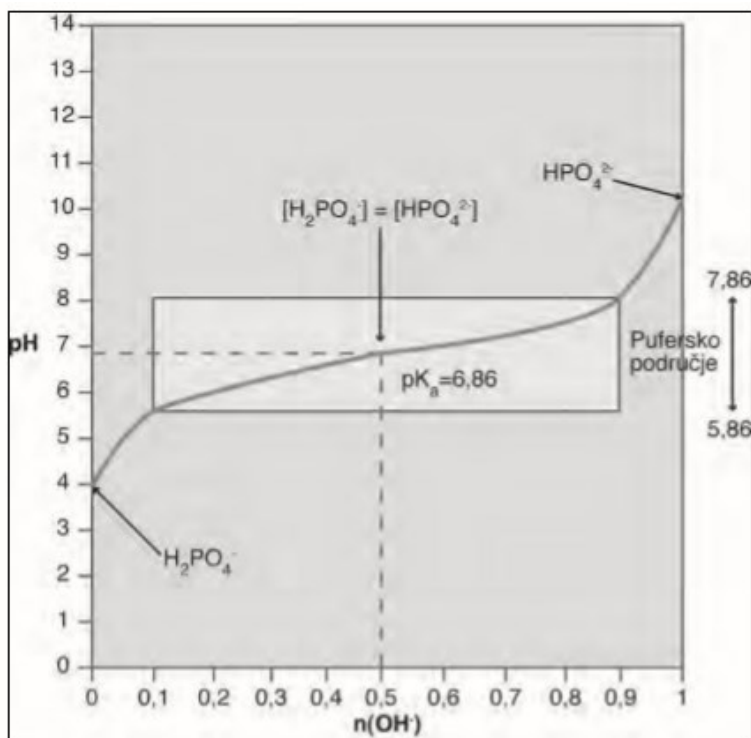
pravilom: svaka promjena koja se izvodi na sustavu u ravnoteži dovodi do pomaka ravnoteže kojim se sustav opire vanjskim promjenama. To znači da proton donor, octena kiselina (HA) koja je u vodenoj otopini gotovo neionizirana, ima rezervnu količinu H^+ iona, koji mogu neutralizirati višak OH^- tvoreći H_2O . Do neutralizacije dolazi jer se sustav opire promjeni ravnoteže koja je nastala unosom OH^- . Istovremeno s reakcijom neutralizacije, doći će do daljnje ionizacija octene kiseline da bi se u sustavu nadoknadili H^+ ioni utrošeni na neutralizaciju OH^- iona. Ako se u acetatni pufer doda jaka kiselina, također neće doći do veće promjene pH. Konjugirana baza, CH_3COO^- (A^-), vezati će H^+ ion te tako nastaje molekula octene kiseline. Općenito možemo reći da je djelovanje pufera posljedica dviju reverzibilnih reakcija koje teku istovremeno da bi se održale ravnoteže koje su određene konstantama K_w i K_a .



Slika 8. Mehanizam djelovanja pufera na primjeru octena kiselina/acetatni ion [19]

Svaki puferski sustav ima područje djelovanja u kojem je najučinkovitiji. Područje djelovanja pufera određuje se iz krivulje titracije puferske kiseline s jakim bazom. Na slici 9. prikazana je krivulja titracije dihidrogen fosfata, $H_2PO_4^-$, kisele komponente fosfatnog pufera s jakim bazom. Postupnim dodavanjem OH^- troši se $H_2PO_4^-$, a nastaje HPO_4^{2-} bazična komponenta. Kada je polovica kiseline neutralizirana, koncentracije kiseline i konjugirane baze postaju

jednake, odnosno pH postaje jednak pK_a . Pufer je najučinkovitiji kada sadržava obje komponente pufera u jednakoj količini, tj. kada je pH jednak pK_a . Općenito se smatra da je pufer djelotvoran u području $pH = \pm 1 pK_a$ (u nekim slučajevima ± 2) [19].

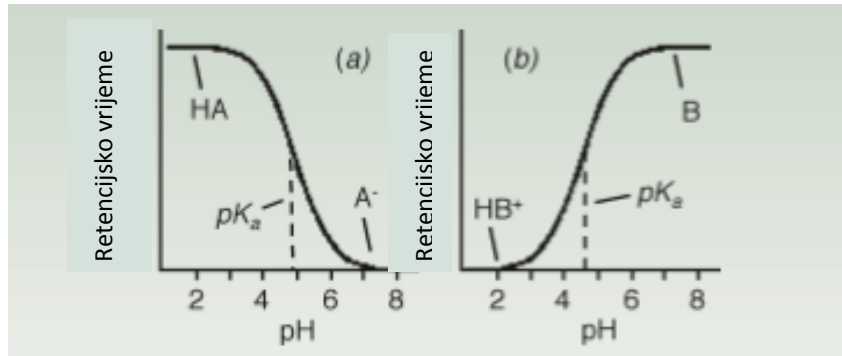


Slika 9. Krivulja titracije dihidrogenfosfata, $H_2PO_4^-$ s jakim bazom [19]

2.6.1. Važnost pH-vrijednosti pokretne faze za odjeljivanje komponenata smjese

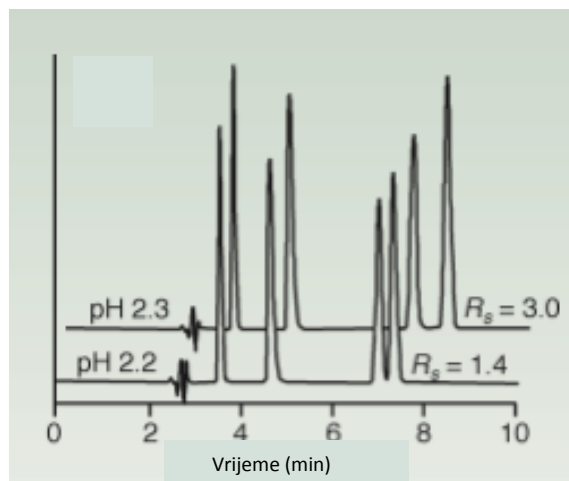
Kada analizirani uzorci sadrže spojeve koji se mogu ionizirati, pH pokretne faze može biti jedna od važnijih varijabli u kontroli vremena zadržavanja komponenata kod HPLC analize s reverznom fazom (RP-HPLC). Budući da većina spojeva analiziranih s RP-HPLC sadrži jednu ili više kiselih ili bazičnih funkcionalnih skupina, većina pokretnih faza zahtijeva kontrolu pH. Zbog toga se često koriste puferne otopine [20].

Kada se pH kiseline razlikuje za 2 pH jedinice od pK_a , više od 99% kiseline će biti ionizirano ili neionizirano. Baze su ionizirane ispod pK_a i neionizirane iznad pK_a . Neionizirani oblik je manje polaran, te će stoga biti snažnije zadržan na nepokretnoj nepolarnoj fazi. Tako će pri niskim vrijednostima pH ionizirana baza prije sići s kolone, dok će se neionizirana kiselina dulje zadržati na koloni (slika 10).



Slika 10. Utjecaj pH-vrijednosti pokretne faze na zadržavanje kiseline (a) i baze (b) [20]

Ako je pH pokretne faze u blizini pK_a , mali dodatak kiseline ili lužine utječe na promjenu pH pokretne faze. Male promjene pH pokretne faze mogu uzrokovati promjene u vremenima zadržavanja ispitivanih analita. Prema slici 11 može se vidjeti da promjenom pH za 0,1, dolazi do promijene u R_S -vrijednosti za dva puta, tj. mijenjaju se vremena zadržavanja komponenata.



Slika 11. Utjecaj promjene u pH-vrijednosti pokretne faze na odvajanje komponenata, tj. na razlučivanje [20]

Drugi faktor koji se mora uzeti u obzir pri odabiru pH pokretne faze je stabilnost kolone. Kolone na bazi silicijevog dioksida imaju radno područje $2 < \text{pH} < 8$. Iznad pH 8 dolazi do otapanja SiO_2 što uzrokuje uništavanje kolone. Ukoliko pokretne faze s $\text{pH} > 8$ omogućavaju dobro razdvajanje komponenti, treba odabrati kolonu koja je dizajnirana za rad pri visokom pH-vrijednostima. U tim situacijama se izbjegava korištenje fosfatnih pufer jer povećavaju otapanje SiO_2 pri visokom pH. Umjesto toga koristite se organski puferi (pirolidin) koji

produljuju vijek trajanja kolone pri visokom pH. Čak i uz pažljiv odabir uvjeta, životni vijek kolone pri $\text{pH} > 8$ se skraćuje. Također, kao alternativa, koriste se kolone punjene polimernim česticama koje nisu osjetljive na visoki pH. Najčešći način kontroliranja pH pokretne faze je korištenje puferских otopina [20].

2.6.2. Najčešće korišteni puferi za HPLC analize

Najčešće korišteni puferi za HPLC s UV detekcijom su fosfatni i acetatni pufer jer se mogu koristiti na valnim duljinama manjim od 220 nm. Fosfat ima tri vrijednosti $\text{p}K_a$ koje mu daju tri raspona puferiranja: $1,1 < \text{pH} < 3,1$, $6,2 < \text{pH} < 8,2$ i $11,3 < \text{pH} < 13,3$.

Acetat ima raspon puferiranja od $3,8 < \text{pH} < 5,8$. Uz malo produljenje područja puferiranja od ± 1 pH jedinica od $\text{p}K_a$, fosfat i acetat mogu pokriti cijeli raspon pH od 2 do 8.

Kada se MS koristi kao LC detektor (LC-MS), pokretna faza mora biti hlapljiva. Iz tog razloga fosfati se ne mogu koristiti kao pufer u LC-MS analizama. Amonijev acetat je dovoljno hlapljiv za primjenu u LC-MS analizi, ali pokriva samo dio raspona pH u kojem se može koristiti; $2,0 < \text{pH} < 3,8$ i $5,8 < \text{pH} < 8,0$. Kao alternativa može se koristiti amonijev formijat ($2,7 < \text{pH} < 3,7$) kod niskih vrijednosti pH, te amonijev bikarbonat ($6,6 < \text{pH} < 8,6$) kod viših vrijednosti pH [20].

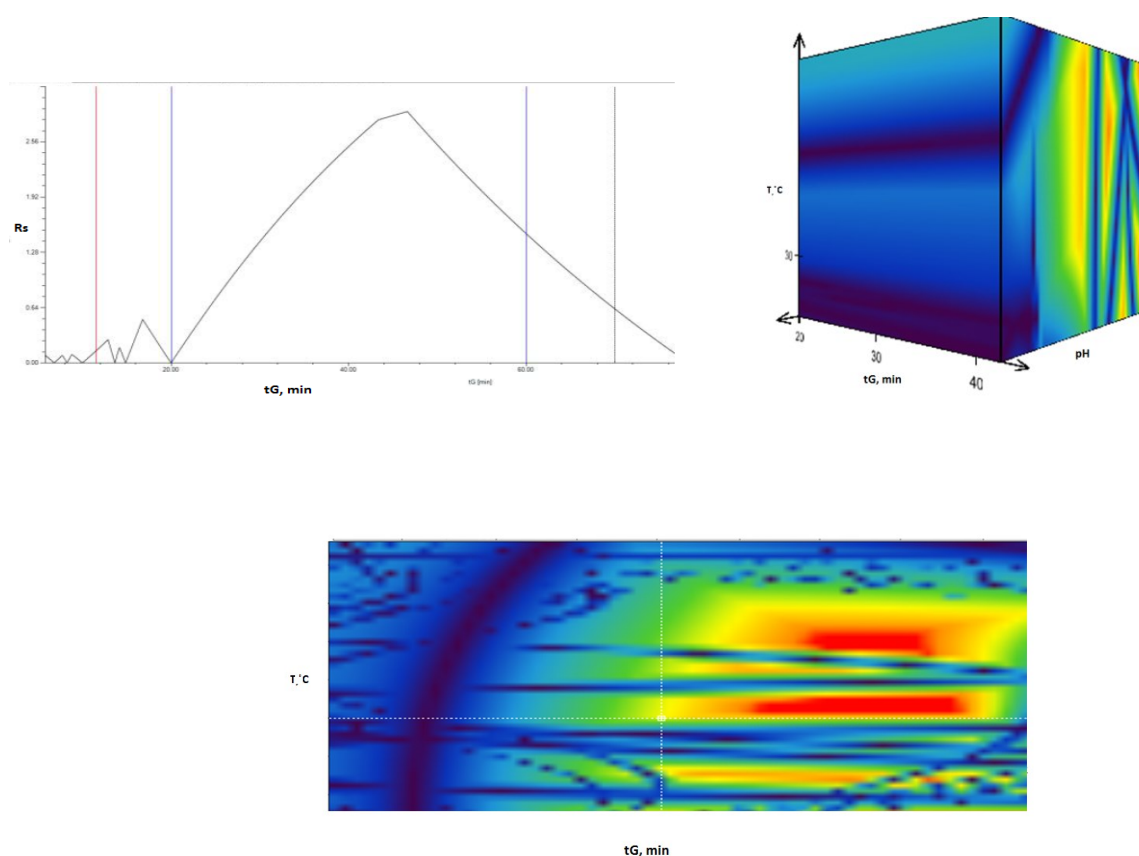
2.7. Drylab

Drylab je računalni program koji se koristi za razvoj i optimizaciju uvjeta za HPLC i UHPLC analizu [20]. Pomoću njega moguće je smanjiti vrijeme analize, poboljšati učinkovitost i kromatografsko razlučivanje. U programu se definiraju eksperimentalni parametri poput pH-vrijednosti pokretne faze, protoka pokretne faze, temperature kolone, te načina i trajanja eluiranja. Prvi korak je definiranje ciljanog analitičkog profila, nakon čega DryLab predlaže sistematični pristup i početne uvjete metode.

Draylab izračunava i predlaže idealne uvijete za analizu nakon što su u softver uneseni dobiveni rezultati niza eksperimenata: površina ispod signala komponenti uzorka, te vremena zadržavanja. Važno je imati konstantan volumen uzorka tijekom analize zbog automatskog prepoznavanja pikova u DryLab programu. Moguće su pogreške u programu koje su posljedica velikog broja komponenti i slične površine pikova [22]. U programu se najčešće mijenjaju parametri poput temperature kolone, trajanja analize i pH-vrijednost pokretne faze. Prema unesenim vrijednostima za površine signala komponenti uzorka i vremena zadržavanja,

te s obzirom na promjenjive parametre (temperatura kolone, trajanje analize i pH-vrijednost pokretne faze), dobiva se trodimenzionalni prikaz ovisnosti jednog parametra o druga dva [23].

Pored trodimenzionalnog prikaza ili 3D, koriste se i 2D (dvodimenzionalni prikaz) te 1D (jednodimenzionalni prikaz) (slika 12). Dvodimenzionalni grafički prikaz predstavlja dvodimenzionalni graf ovisnosti promjene dva parametra, dok je 1D prikaz promjene jednog parametra u ovisnosti o razlučivanju (R_s). Trodimenzionalni prikaz je najčešće korišteni prikaz u obliku kocke na kojoj boja njene površine ovisi o postignutoj vrijednosti faktora razlučivanja. Takav prikaz pruža više informacija o razlučivanju i selektivnosti uvjeta prilikom razdvajanja pikova. Plavo obojene površine predstavljaju mjesta gdje je razlučivanje slabo, tj. gdje dolazi do mogućih preklapanja pikova ili se javljaju neki drugi problemi u analizi, dok crveno obojene površine predstavljaju dobre uvjete za razdvajanje pikova [24].



Slika 12. Grafički prikaz 1D, 2D i 3D kritičnih rezolucija [24]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih za analize nalazi se u tablici 2.

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

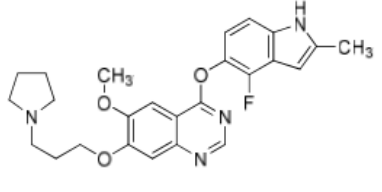
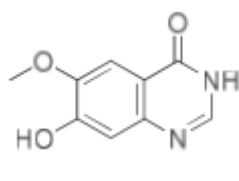
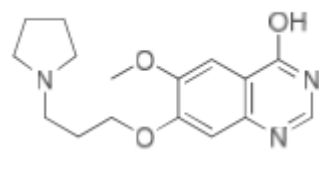
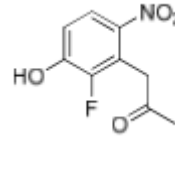
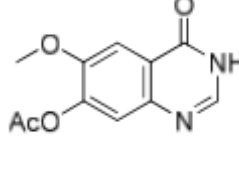
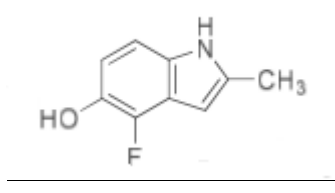
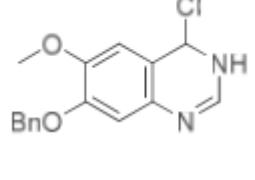
Naziv kemikalije	Proizvođač	CAS broj*	Rok valjanosti
Acetonitril (ACN)	J. T. Baker	67-56-1	12./2019.
Trifluorooctena kiselina (TFA)	Sigma-Aldrich	76-05-1	07./2019.
NH ₄ OAc	Fluka	631-61-8	01./2024.
NH ₄ HCO ₂	Fluka	540-69-2	02./2022.
HCl	Sigma-Aldrich	7647-01-0	04./2019.
NaOH	Kemika	1310-73-2	11./2020.
H ₂ O ₂	Suprapur	7722-84-1	11./2019.

* CAS (eng. *Chemical Abstracts Service*) je jedinstveni identifikacijski broj kojim se označavaju pojedine tvari (npr. organski i anorganski spojevi, metali, legure, minerali, organometalni spojevi, elementi, izotopi, polimeri...), nema kemijski značaj ali se putem njege može doći do važnih informacija o određenim kemikalijama.

3.1.2. Cediranib i poznata onečišćenja

Polazni materijali (aktivna farmaceutska tvar i poznata onečišćenja) sintetizirani su u TAPI Pliva Hrvatska i dobiveni bez prethodnog pročišćavanja. Strukture CDR i ostalih 6 poznatih onečišćenja prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Strukture polaznih spojeva

Kratica	Struktura	Proizvođač
CDR		TAPI Pliva Hrvatska
CDR-201		TAPI Pliva Hrvatska
CDR-038		TAPI Pliva Hrvatska
CDR-105		TAPI Pliva Hrvatska
Ac-CDR-201		TAPI Pliva Hrvatska
CDR-009		TAPI Pliva Hrvatska
CDR-117		TAPI Pliva Hrvatska

3.1.3 Priprema pokretne faza

Kao pokretna faza A korištene su sljedeće otopine:

- pokretna faza pH-vrijednosti 1,9 pripremljen je tako što je u litru ultračiste vode (MilliQ) dodan 1 mL TFA pomoću automatske pipete (0,1% TFA).

- za pufer pH-vrijednosti 5,8 vagano je 0,77 g amonijevog acetata (NH_4OAc) na vagi i do oznake na tikvici nadopunjeno je MilliQ vodom ($10 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{OAc}$). Vrijednost pH namještena je dodatkom razrijeđene octene kiseline.

- za pripremu pufera pH-vrijednosti 9,55 odvagano je 0,63 g amonijevog formijata (NH_4HCO_2) i do oznake na tikvici nadopunjeno s MilliQ vodom ($10 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{HCO}_2$). Vrijednost pH namještena je na pH-metru pomoću razrijeđene otopine amonijaka.

U metodi je korišteno gradijentno eluiranje, pri čemu su puferi bili pokretna faza A, a čisti acetonitril pokretna faza B.

3.1.4. Priprema otopina za UHPLC analizu

Za analizu na UHPLC-u pripremljene su otopina CDR koncentracije 1 mg mL^{-1} i njegovih 6 poznatih onečišćenja koncentracije $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$. Za pripremu glavne komponente CDR, odvagan je 1 mg CDR direktno u vialu i otopljen u otapalu. Za pripremu otopina onečišćenja bilo je potrebno napraviti temeljne standardne otopine koncentracije $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ koje su kasnije razrijeđene kako bi se dobila koncentracija onečišćenja od $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$. Sve ukupno pripremljeno je 6 tikvica temeljnih standardnih otopina. U svaku tikvicu od 25 mL zasebno je na analitičkoj vagi odvagan 1 mg onečišćenja te je tikvica nadopunjena otapalom do oznake. Sve temeljne standardne otopine razrijeđene su u tikvicama od 20 mL tako što je staklenom pipetom prenesen 1 mL temeljne standardne otopine i tikvica je nadopunjena do oznake otapalom. Također, pripremljena je rezolucijska otopina (RS) tako da je u tikvicu od 10 mL odvagan 10 mg CDR-a, dodano je po 500 μL razrijeđenih otopina onečišćenja i tikvica je nadopunjena do oznake otapalom. Svaka pripremljena otopina prenesena je u vialu.

Sve pripremljene otopine korištene su za UHPLC analizu čiji su rezultati korišteni za razvoj metode pomoću DryLab računalnog programa.

Sve pripremljene otopine otopljene su u čistom ACN kao otapalu, a otopljene su pomoću ultrazvučne kupelji i vortex miješalice.

3.1.5. Priprema otopina za prisilnu razgradnju

Prisilna razgradnja provedena je na CDR-u pomoću 5 mol L^{-1} NaOH, 5 mol L^{-1} HCl i 30% H_2O_2 .

Otopina HCl koncentracije 5 mol L^{-1} pripremljena je u odmjernoj tikvici od 20 mL. U tikvicu je dodana MilliQ voda, digitalnom pipetom (*Eppendorf Xplorer*) dodano je 8,3 mL koncentrirane HCl (0,5 – 10 mL) te je nadopunjeno MilliQ vodom do oznake. Za pripremu 5 mol L^{-1} otopine NaOH odvagano je 20 mg NaOH u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjeno MilliQ vodom do oznake.

Za eksperimente prisilne razgradnje pripremljeno je 4 otopine CDR-a koncentracije 1 mg mL^{-1} . U svaku vialu odvagan je 1 mg CDR-a. U prvu vialu dodano je 800 μL otapala i 100 μL 5 mol L^{-1} HCl. U drugu vialu dodano je 800 μL otapala i 100 μL 5 mol L^{-1} NaOH. U treću vialu dodan je 1 mL 30% H_2O_2 . U četvrtu vialu dodan je 1 mL otapala te je ta viala korištena kao kontrolni uzorak. Priređene otopine ostavljene su da stoje 4 sata na sobnoj temperaturi. Nakon četiri sata otopine tretirane kiselinom i lužinom neutralizirane su dodatkom lužine odnosno kiseline jednakog molariteta i volumena kao otopine korišteni na početku eksperimenta.

Sve pripremljene otopine korištene su za UHPLC i 2D-LC analizu kako bi se odredili razgradni produkti CDR-a.

3.2. Instrumenti

Analitička vaga, *MettlerToledo XP205*, područje rada: 1 mg – 2.2 g

Automatska pipeta *Eppendorf Xplorer*, područje rada: 100 – 1000 mL

Ultrazvučna kupelj, *Bandelin Sonorex*

Vortex miješalica: *IKA Vortex 4 basic*

pH-metar, *Metrohm 781*, mjerno područje: 1 – 14 pH, umjereno radno područje: 1 – 7 pH

Tekućinski kromatograf, UHPLC, *Agilent Technologies 1290 Infinity II* s kvaternom pumpom i DAD detektorom

Tekućinski kromatograf, 2D-LC-MS, *Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF LC/MS* s binarnom pumpom te DAD i QTOF detektorima

3.3. Metode rada

3.3.1 UHPLC analiza

Prethodno pripravljeni uzorci onečišćenja, glavne komponente i rezolucijske otopine, postavljeni su na UHPLC instrument Agilent Technologies 1290 Infinity II (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD) s kvaternom pumpom i detektorom s nizom dioda. Analiza je provedena na Acquity uplc[®] Beb C18 1.7 μ m 2.1x100 mm koloni (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD) s pokretnim fazama A - otopine različitih pH-vrijednosti (opisano u poglavlju 3.3) i B - čisti ACN. Sama analiza provedena je u 12 pokusa tijekom kojih su mijenjani eksperimentalni uvjet provođenja analize. Mijenjana je temperatura kolone, sastav i pH pokretne faze te vrijeme trajanja jednog pokusa. Parametri pojedinog pokusa prikazani su u sljedećim tablicama.

Tablica 4. Parametri prvog pokusa za UHPLC analizu

Kolona i punilo	<i>Acquity uplc[®] Beb Acquity uplc[®] Beb C18 1.7μm 2.1x100 mm</i>		
Pokretna faza A	0,1% TFA pH = 1,9		
Pokretna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	30,00	10,00	90,00
	30,10	90,00	10,00
	35,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 Ml		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	236 nm		
Temperatura kolone	30 °C		
Vrijeme analize	15 min		

U ostalim pokusima mijenjana je temperatura kolone, pH i sastav pokretne faze, vrijeme trajanja jednog pokusa, dok su protok, volumen injektiranja, valna duljina snimanja, gradijent, te kolona ostali nepromijenjeni. Uvjeti ostalih UHPLC analiza nalaze se u Predlošku diplomskog rada (Prilog P1-P11).

3.3.2. 2D-LC analiza

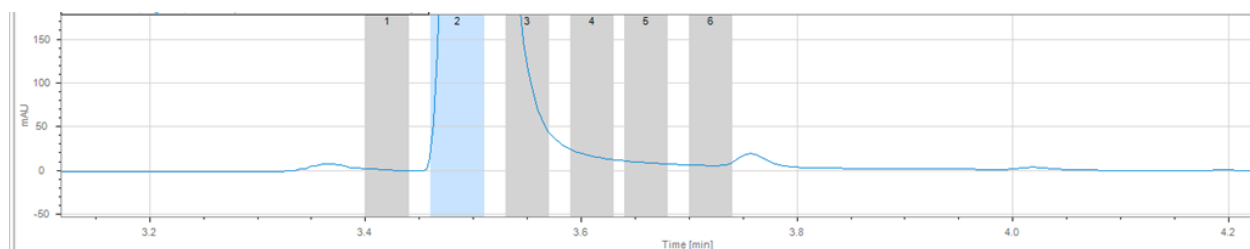
Analiza vezanim sustavom dvodimenzionalna tekućinska kromatografija - spektrometrija masa provedena je pomoću tekućinskog kromatografa Agilent UHPLC 1290 Infinity (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD) s binarnom pumpom, koristeći DAD detektor spregnut s Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF LC/MS (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

Tablica 5. Uvjeti mjerenja za 2D-LC analizu

Kolona i punilo	<i>Acquity BEH C18</i>		
Pokretna faza A	0,1% TFA		
Pokretna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	5,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 Ml		
Protok	0,5 mL min ⁻¹		
Detektor	236 nm		
Temperatura kolone	30 °C		
Vrijeme analize	15 min		

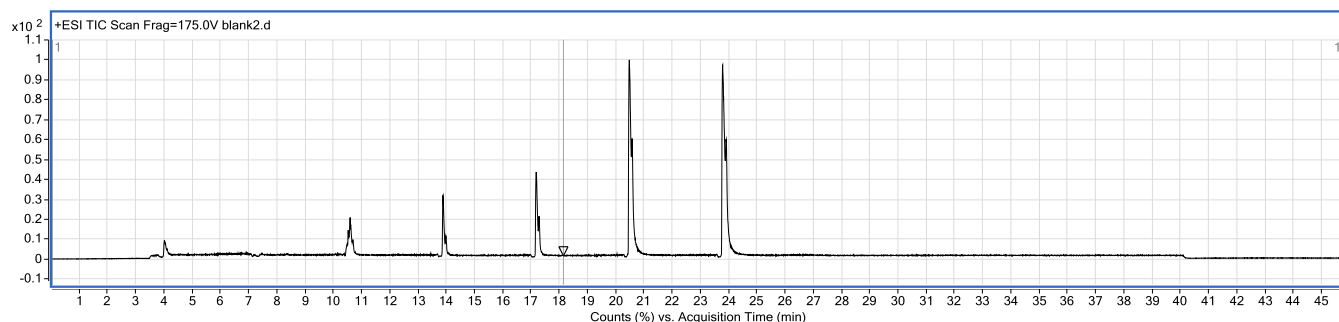
3.3.3.Q-TOF analiza

2D-LC-MS metoda s Q-TOF detektorom korištena je kako bi se dodatno potvrdila čistoća glavnog pika. Glavni pik je podijeljen na 6 frakcija koje su zasebno snimljene u drugoj dimenziji. Na slici 13. grafički je prikazan odabir fragmenata CDR pika za analizu u drugoj dimenziji.



Slika 13. Grafički prikaz fragmenatacije CDR pika odabranih za analizu u drugoj dimenziji

Na slici 14. prikazan je kromatogram odabranih fragmenata snimljen 2D-LC-DAD/MS sustavom.



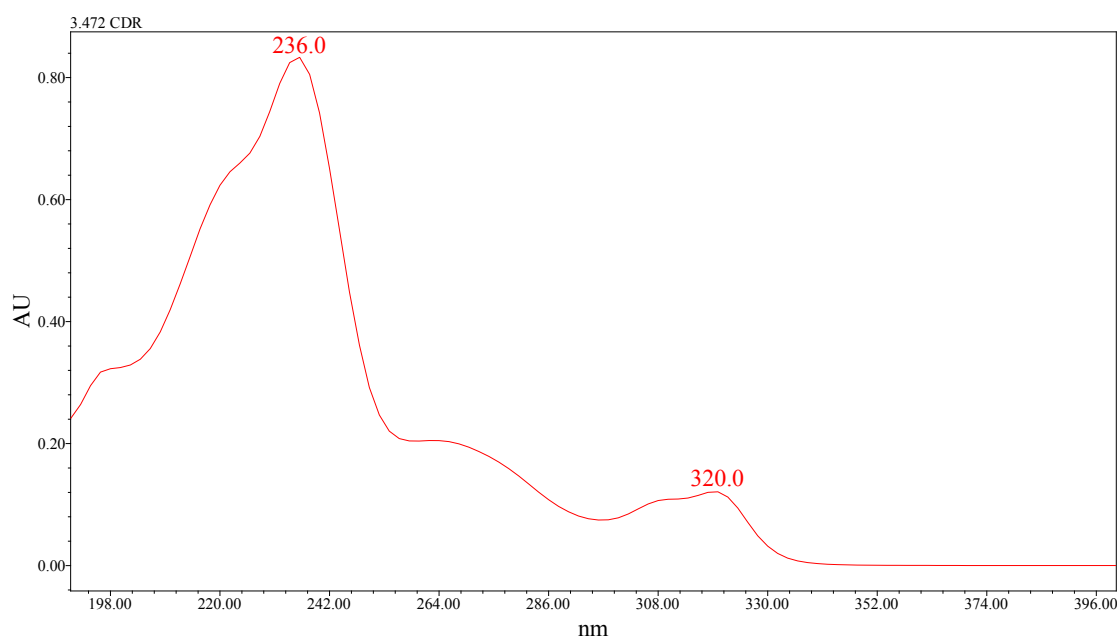
Slika 14. Kromatogram fragmenta odabranih za analizu na Q-TOF-u snimljen 2D-LC-DAD/MS

U daljnjoj 2D-LC analizi uz Q-TOF kao detektor, propušteni su odabrani fragmenti s vremenom zadržavanja: $t_R=10,635$, $t_R=13,948$, $t_R=17,222$, $t_R=20,536$, $t_R=23,854$. Tim redoslijedom su pušteni na analizu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati UHPLC analize

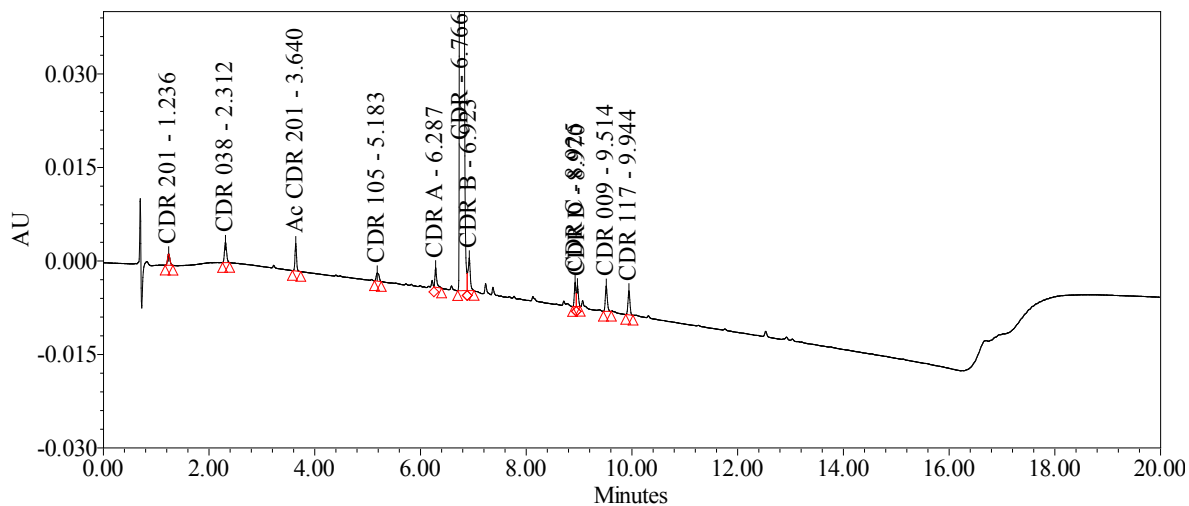
Za UHPLC analizu korišten je DAD detektor, a uzorci su snimani na valnoj duljini 236 nm. Valna duljina snimanja odabrana je na temelju snimljenog UV spektra CDR-a. Maksimum valne duljine je na 236 nm što se može vidjeti na slici 15.



Slika 15. UV spektar aktivnog spoja cediraniba

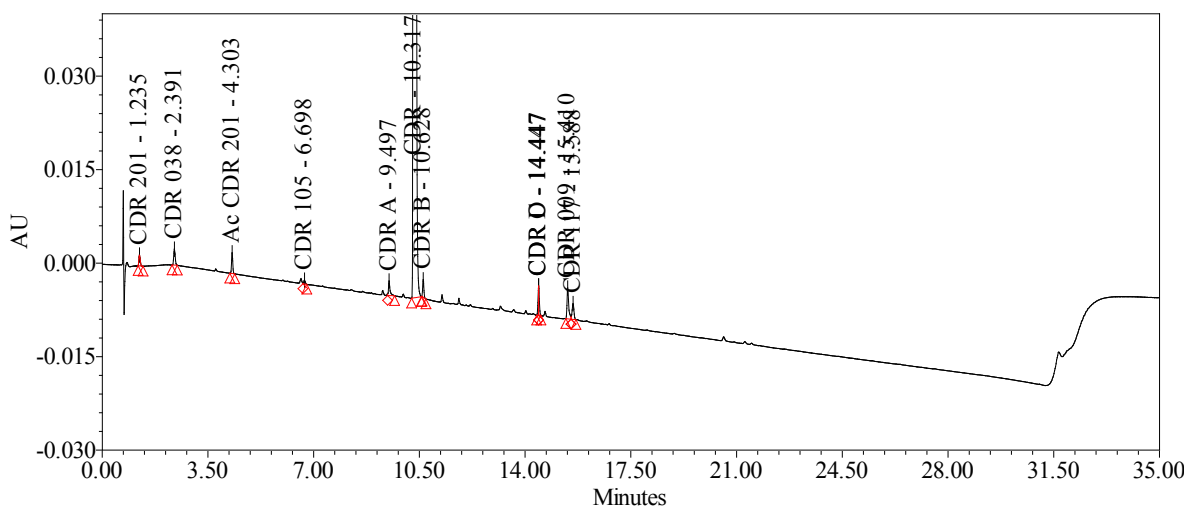
Provedeno je ukupno 12 eksperimenata u kojima su mijenjane vrijednosti tri parametra analize: temperatura kolone (30 °C i 60 °C), trajanje gradijentnog eluiranja (15 min i 30 min) i pH-vrijednost pufera (1,9, 5,8 i 9,55). Točni uvjeti mjerenja prikazani su u tablicama 4-14 u Prilogu na kraju rada.

Na slikama 16 do 27 prikazani su kromatogrami dobiveni provođenjem ukupno 12 eksperimenata u kojima su mijenjane vrijednosti tri parametra analize: temperatura kolone, trajanje gradijentnog eluiranja i pH-vrijednost pufera.



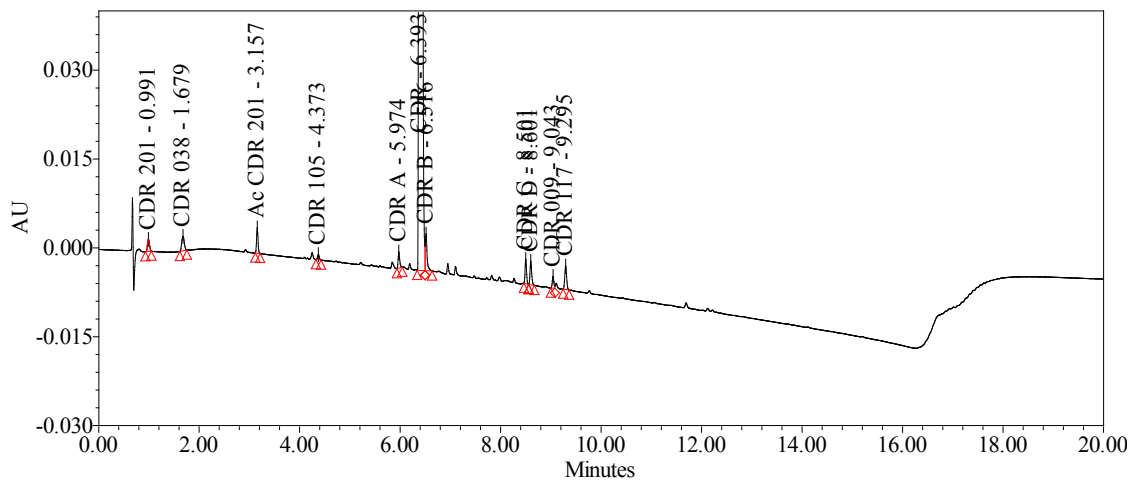
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 30C pH 2

Slika 16. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 15$ min, $T = 30$ °C, $\text{pH} = 1,9$)



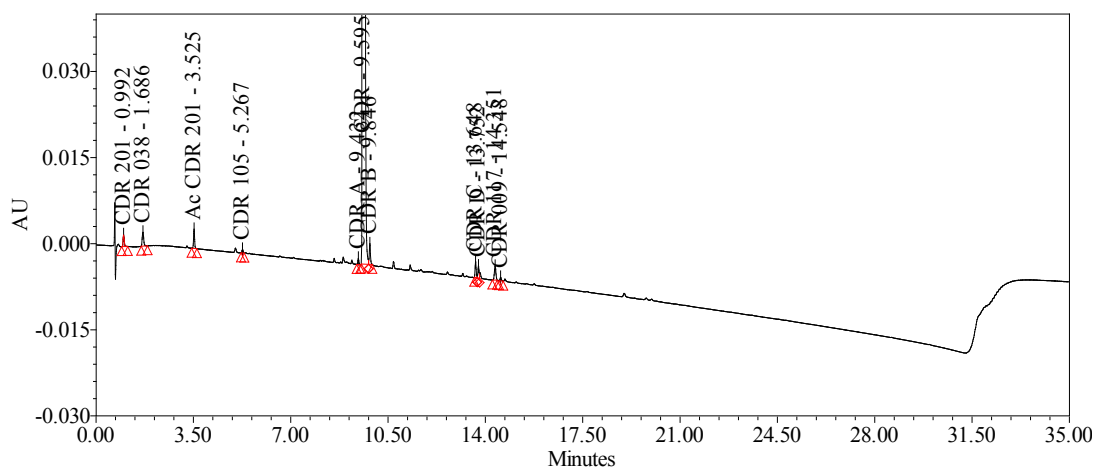
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 30C pH 2

Slika 17. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 30$ min, $T = 30$ °C, $\text{pH} = 1,9$)



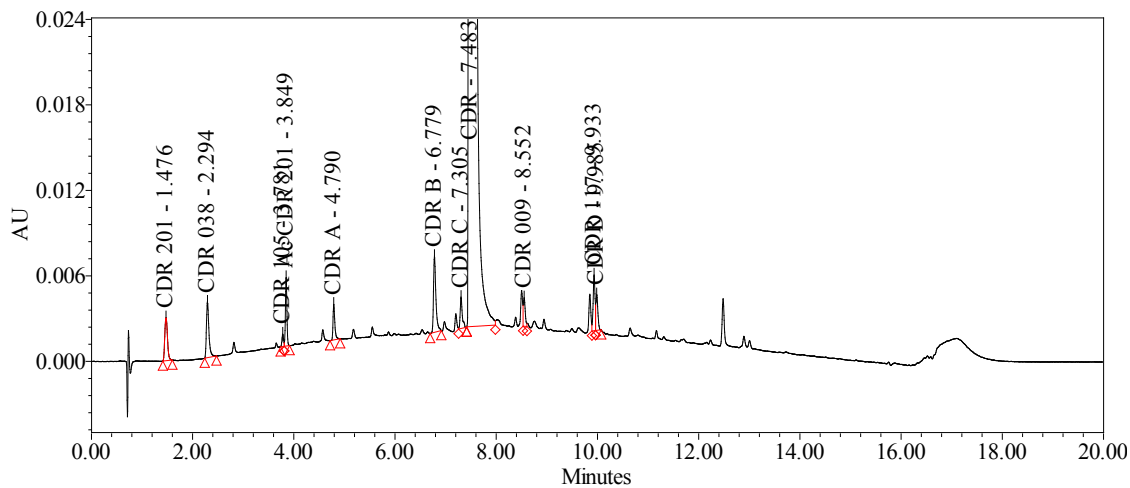
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 60C pH 2

Slika 18. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 15$ min, $T = 60$ °C, pH = 1,9)



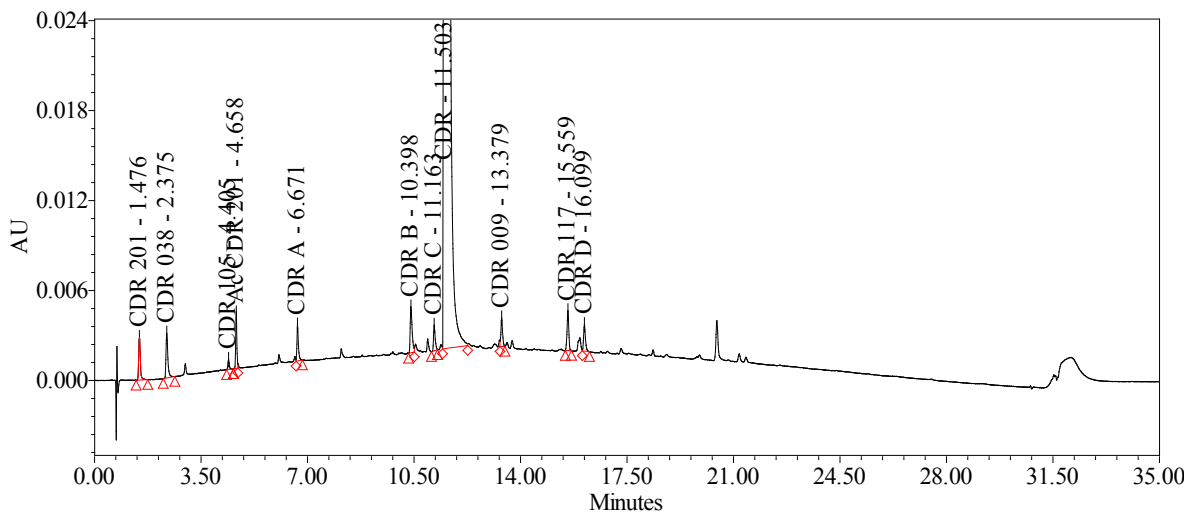
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 60C pH 2

Slika 19. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 30$ min, $T = 60$ °C, pH = 1,9)



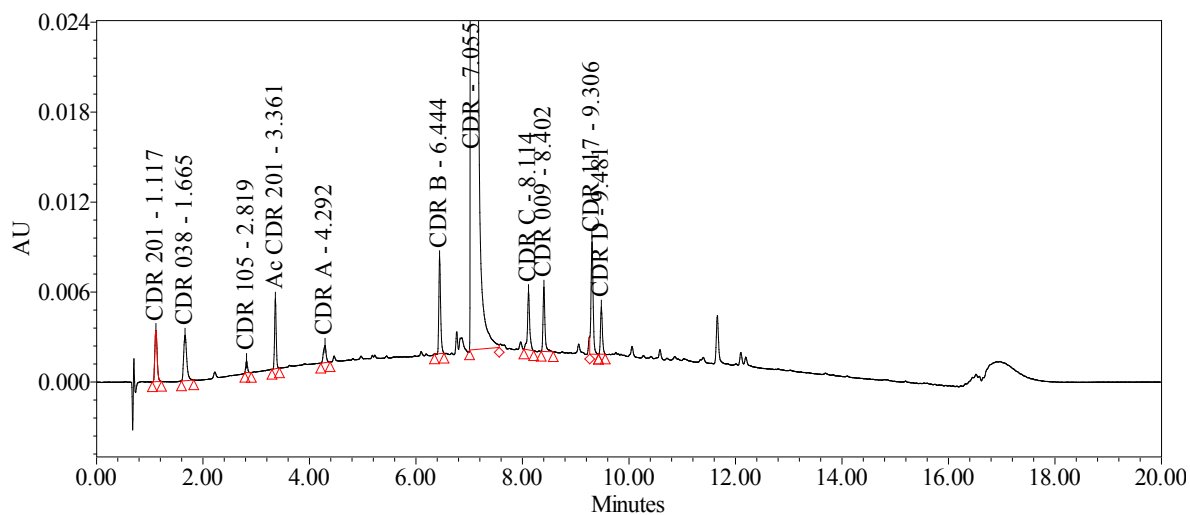
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 30C pH 6

Slika 20. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 15$ min, $T = 30$ °C, pH = 5,8)



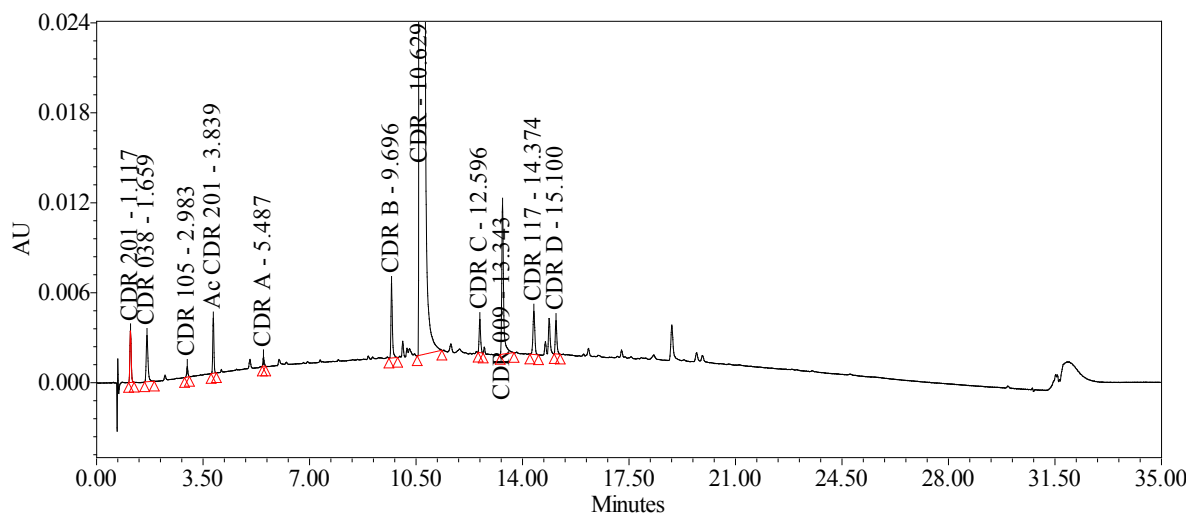
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 30C pH 6

Slika 21. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 30$ min, $T = 30$ °C, pH = 5,8)



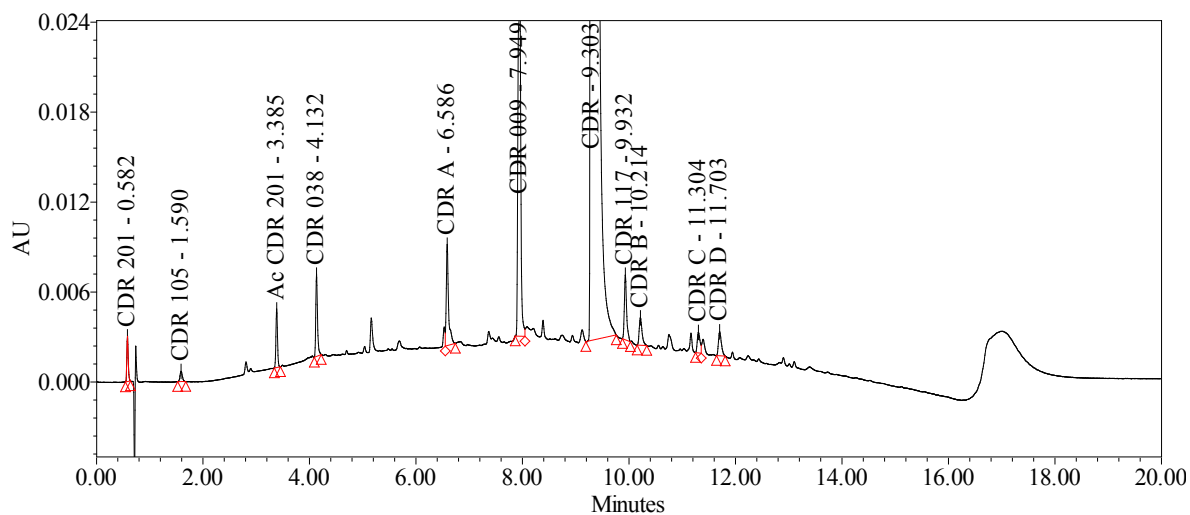
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 22. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,8$)



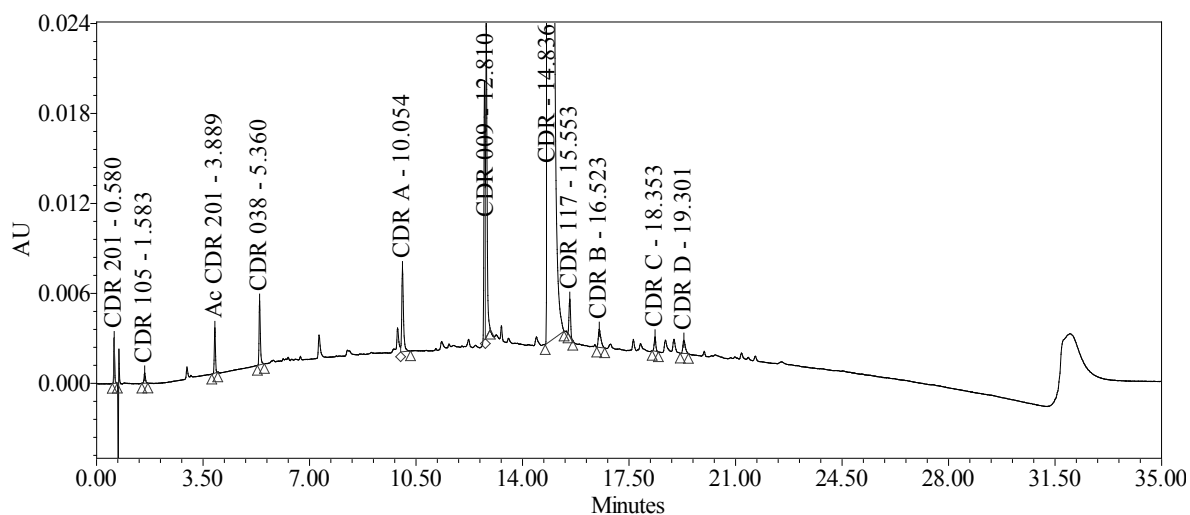
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 60C pH 6

Slika 23. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,8$)



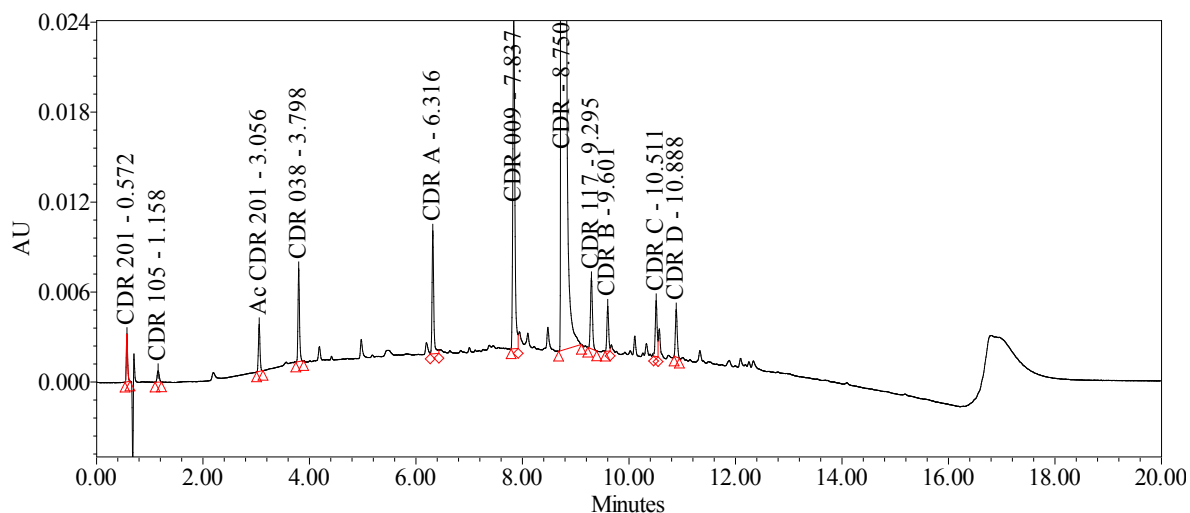
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 30C pH 9

Slika 24. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 15$ min, $T = 30$ °C, pH = 9,55)



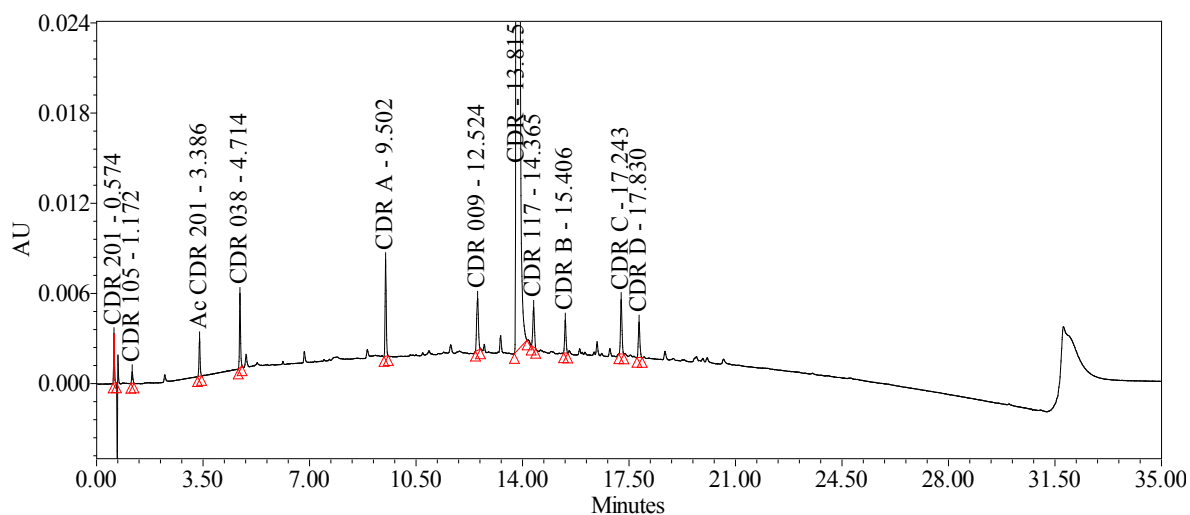
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 30C pH 9

Slika 25. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 30$ min, $T = 30$ °C, pH = 9,55)



— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 60C pH 9

Slika 26. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 15$ min, $T = 60$ °C, pH = 9,55)

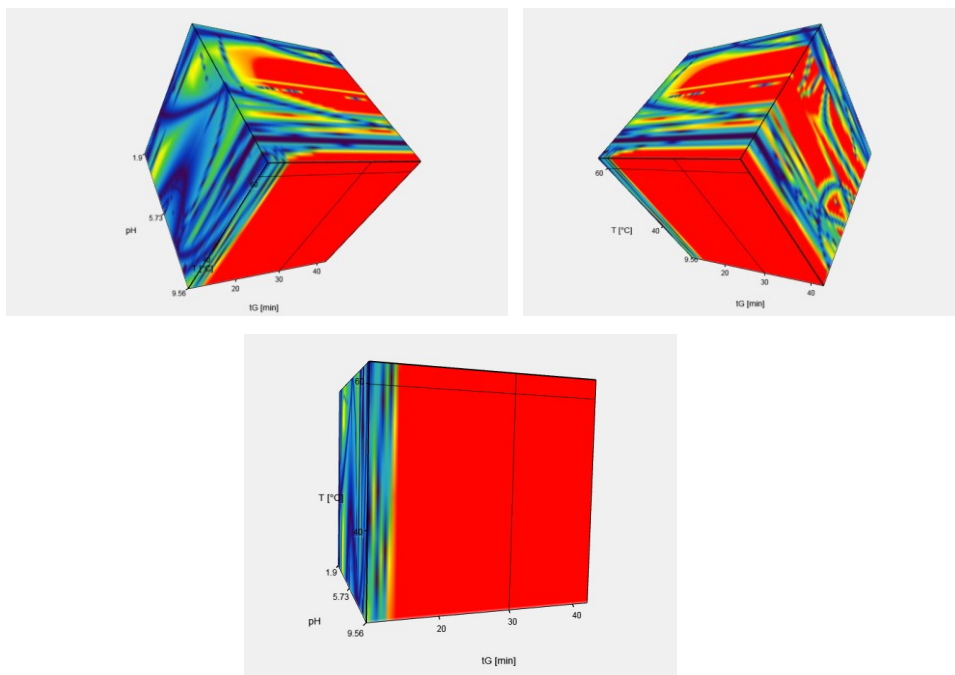


— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 60C pH 9

Slika 27. Kromatogram CDR i onečišćenja ($t = 30$ min, $T = 60$ °C, pH = 9,55)

4.2. Rezultati DryLab analize

Rezultati dobiveni UHPLC analizama u 12 eksperimenata uneseni su u računalni program DryLab. Pomoću Drylab programa dobiven je 3D model koji pokazuje ovisnost parametara t , T i pH-vrijednosti pokretne faze jedan o drugom (slika 28).



Slika 28. Grafički prikaz 3D računalnog modela dobivenog računalnim programom DryLab

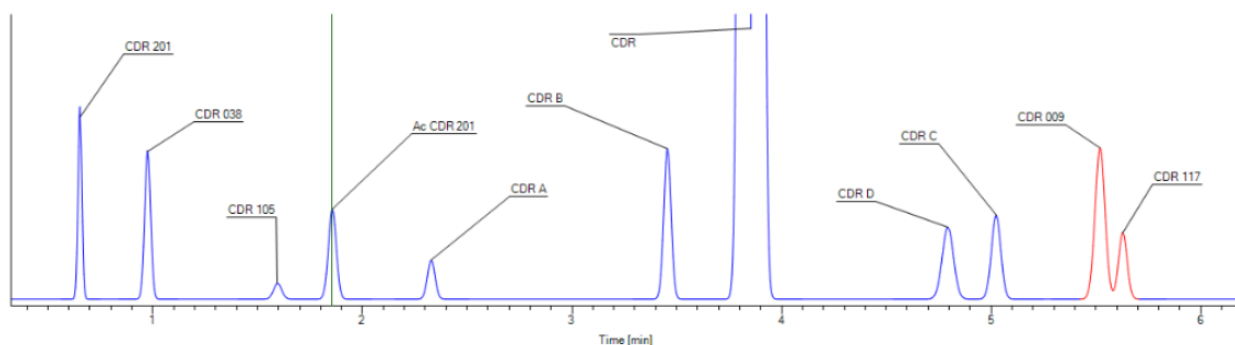
Daljnjom obradom rezultata dobiveni su optimalni uvjeti za UHPLC analizu (Tablica 6.). Kako bi smanjili vrijeme analize i dobili ujednačeno odjeljivanje, protok pokretne faze povećan je s $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ na $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Tablica 6. Optimalni uvjeti dobiveni DryLab računalnim programom pri protoku od 0,8 mL min⁻¹

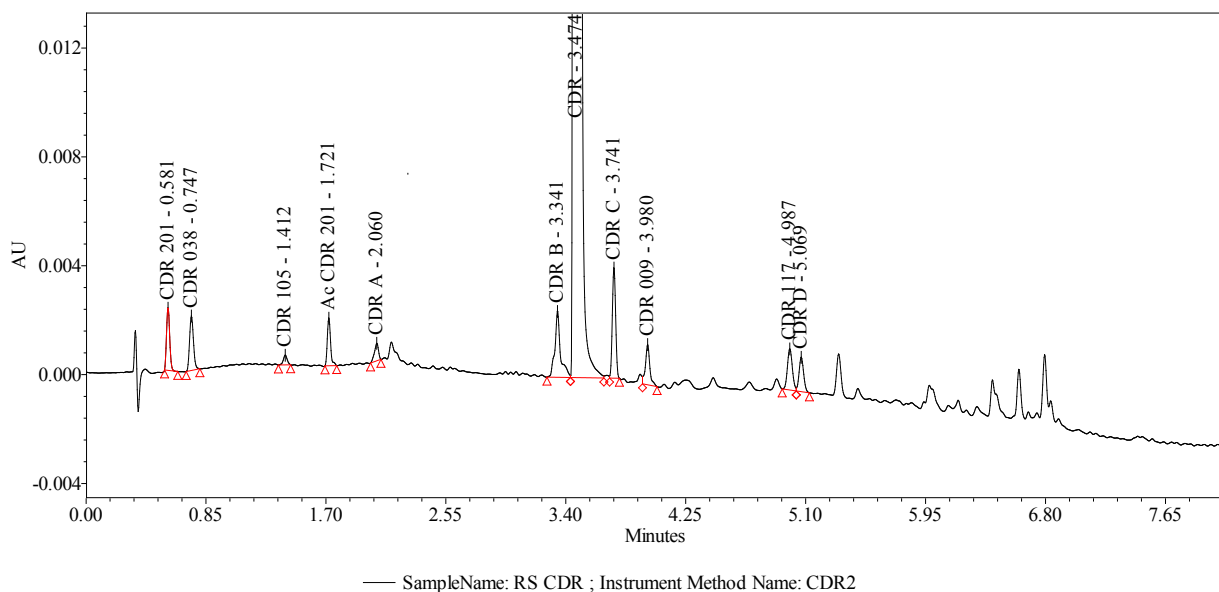
Kolona i punilo	<i>Acquity uplc[®] Beb Acquity uplc[®] Beb C18 1.7µm 2.1x100 mm</i>		
Pokretna faza A	Puffer pH=5,8		
Pokretna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	3,00	60,00	40,00
	4,00	60,00	40,00
	7,50	10,00	90,00
	7,51	90,00	10,00
	10,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,8 mL min ⁻¹		
Detektor	236 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

Koristeći podatke dobivene računalnim programom DryLab, provedena je UHPLC analiza CDR i njegovih onečišćenja prema uvjetima iz Tablice 6. Kromatogrami dobiveni pomoću DryLaba prikazani su na slici 29, a eksperimentalno dobiveni kromatogrami na slici 30. Usporedbom kromatograma dobivenih DryLab računalnim programom i kromatograma dobivenih UHPLC analizom, vidi se malo odstupanje u vremenima zadržavanja CDR i onečišćenja. To se može pripisati tome da eksperimentalni rezultati nisu identični onima dobivenim matematičkim modeliranjem. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da

je pomoću računalnog programa DryLab uspješno razvijena metoda za analizu CDR i njegovih onečišćenja.

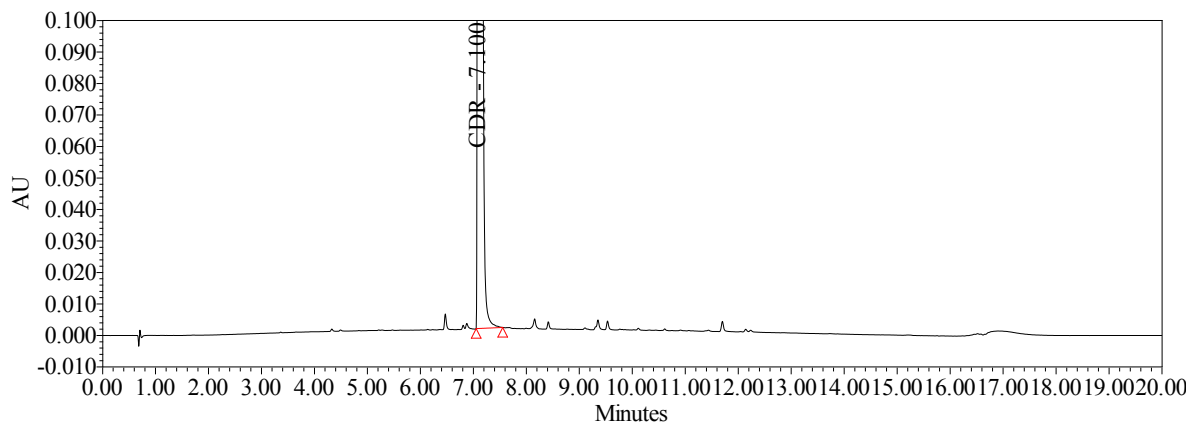


Slika 29. DryLab kromatogram ($t = 15$ min, $T = 60$ °C , pH =1,9 i protok $0,8$ mL min⁻¹)



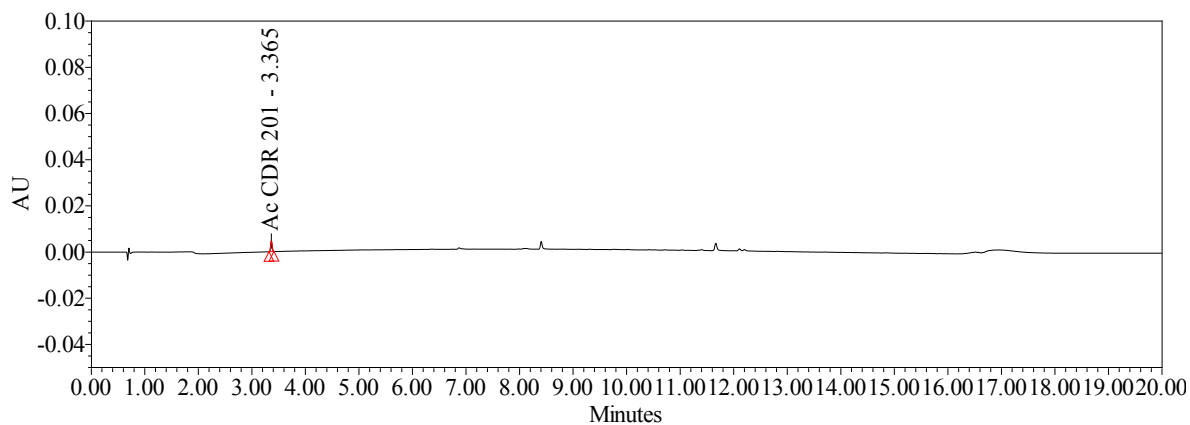
Slika 30. Kromatogram CDR i onečišćenja pri optimalnim uvjetima ($t = 15$ min, $T = 60$ °C, pH = 5,8 i protok $0,8$ mL min⁻¹)

Kromatogrami poznatih i nepoznatih onečišćenja, te glave komponente CDR dobiveni pri optimalnim uvjetima prikazani su na slikama 31 - 39.



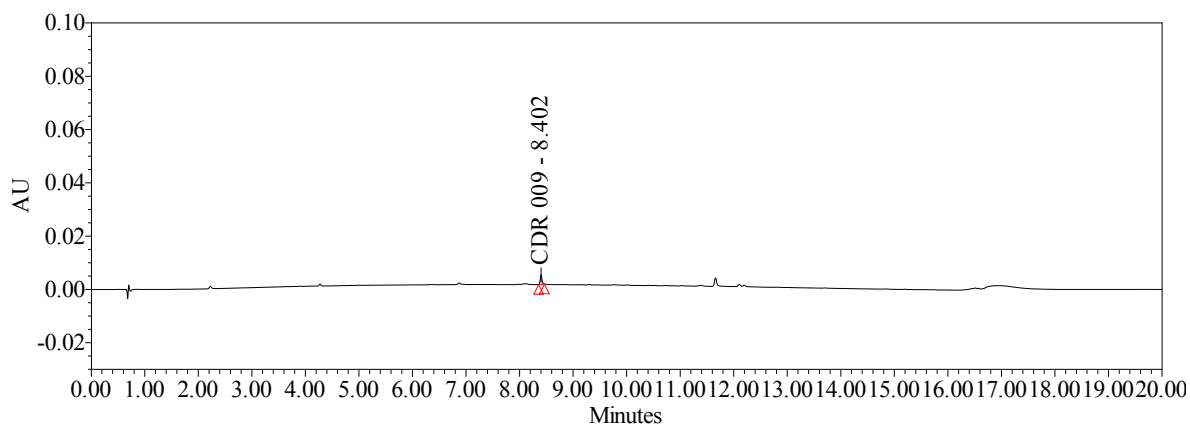
— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 31. Kromatogram CDR ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



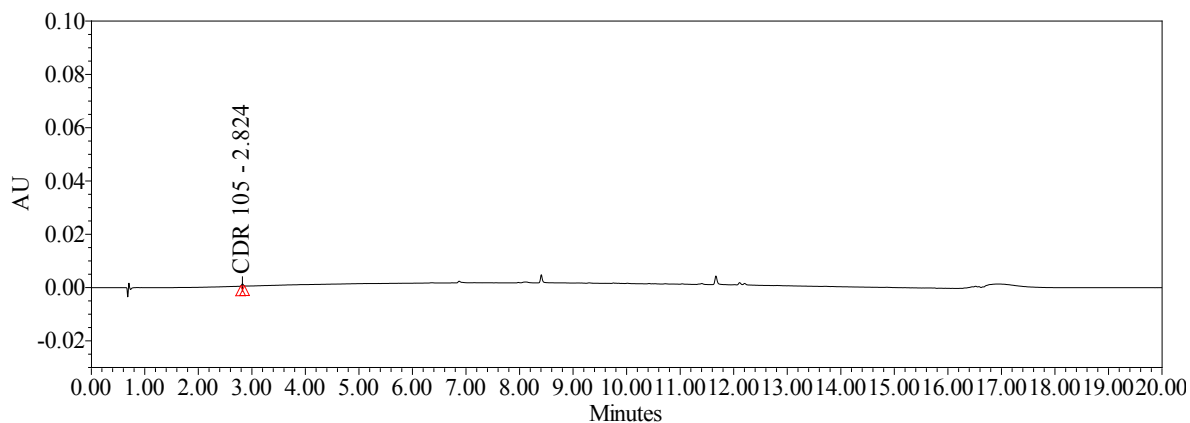
— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 32. Kromatogram onečišćenja Ac-CDR 201 ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



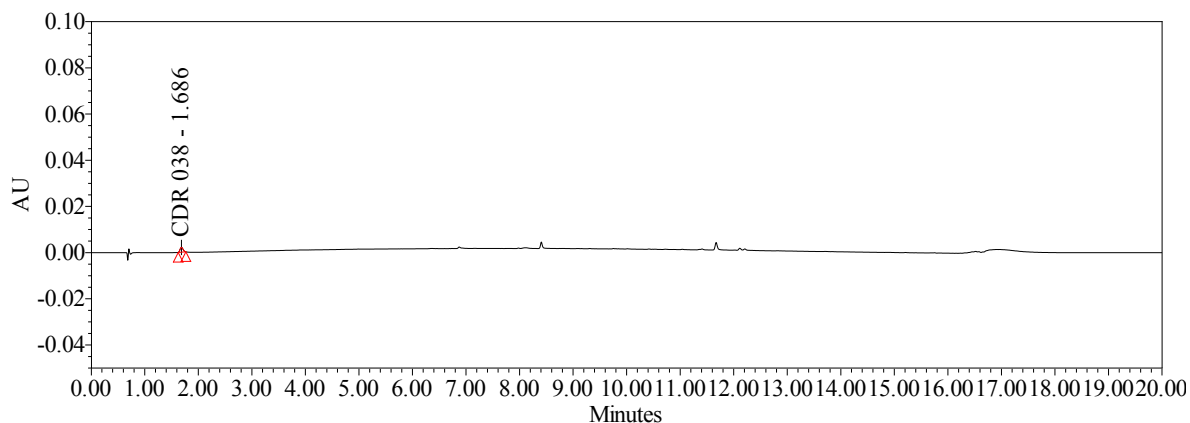
— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 33. Kromatogram onečišćenja CDR 009 ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



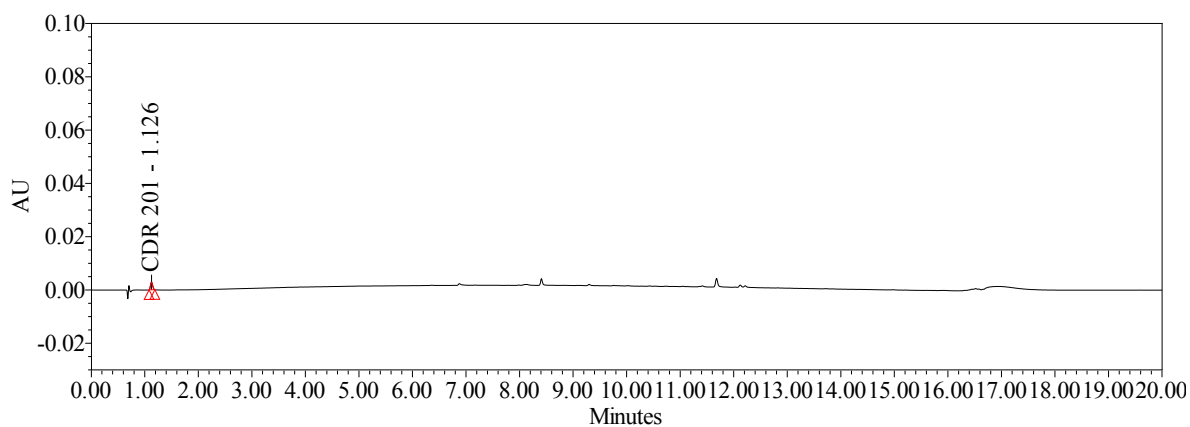
— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 34. Kromatogram onečišćenja CDR 105 ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



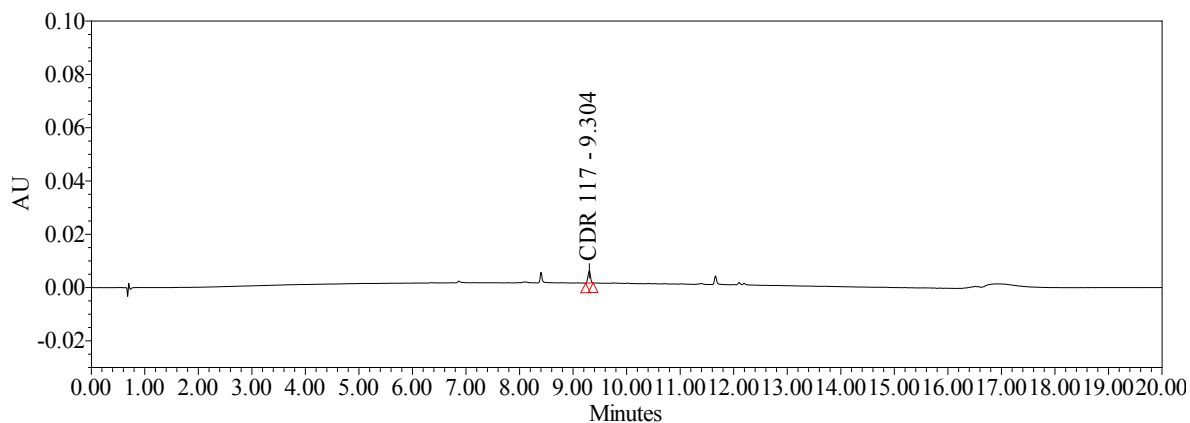
— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 35. Kromatogram onečišćenja CDR 038 ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



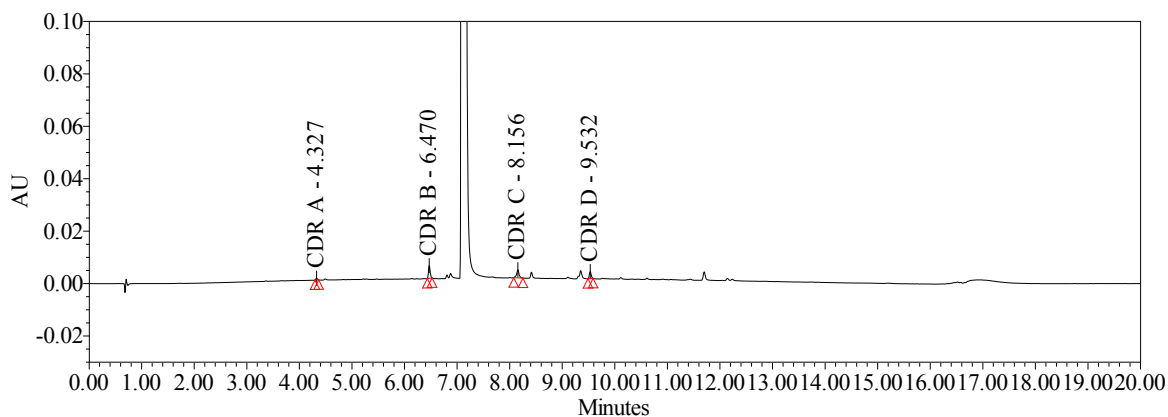
— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 36. Kromatogram onečišćenja CDR 201 ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



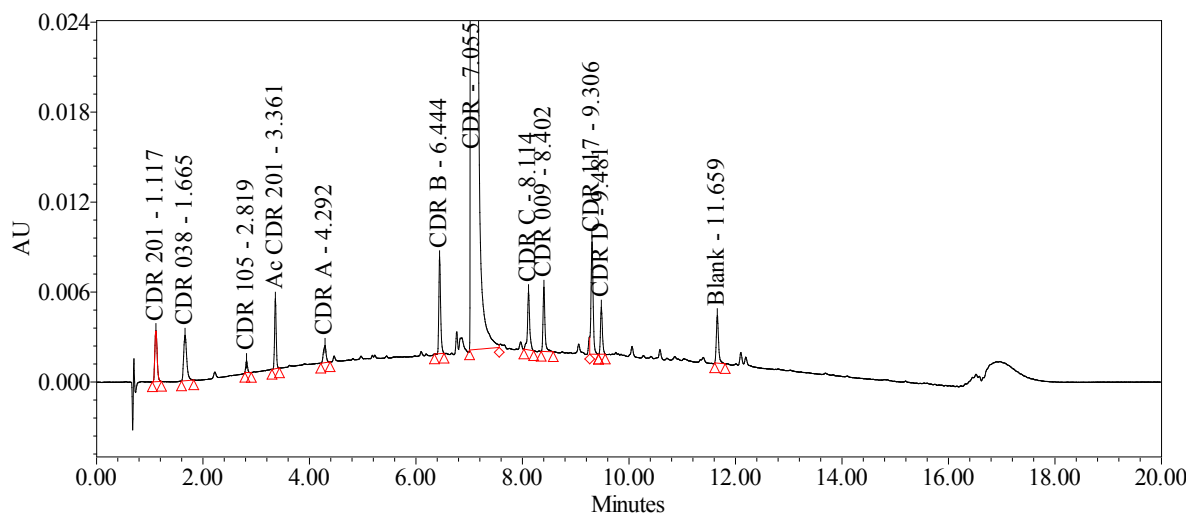
— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 37. Kromatogram onečišćenja CDR 117 ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



— Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 38. Kromatogram nepoznatih onečišćenja CDR A, CDR B, CDR C i CDR D ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)



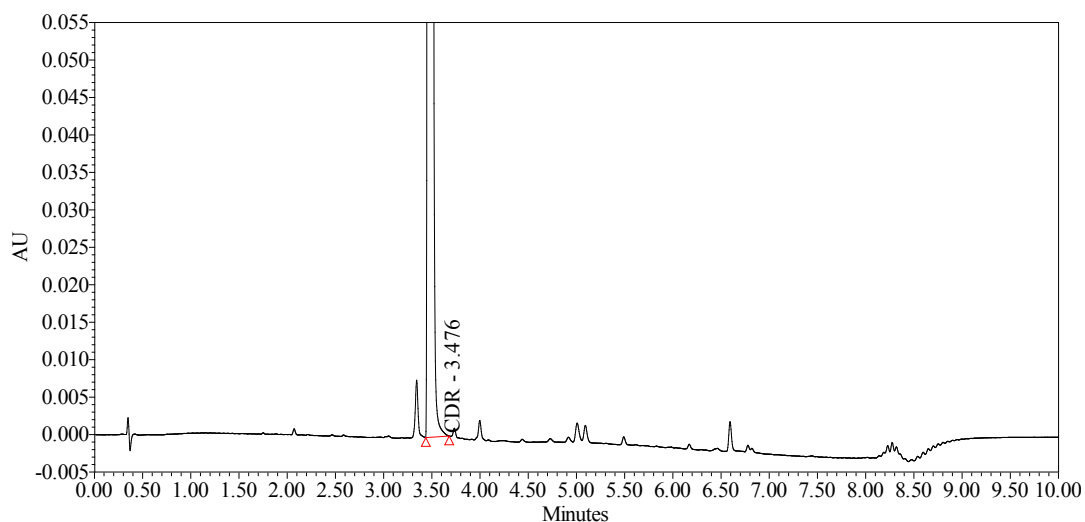
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 60C pH 6

Slika 39. Kromatogram rezolucijske otopine ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)

Kromatogrami dobiveni pri drugim eksperimentalnim uvjetima prikazani su u dodatku na kraju rada (Prilog Slika D1 – Slika D9).

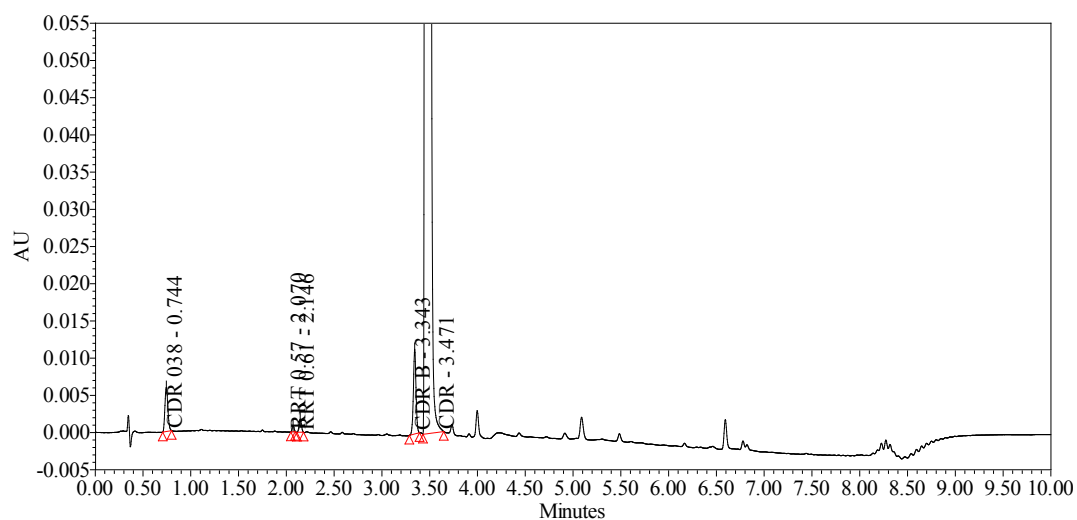
4.3. Prisilna razgradnja cediraniba

Kao kontrolni uzorak snimljen je kromatogram otopine CDR koncentracije 1 mg mL^{-1} (slika 40) .

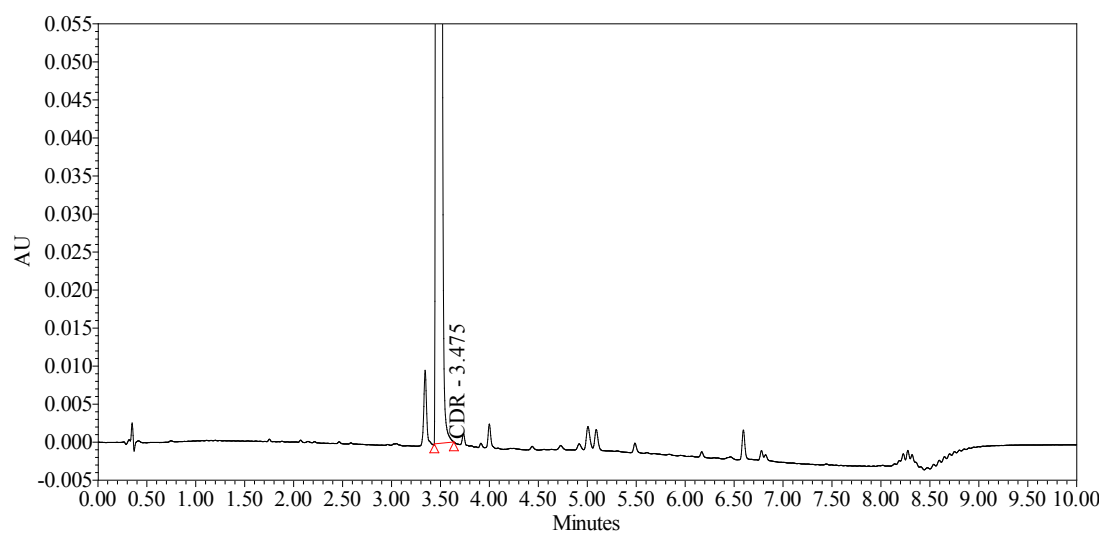


Slika 40. Kromatogram otopine cediraniba koncentracije 1 mg mL^{-1} ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8

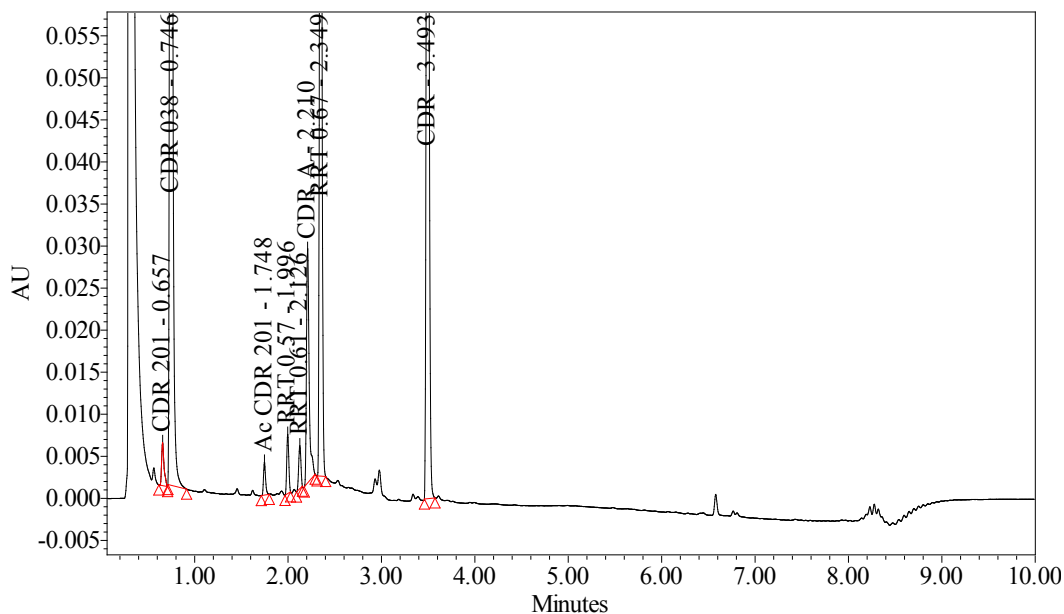
Rezultati dobiveni prisilnom razgradnjom prikazani su na slikama 41 - 43.



Slika 41. Kromatogram otopine CDR podvrgnute prisilnoj razgradnji u $5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$
($t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 5,8$)



Slika 42. Kromatogram otopine CDR podvrgnute prisilnoj razgradnji u $5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$
($t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 5,8$)



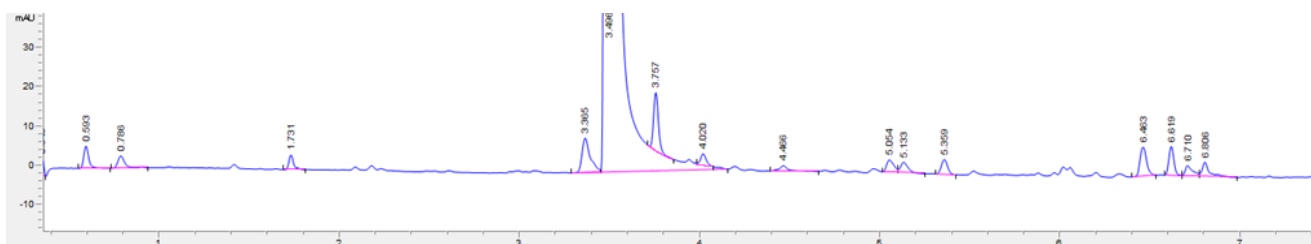
Slika 43. Kromatogram otopine CDR podvrgnute prisilnoj razgradnji u 30% H₂O₂
($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8)

Ovim analizama uspješno je potvrđeno da pri određenim uvjetima prisilne razgradnje CDR-a nastaju razgradni produkti. Prema slici 40. i 41. vidi se da je pik glavne komponente CDR smanjen u odnosu na kromatogram kontrolnog uzorka prikazanog na slici 40. što je dokaz njegove razgradnje. Kao razgradni produkti CDR-a tretiranog s kiselinom, uz poznato procesno onečišćenja CDR 038 nastaju dva nova pika na relativnim vremenima zadržavanja RRT 0,57 i RRT 0,61. Kada se CDR tretira s peroksidom nastaju 4 pika poznatih onečišćenja: CDR 201, CDR 038, CDR A i Ac CDR 201, te tri nova pika: RRT 0,57, RRT 0,61 i RRT 0,67. U slučaju tretiranja CDR s lužinom ne dolazi do razgradnje CDR (slika 42).

4.4. Rezultati 2D-LC analize

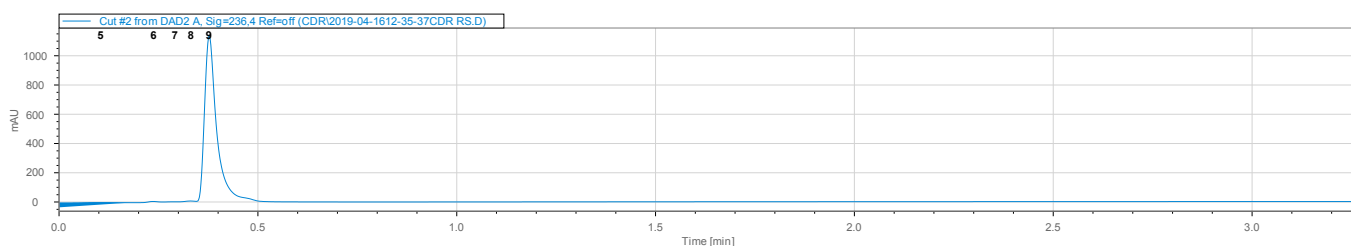
2D-LC-MS analiza korištena je za određivanje m/z vrijednosti razgradnih produkata i predviđanja njihove strukture, te za testiranje čistoće pikova.

Rezolucijska otopina inicijalno je injektirana u prvu dimenziju pri čemu je dobiven rezultat sličan rezultatu dobivenom metodom UHPLC-DAD (slika 44.).



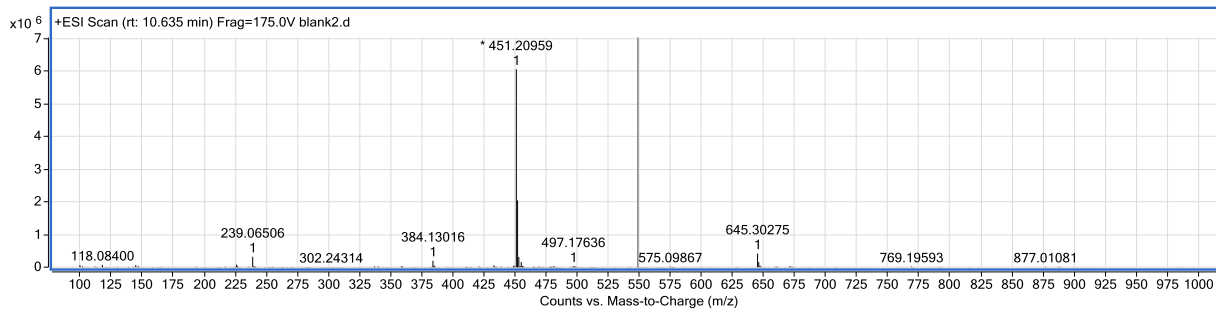
Slika 44. Kromatogram rezolucijske otopine dobiven metodom 2D-LC u prvoj dimenziji koristeći DAD detektor

Na slici 45. prikazan je kromatogram snimljen 2D-LC metodom odabrane frakcije 2 (odabrane frakcije prikazane su u poglavlju 3.3.3. Q-TOF analiza). Prema dobivenom kromatogramu može se zaključiti da je pik glavne komponente CDR čist i da ne dolazi do preklapanja s pikovima drugih spojeva.

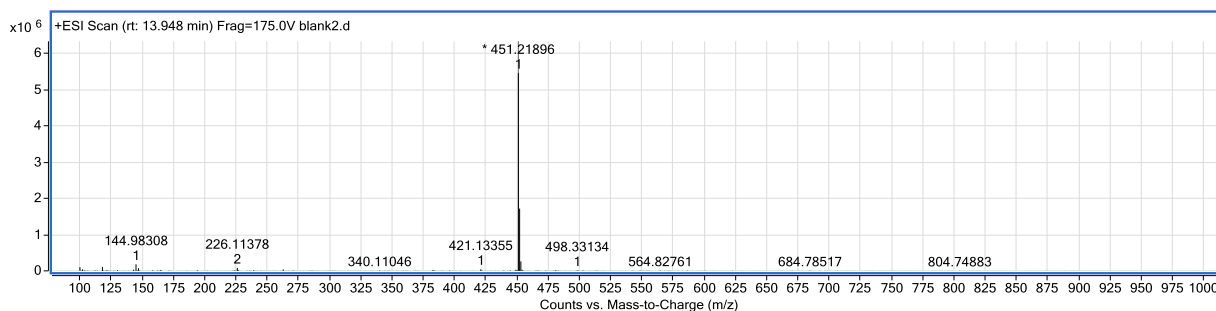


Slika 45. Kromatogram 2. fragmenta CDR-a snimljen 2D-LC metodom koristeći DAD detektor

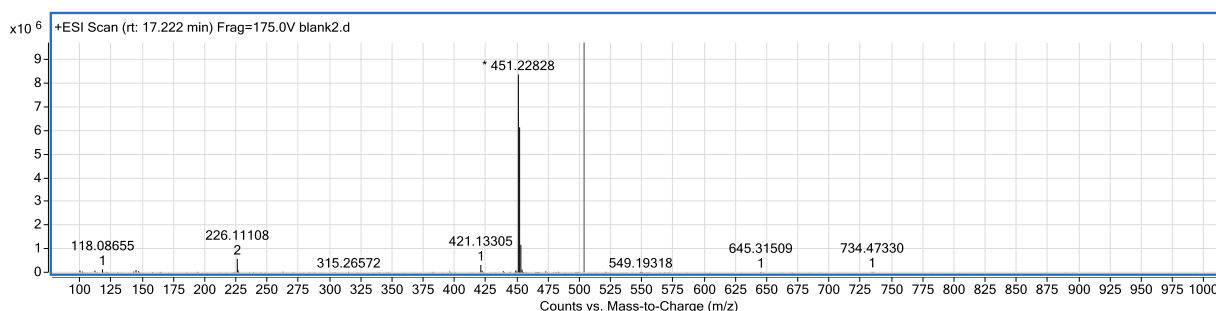
Molekulska masa glavne komponente CDR razlikuje se na drugoj decimali (slika 46-50). Uzrok tomu mogu biti dva susjedna pika koja izlaze neposredno prije i poslije CDR-a. Prisutnost tih pikova može se vidjeti na slici 30. Razlika u drugoj decimali prihvatljiva je, te se prema dobivenim rezultatima dodatno može potvrditi čistoća glavnog pika.



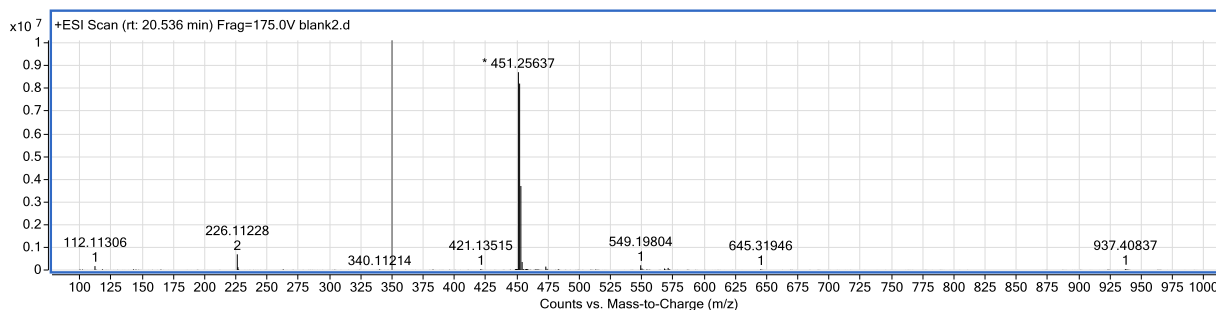
Slika 46. Spektar masa cediraniba ($t_R=10,635$)



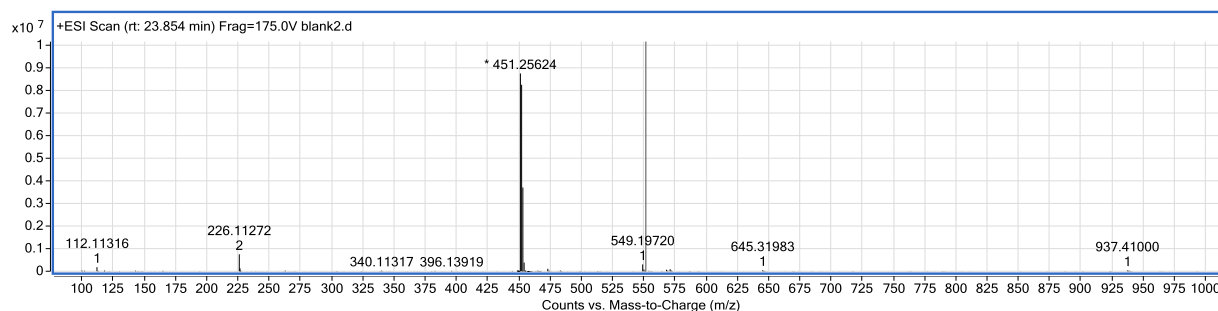
Slika 47. Spektar masa cediraniba ($t_R=13,948$)



Slika 48. Spektar masa cediraniba ($t_R=17,222$)



Slika 49. Spektar masa cediraniba ($t_R=20,536$)



Slika 50. Spektar masa cediraniba ($t_R=23,854$)

Za uzorke prisilne razgradnje i rezolucijske otopine, snimljeni su spektri masa razgradnih produkata, te poznatih i nepoznatih onečišćenja. Uzorci su snimljeni u pozitivnom ili negativnom modu, ovisno o uvjetima pri kojima molekula ionizira. Svi MS spektri prikazani su u Prilogu (slike D49-D56).

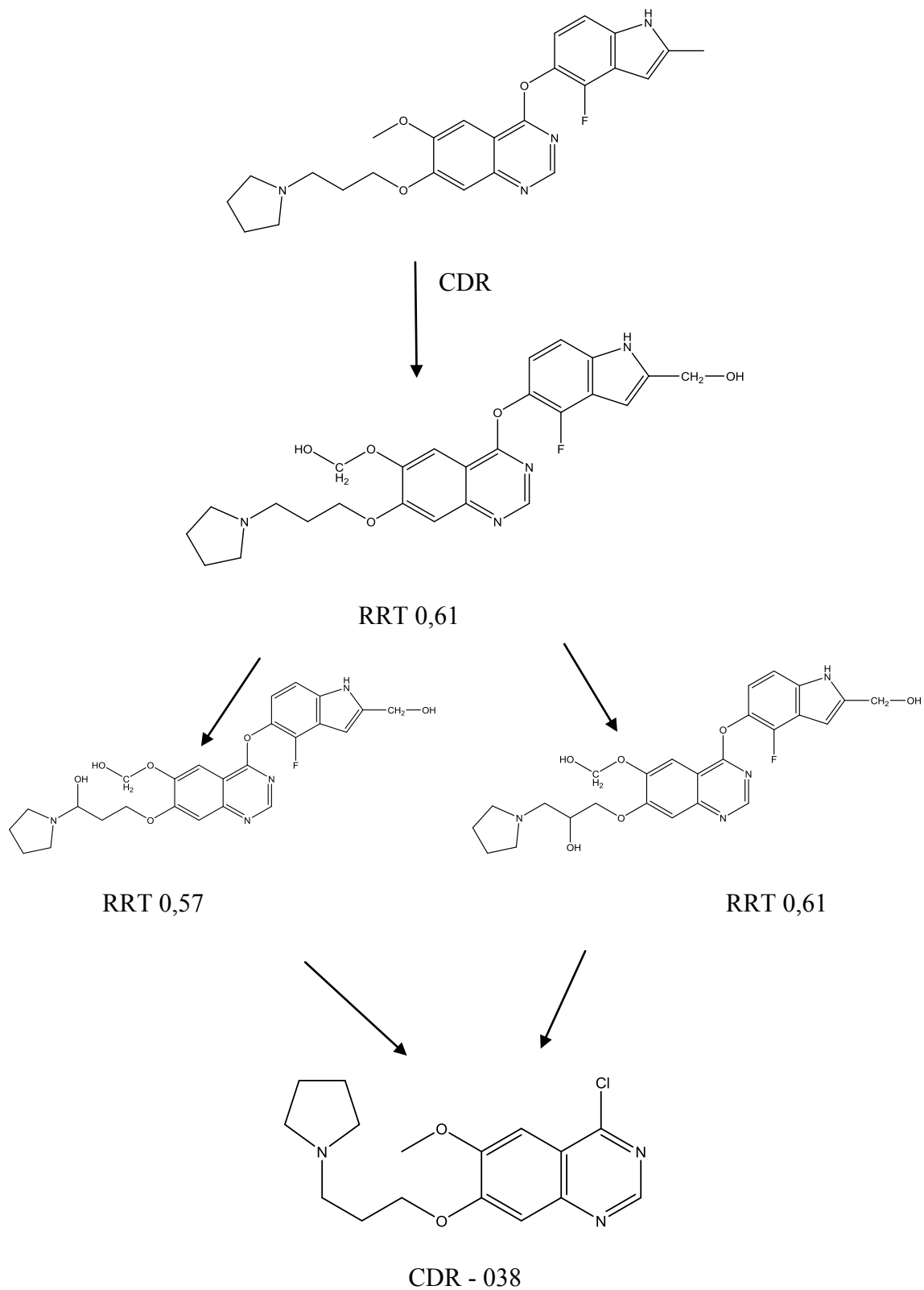
Za točno definiranje molekulske strukture nepoznatih onečišćenja CDR A, CDR B i CDR C potrebno je napraviti NMR i IR analize.

U Tablici 7. prikazana su molekulske mase snimljenih uzoraka.

Tablica 7. Molekulske mase razgradnih produkata

Naziv spoja	Molekulska masa
CDR – 201	192.10
Ac-CDR-201	218.09
CDR-038	321.81
CDR-105	213.16
CDR A	277.15
CDR B	449.20
CDR-009	Ne ionizira
CDR D	541.13
CDR-117	300,96
CDR C	340.04
RRT 0.57	499.07
RRT 0.61	483.16
RRT 0.67	499.12

Najveći stupanj razgradnje primijećen je pri prisilnoj razgradnji s vodikovim peroksidom. Predloženi put razgradnje cediraniba pri kiseloj i oksidativnoj razgradnji prikazan je na slici 51.



Slika 51. Prikaz moguće fragmentacije cediraniba na razgradne produkte

5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je razviti učinkovitu metodu za analizu aktivne farmaceutске tvari cediraniba, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata. Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu, te određivanje onečišćenja i razgradnih produkata cediraniba, korišten je tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (UHPLC-DAD).

Na samom početku provedeno je 12 eksperimenata u kojima su mijenjani eksperimentalni uvjeti: temperatura kolone, pH-vrijednost i sastav pokretne faze te vrijeme trajanja eksperimenta. Dobiveni rezultati uneseni su u računalnim programom DryLab pomoću kojeg su određeni optimalni uvjeti UHPLC analize. Dobiveni su sljedeći optimalni uvjeti: gradijentno eluiranje uz trajanje analize 15 minuta, temperatura kolone 60 °C i pH pokretne faze 5,8. Dobiveni optimalni parametri analize provjereni su UHPLC analizom te su korišteni za analizu uzoraka cediraniba nakon provedene prisilne razgradnje i za 2D-LC analize. Time je uspješno razvijena metoda za određivanje onečišćenja i razgradnih produkata cediraniba. DryLab se pokazao kao dobar program za optimiranje eksperimentalnih uvjeta analize kojim se znatno skraćuje vrijeme potrebno za razvoj metode.

Prisilna razgradnja provedena je u kiselom i lužnatom mediju, te pomoću oksidacijskog sredstva vodikovog peroksida. UHPLC-DAD analizom potvrđeno je da nastaju razgradni produkti pri određenim uvjetima prisilne razgradnje. Cediranib se razgrađuje u kiselom mediju te oksidacijom u peroksidu. Tretiranjem cediraniba lužinom ne dolazi do nastanka razgradnih produkata.

Snimanje glavne komponente cediranib 2D-LC-DAD metodom, potvrđena je čistoća glavnog pika, tj. potvrđeno je da ne dolazi do preklapanja pika glavne komponente i nekog drugog onečišćenja. Time je dodatno dokazano da je odabrana metoda učinkovita kod odvajanja komponente CDR od ostalih poznatih i nepoznatih onečišćenja.

Za analizu razgradnih produkata korištena je 2D-LC-MS analiza. Na temelju MS spektara pretpostavljene su strukture razgradnih produkata i način fragmentacije. Također, snimljeni su spektri masa poznatih i nepoznatih onečišćenja.

Prema dobivenim rezultatima UHPLC-DAD i 2D-LC-MS analiza, može se zaključiti da je uspješno razvijena brza i učinkovita UHPLC metoda za analizu onečišćenja i razgradnih produkata aktivne farmaceutске tvari cediraniba.

6. LITERATURA

1. ICH International Conference on Harmonization, Impurities in new drug substances Q3A (R2), Geneva, 2006.
2. ICH International Conference on Harmonization, Impurities in new drug products Q3B (R2), Geneva, 2006.
3. ICH International Conference on Harmonization, Impurities Guideline for metal impurities Q3D, Geneva, 2009.
4. M. Sertić, Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2013.
5. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04849> (pristup 5. travnja 2019.)
6. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cediranib> (pristup 5. travnja 2019.)
7. M. Hranjec, Heterociklički antitumorski lijekovi, Inhibitori protein kinaza, Studeni, 2018.
8. M. Runje, Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari Nepafenaku, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2018.
9. Z. Lasić, Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu razgradnih produkata lijeka Elvitegravira, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2018.
10. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
11. N. Galić, V. Drevenkar, Instrumentna analitika, Kromatografija, interna skripta, Prirodoslovno-matematički fakultet, Odsjek za kemiju, Zagreb, 2006.
12. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina*, 45 (2009) 218–232.

13. S. K. Bhardwaj, K. Dwivedi, D. D. Agarwal, HPLC method development and validation, *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5 (2015) 7–81.
14. I. Ursić, Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće Nepafenka, Specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.
15. A. Horvatić, M. Cindrić, Analysis of therapeutic peptides by mass spectrometry, *Medicina*, 45 (2009) 258–263.
16. B. Car-Pavlic, Razvoj UHPLC metode za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.
17. P. Novak, T. Jednačak, Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama, TIVA Tiskara, Varaždin, 2014, str. 78–89.
18. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: Principles and applications*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007.
19. J. Lovrić, pH i puferi, *Medicinar* 45 (2004) 203, <http://medicinar.mef.hr/pdf/puferi.pdf> (pristup 25.06.2019.)
20. J. Dolan, A guide to HPLC and LC-MS buffer selection, *ACE HPLC Columns*, 2006.
21. <http://molnar-institute.com/drylab/> (pristup 20.06.2019.)
22. I. Molnar, Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software, *Journal of Chromatography A*, 965 (2002) 175–194.
23. K. Jayaraman, A. J. Alexander, Y. Hu, F. P. Tomasella, A stepwise strategy employing automated screening and DryLab modeling for the development of robust methods for challenging high performance liquid chromatography separations: a case study, *Analytica Chimica Acta*, 696 (2011) 116–124.
24. J. Terzić, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, Aspekti primene DryLab® softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda, *Arhiv za farmaciju*, 64 (2014) 205–219.

7. PRILOZI

7.1. Uvjeti za UHPLC analizu

Tablica P1. Eksperimentalni uvjeti drugog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	0,1% TFA pH = 1,9
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	30 °C
Vrijeme analize	30 min

Tablica P2. Eksperimentalni uvjeti trećeg pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	0,1% TFA pH = 1,9
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	60 °C
Vrijeme analize	15 min

Tablica P3. Eksperimentalni uvjeti četvrtog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	0,1% TFA pH = 1,9
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	60 °C
Vrijeme analize	30 min

Tablica P4. Eksperimentalni uvjeti petog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH ₄ OAc pH = 5,8
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	30 °C
Vrijeme analize	15 min

Tablica P5. Eksperimentalni uvjeti šestog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH ₄ OAc pH = 5,8
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	30 °C
Vrijeme analize	30 min

Tablica P6. Eksperimentalni uvjeti sedmog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH ₄ OAc pH = 5,8
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	60 °C
Vrijeme analize	15 min

Tablica P7. Eksperimentalni uvjeti osmog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH ₄ OAc pH = 5,8
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	60 °C
Vrijeme analize	30 min

Tablica P8. Eksperimentalni uvjeti devetog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH ₄ HCO ₂ pH = 9,55
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	30 °C
Vrijeme analize	15 min

Tablica P9. Eksperimentalni uvjeti desetog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH ₄ HCO ₂ pH = 9,55
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	30 °C
Vrijeme analize	30 min

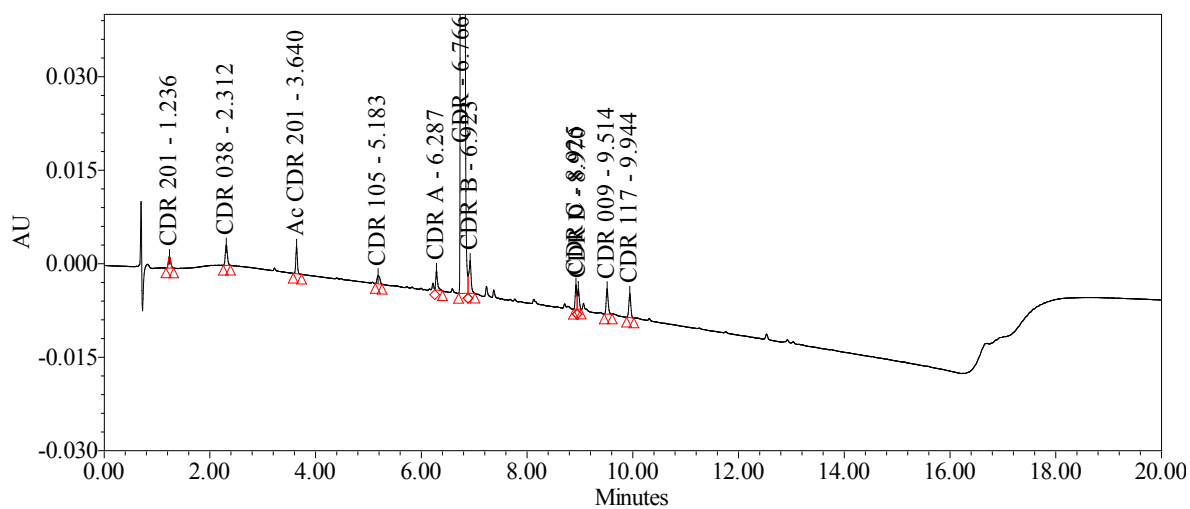
Tablica P10. Eksperimentalni uvjeti jedanaestog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH_4HCO_2 pH = 9,55
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	60 °C
Vrijeme analize	15 min

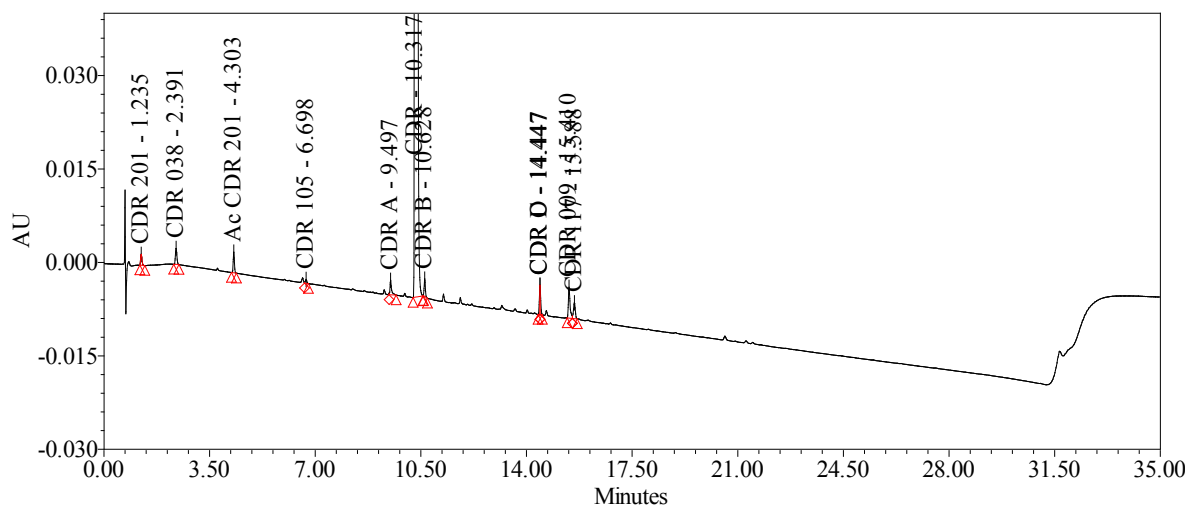
Tablica P11. Eksperimentalni uvjeti dvanaestog pokusa za UHPLC analizu

Pokretna faza A	10 mmol/L NH_4HCO_2 pH = 9,55
Pokretna faza B	ACN
Temperatura kolone	60 °C
Vrijeme analize	30 min

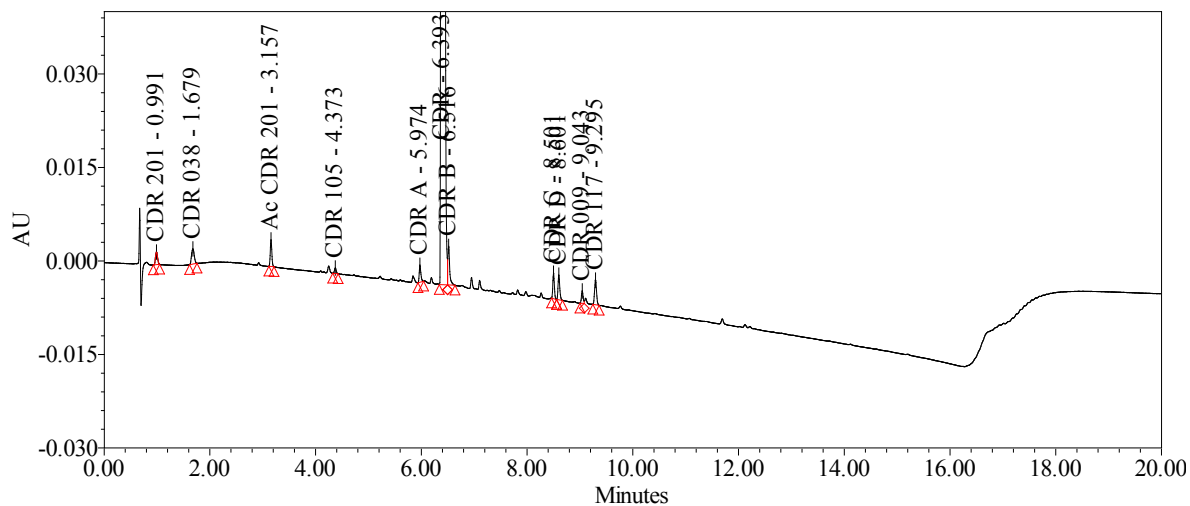
7.2. Kromatogrami CDR i onečišćenja za početnih 12 eksperimenata UHPLC analizom



Slika D1. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i pH = 1,9

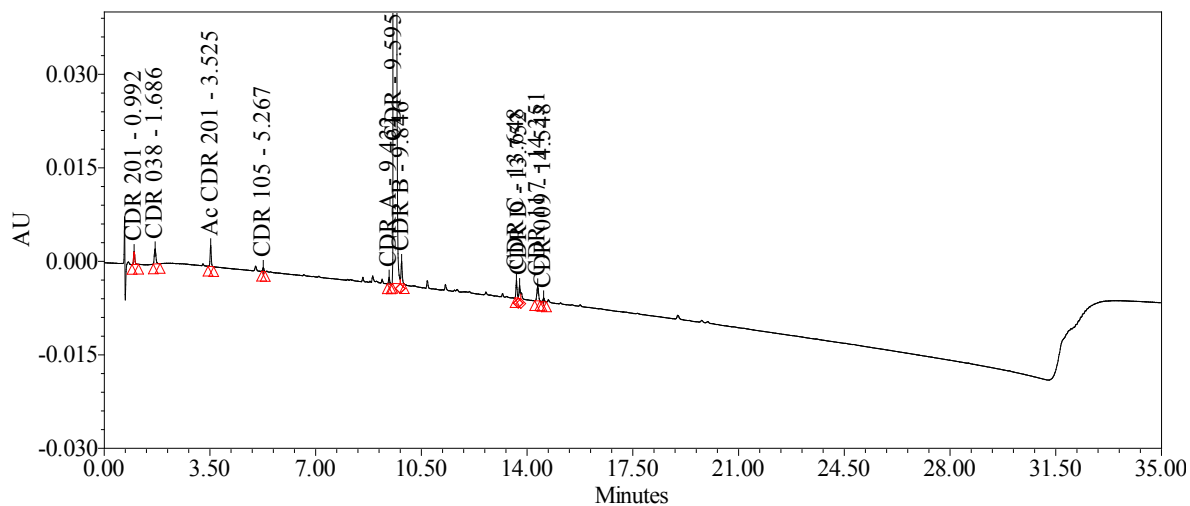


Slika D2. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 1,9



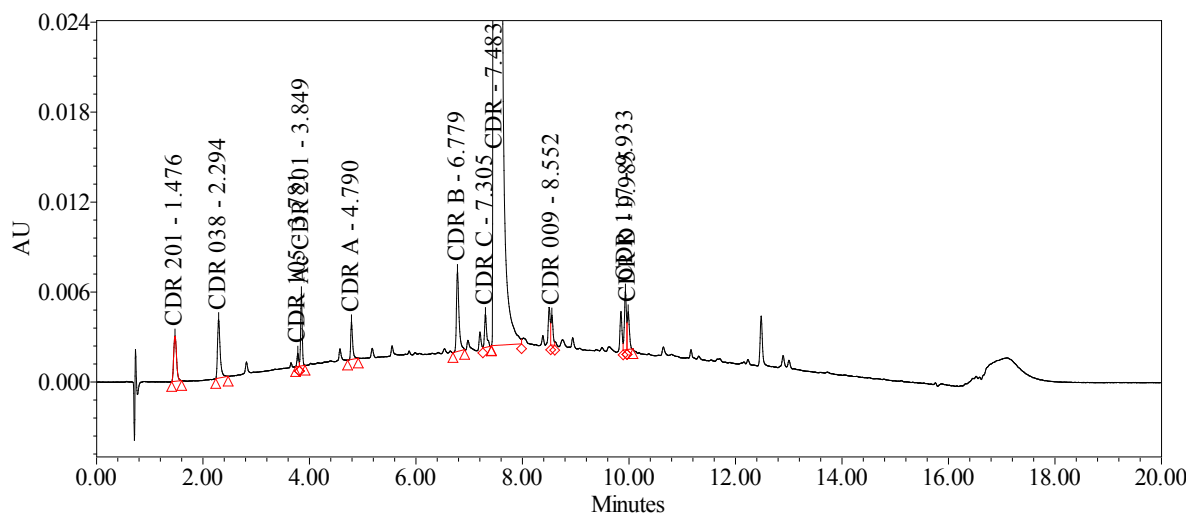
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 60C pH 2

Slika D3. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 1,9$



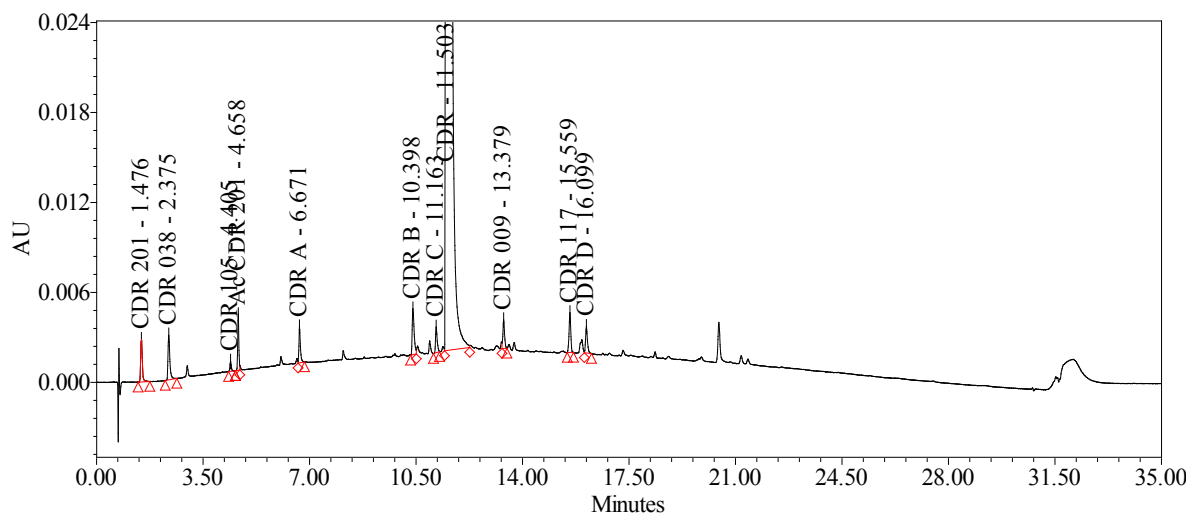
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 60C pH 2

Slika D4. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 1,9$



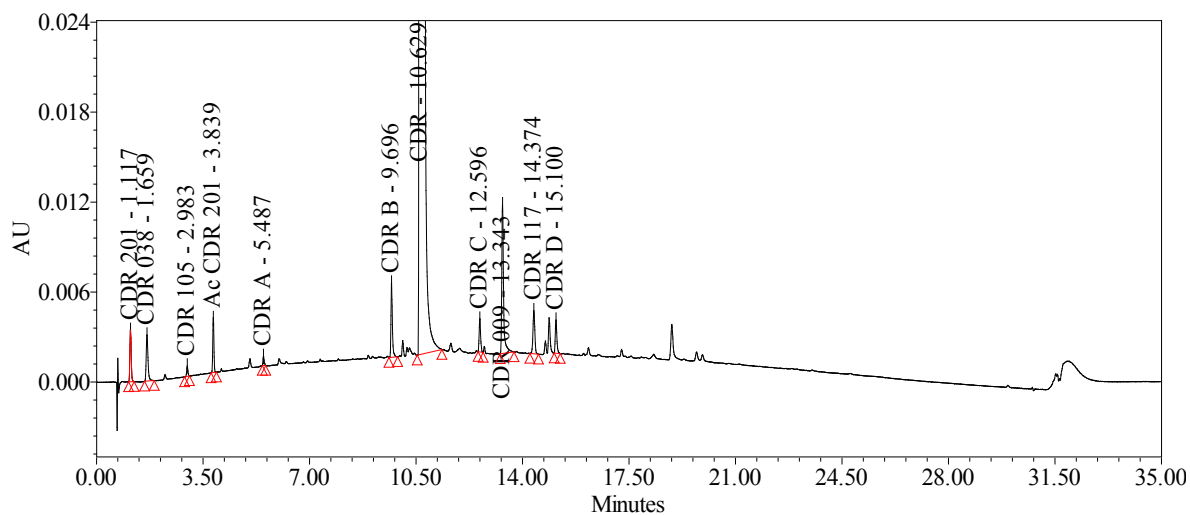
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 30C pH 6

Slika D5. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i pH = 5,8



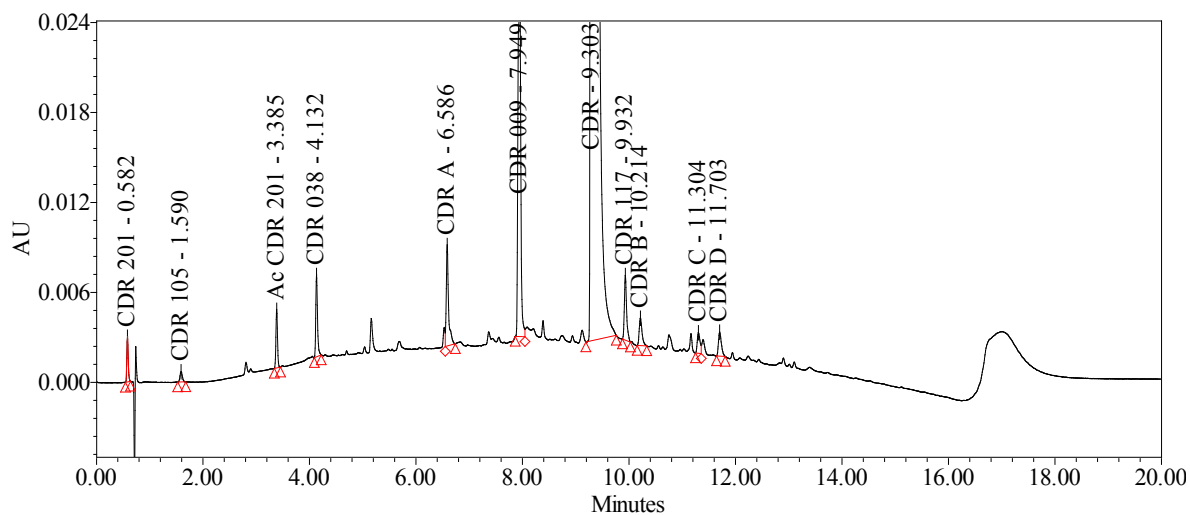
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 30C pH 6

Slika D5. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 5,8



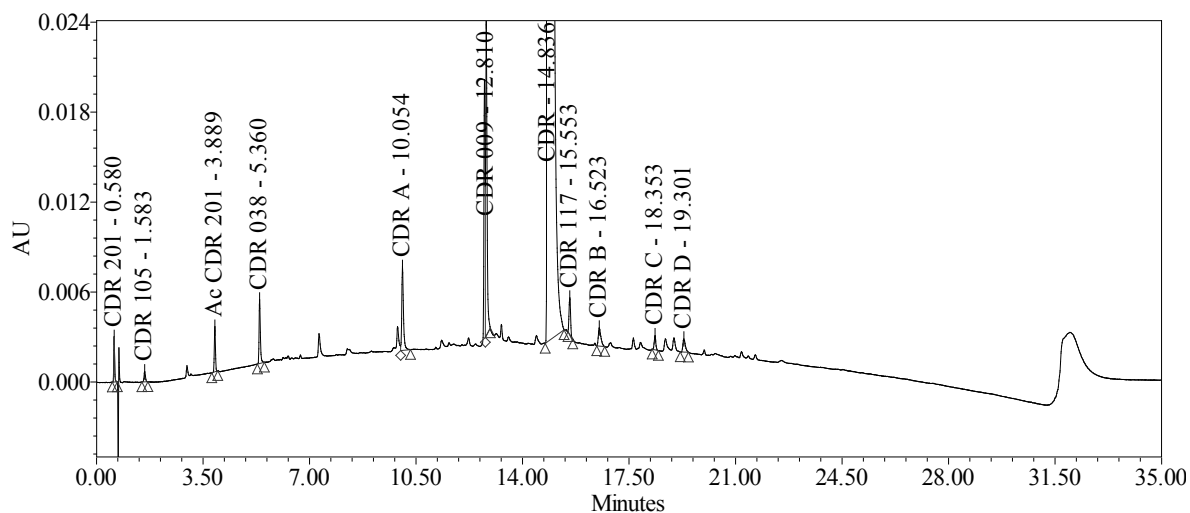
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 60C pH 6

Slika D6. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i pH = 5,8



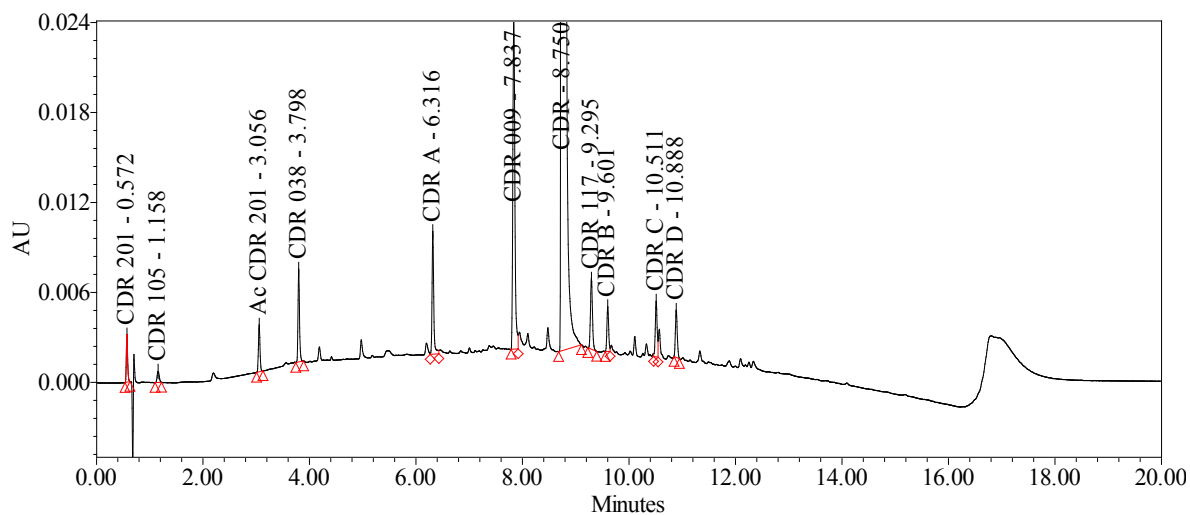
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 30C pH 9

Slika D6. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i pH = 9,55



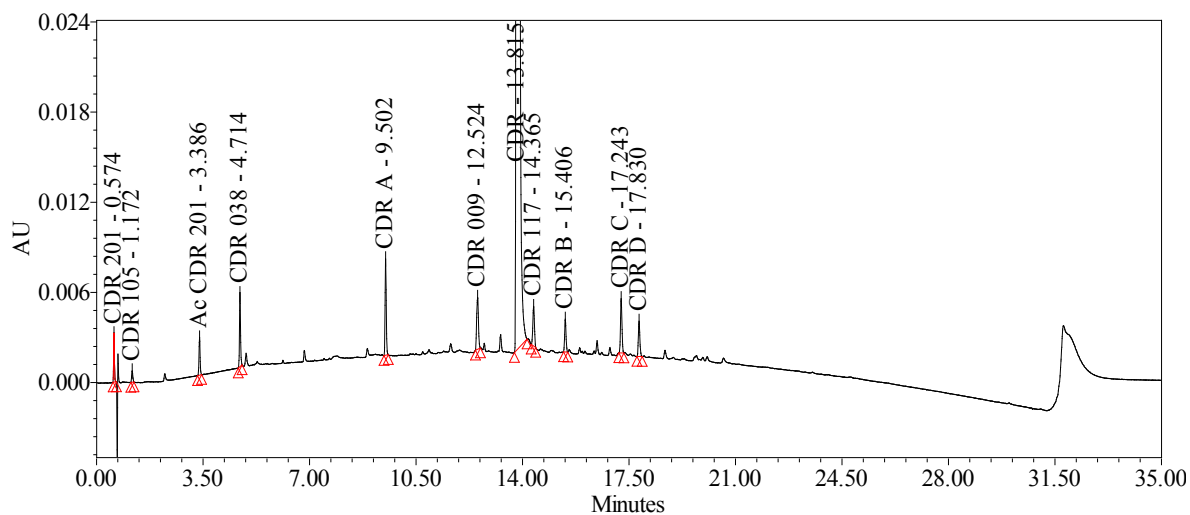
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 30C pH 9

Slika D7. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 9,55



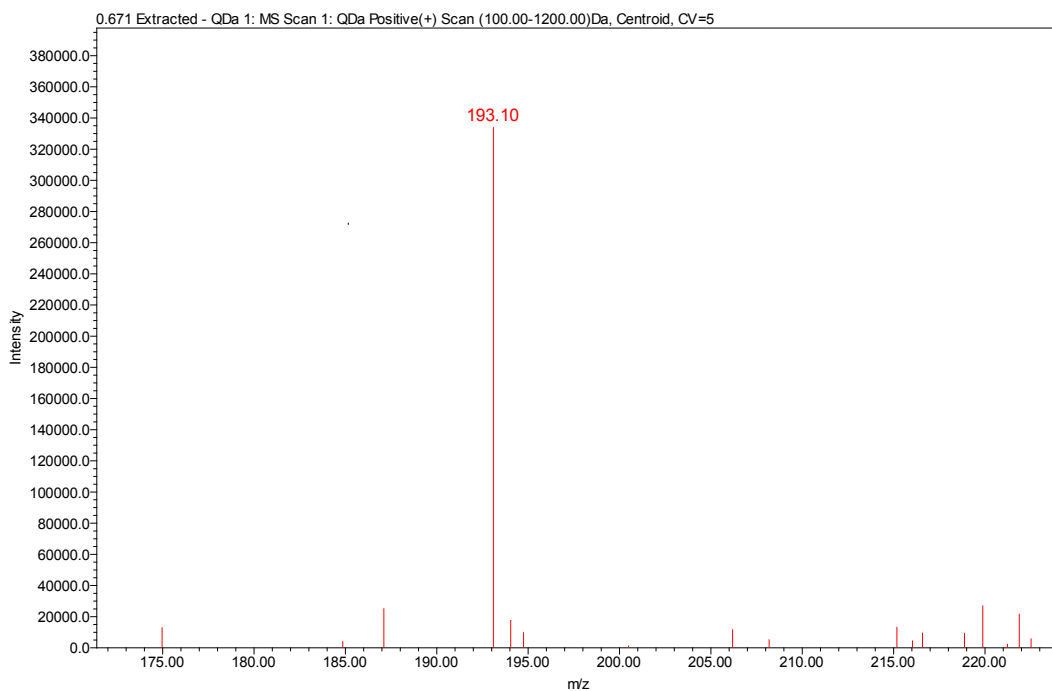
— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 15min 60C pH 9

Slika D8. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 9,55

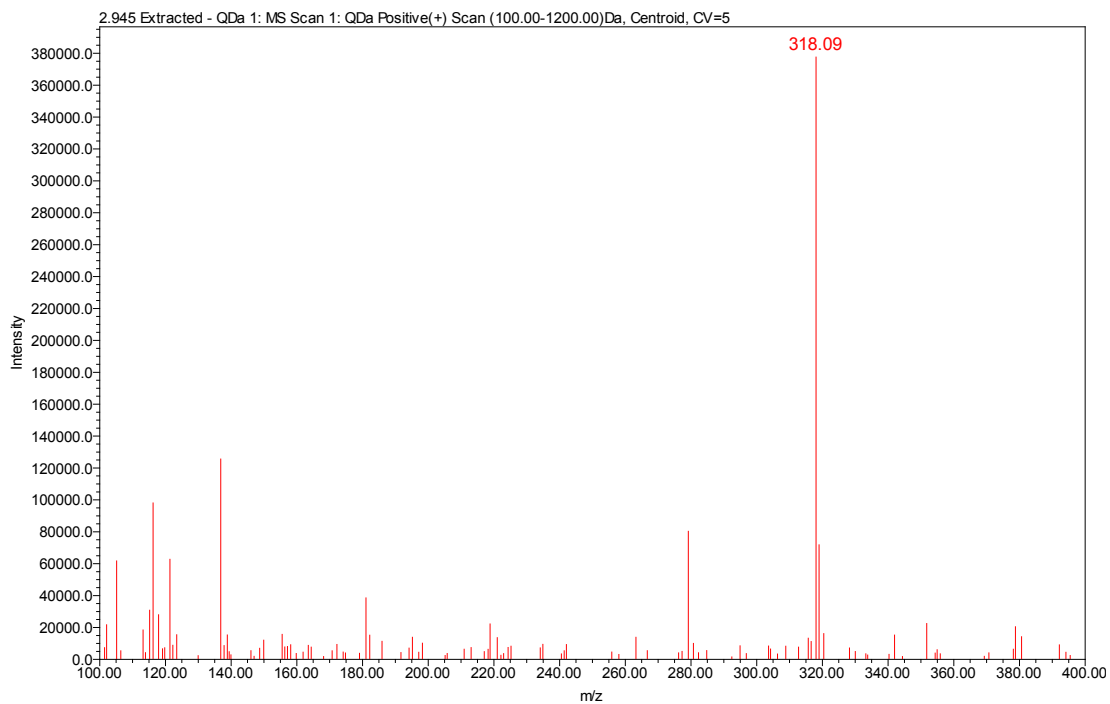


— SampleName: RS CDR ; Instrument Method Name: 30min 60C pH 9

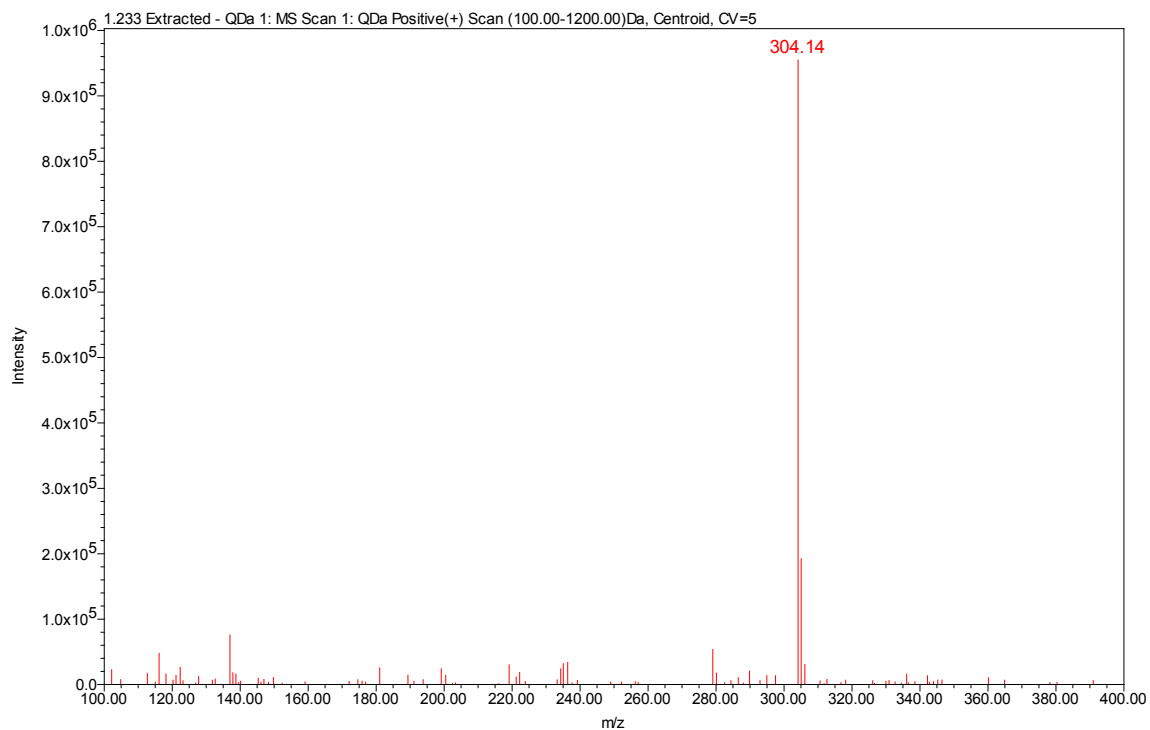
Slika D9. Kromatogram CDR i onečišćenja pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 9,55$



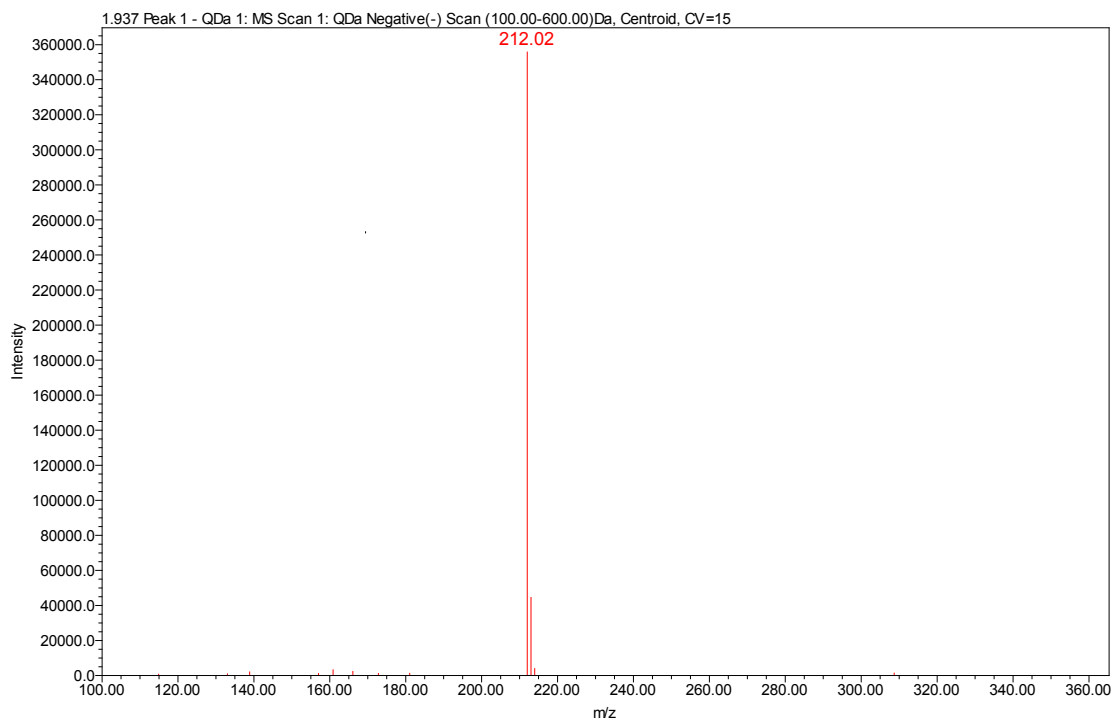
Slika D10. Spektar masa poznatog onečišćenja CDR – 201, $[\text{M} + \text{H}]^+ = 193,10$



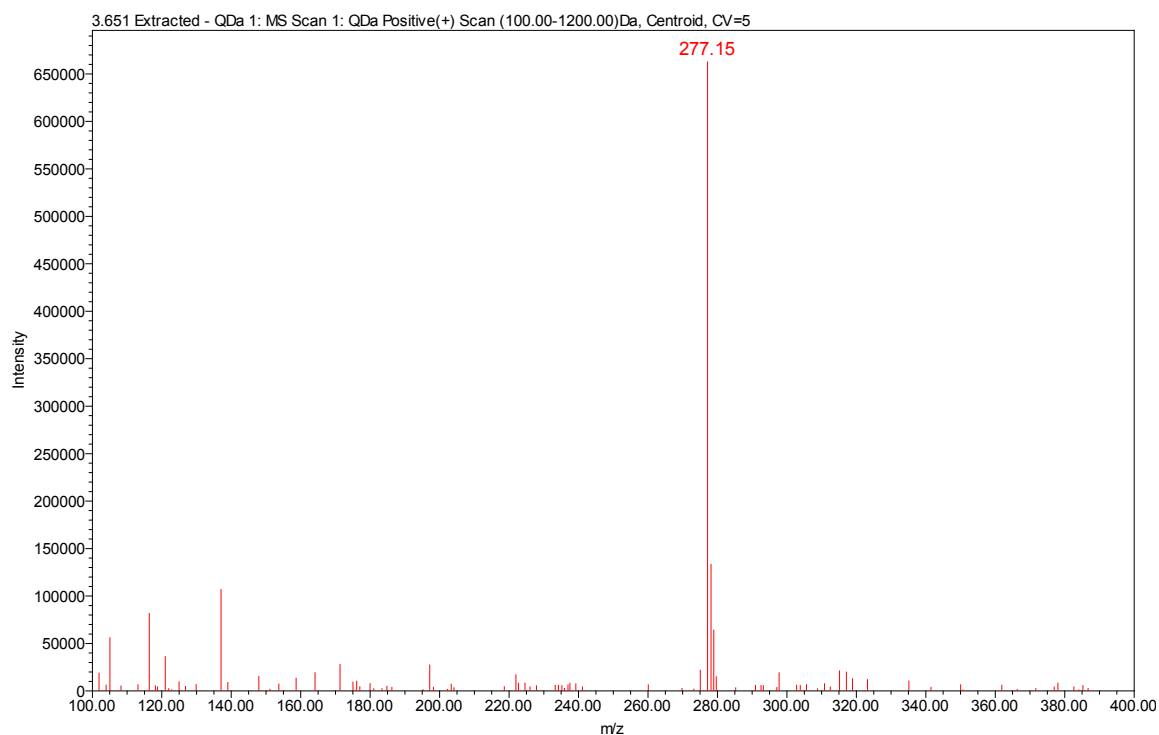
Slika D11. Spektar masa poznatog onečišćenja Ac - CDR – 201, $[M + 2ACN + NH_4]^+ = 318.09$



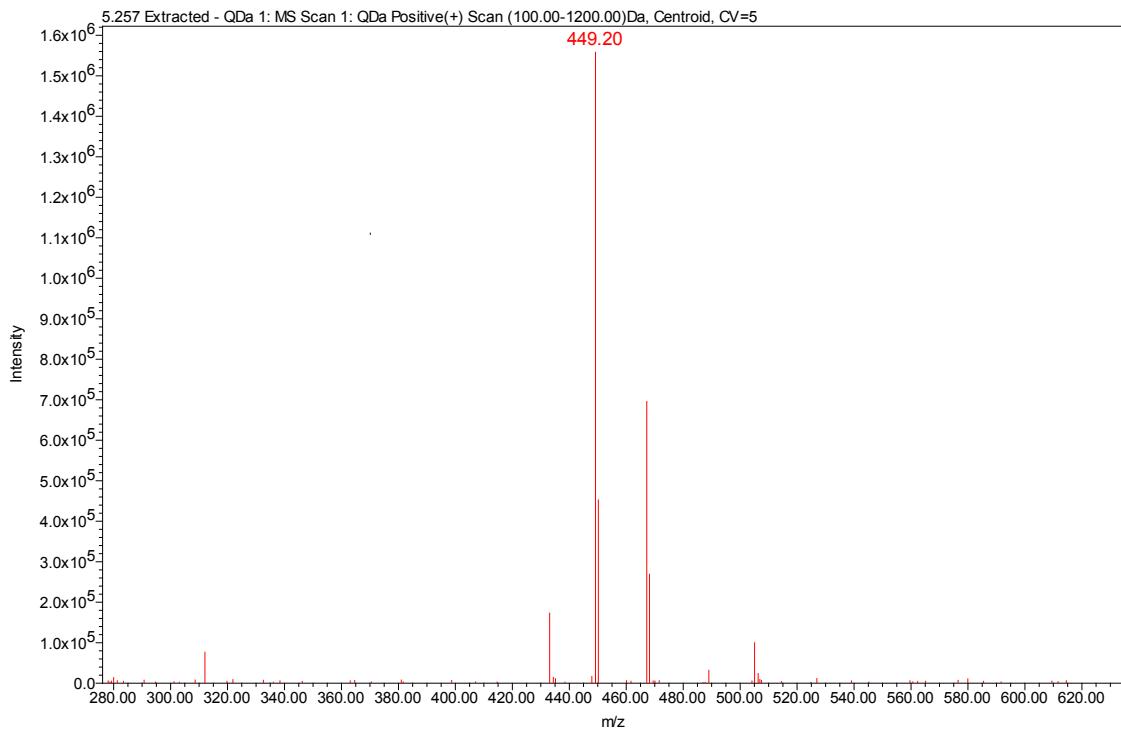
Slika D12. Spektar masa poznatog onečišćenja CDR – 038, $[M - H_2O]^+ = 304.14$



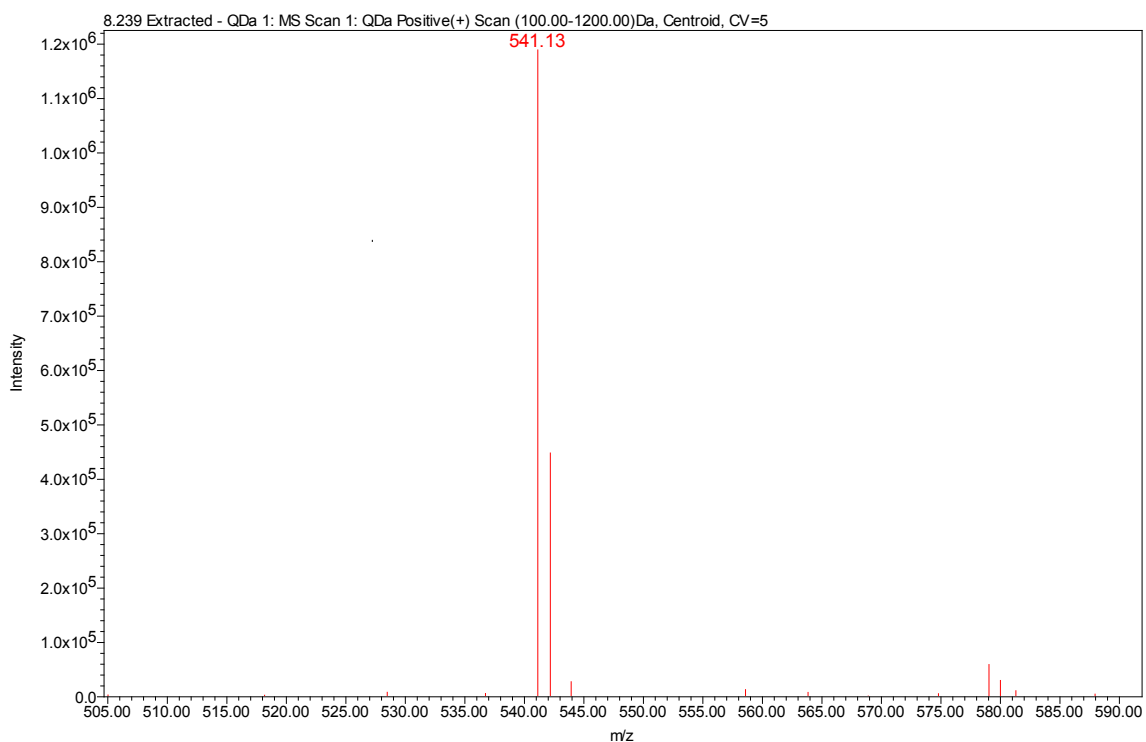
Slika D13. Spektar masa poznatog onečišćenja CDR – 105, $[M - H]^- = 212.02$



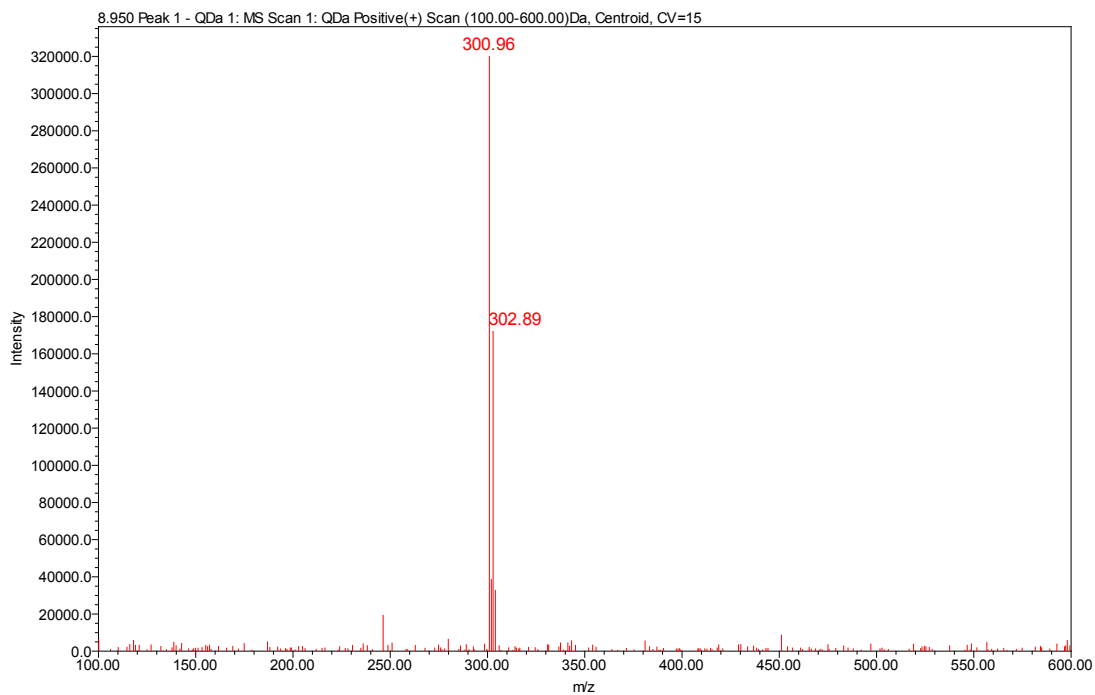
Slika D14. Spektar masa nepoznatog onečišćenja CDR – A, $M_r = 277.15$



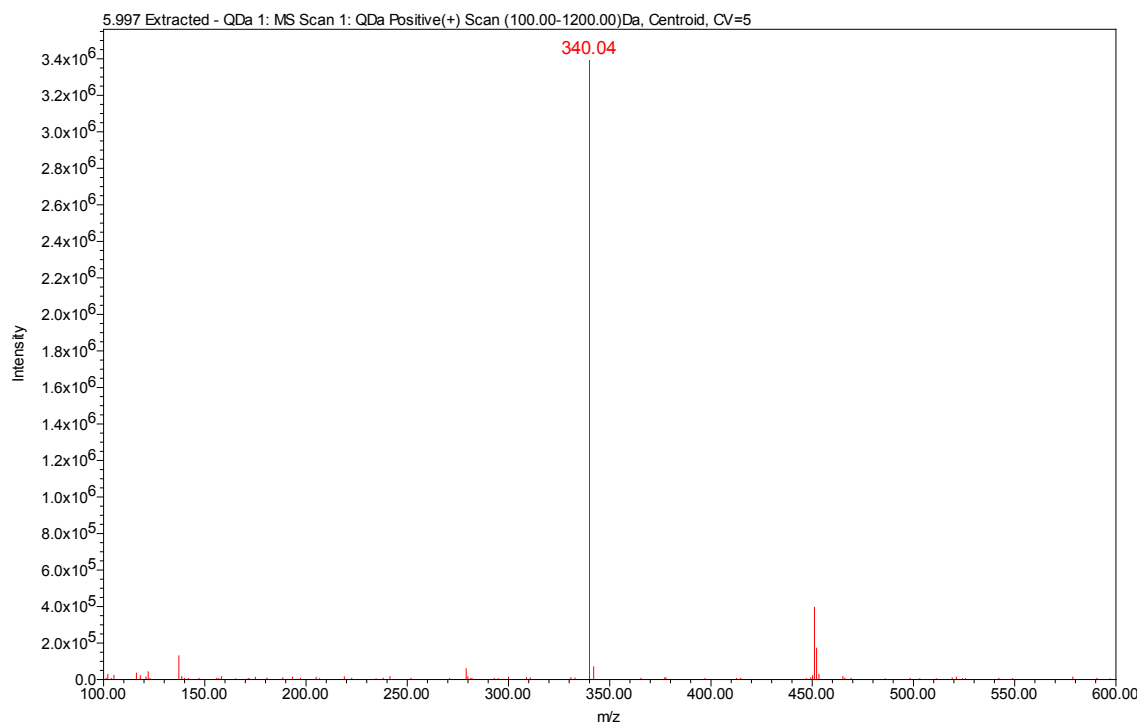
Slika D14. Spektar masa nepoznatog onečišćenja CDR – B, Mr = 449.20



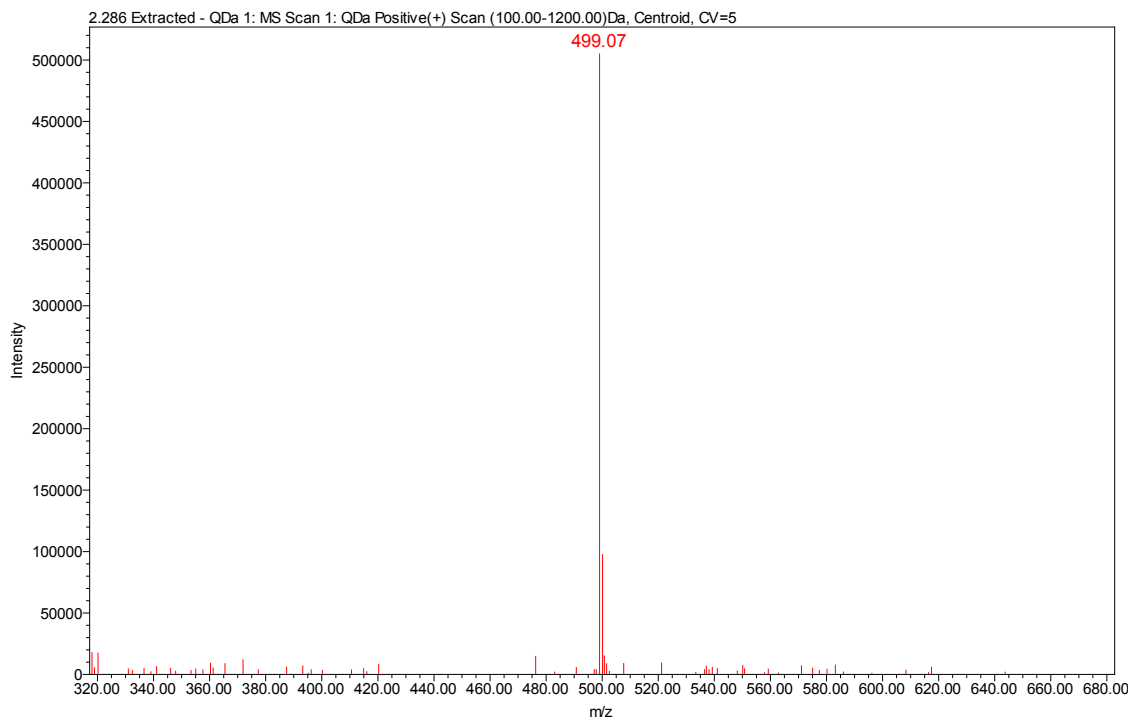
Slika D15. Spektar masa nepoznatog onečišćenja CDR – D, Mr = 541.13



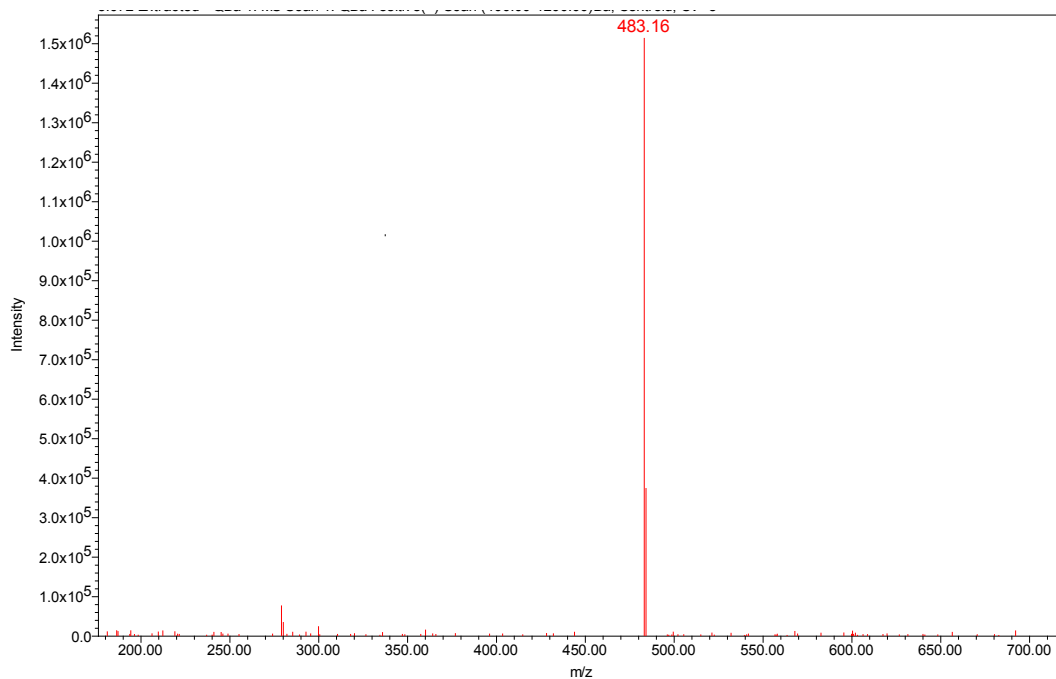
Slika D16. Spektar masa poznatog onečišćenja CDR – 117, $M_r = 300.96$



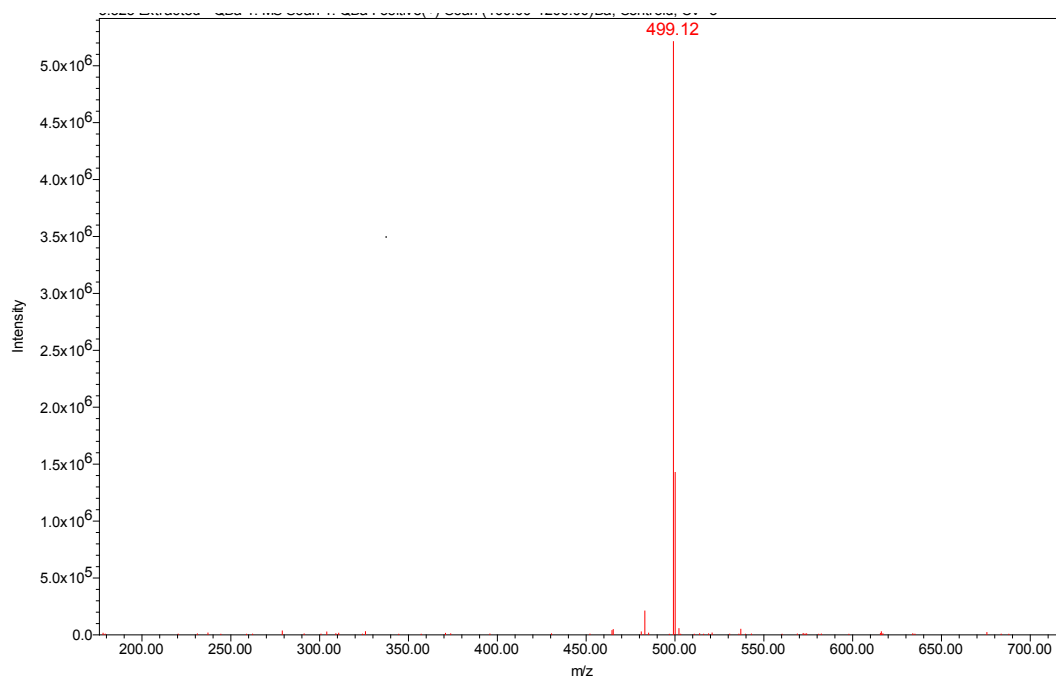
Slika D16. Spektar masa nepoznatog onečišćenja CDR – C, $M_r = 340.04$



Slika D17. Spektar masa nepoznatog onečišćenja nastalog prisilnom razgradnjom u kiselom mediju; RRT 0,58, Mr = 499.07



Slika D18. Spektar masa nepoznatog onečišćenja nastalog prisilnom razgradnjom u kiselom mediju; RRT 0,61, Mr = 483.16



Slika D19. Spektar masa nepoznatog onečišćenja nastalog prisilnom razgradnjom pomoću oksidacijskog sredstva H₂O₂; RRT 0,67, Mr = 499.12

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 5. rujna 1995. godine u Sisku. Pohađala sam osnovnu školu „Zvonimir Frank“ u Kutini. Po završetku osnovne škole, upisala sam srednju školu Tina Ujevića u Kutini, smjer opća gimnazija. Godine 2014. upisala sam preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Završni rad pod nazivom „Priprava policikličkih sustava fotokemijskom reakcijom u kiselom mediju“ obranila sam 15. rujna 2017. na Zavodu za organsku kemiju. Stručnu praksu obavila sa u firmi Messer hrvatski tehnoplin 2017. godine. Diplomski studij „Primijenjena organska kemija“ na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu upisala sam 2017. godine.