

# Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku

---

Runje, Mislav

Doctoral thesis / Disertacija

2018

*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:149:085301>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I  
TEHNOLOGIJE

MISLAV RUNJE

**RAZVOJ ANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE  
ONEČIŠĆENJA U DJELATNOJ FARMACEUTSKOJ  
TVARI NEPAFENAKU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb  
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND  
TECHNOLOGY

MISLAV RUNJE

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR  
DETERMINATION OF IMPURITIES IN NEPAFENAC  
ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018



Sveučilište u Zagrebu  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I  
TEHNOLOGIJE

MISLAV RUNJE

**RAZVOJ ANALITIČKIH METODA ZA ODREĐIVANJE  
ONEČIŠĆENJA U DJELATNOJ FARMACEUTSKOJ  
TVARI NEPAFENAKU**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Sandra Babić

Zagreb, 2018.



University of Zagreb  
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND  
TECHNOLOGY

MISLAV RUNJE

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR  
DETERMINATION OF IMPURITIES IN NEPAFENAC  
ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Sandra Babić

Zagreb, 2018

UDK: 615:[543.51+543.54](043.3)  
*Znanstveno područje:* Prirodne znanosti  
*Znanstveno polje:* Kemija  
*Znanstvena grana:* Analitička kemija  
*Institucija:* Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Zavod za analitičku kemiju  
*Voditelj rada:* Prof. dr. sc. Sandra Babić  
*Broj stranica:* 121  
*Broj slika:* 48  
*Broj tablica:* 33  
*Broj literaturnih izvora:* 147  
*Datum obrane:*  
*Sastav povjerenstva za obranu* Prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta  
u Zagrebu  
Izv. prof. dr. sc. Šime Ukić  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta  
u Zagrebu  
Dr. sc. Irena Zrinski Antonac, znanstveni suradnik,  
Pliva Hrvatska d.o.o.

*Rad je pohranjen u:* Knjižnici Fakulteta kemijskog  
inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg  
20

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu,  
Hrvatske bratske zajednice b.b.

Biblioteci Sveučilišta u Osijeku,  
Europska avenija 24

Biblioteci Sveučilišta u Rijeci,  
Dolac 1

Biblioteci Sveučilišta u Splitu,  
Livanjska 5

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 25. travnja 2016., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 20. svibnja 2016.

Prije svega, želim se od srca zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu bez koje sve ovo ne bi bilo moguće i što mi je bio mentor u punom značenju te riječi. Na njenom strpljenju, energiji i vjeri u mene, ponekad kada i sam nisam vjerovao.

Zahvaljujem se dr. sc. Ireni Nekoli iz Plive Hrvatske d.o.o. u Zagrebu za pomoć pri interpretaciji masenih spelatra spektara i vrijednim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Puno hvala prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović, s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na svim savjetima i sugestijama, a posebno na riječima podrške i vrijednim savjetima pri izradi ovog rada

Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Šimi Ukiću s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu na posvećenom vremenu i komentarima koje su ovaj rad učinili vrijednijim.

Hvala puno dr. sc. Ireni Zrinski Antonac iz Plive Hrvatske d.o.o u Zagrebu, na svim ovim godinama suradnje koje su me učinili boljim i koje su mi omogućile da izradim ovaj rad.

Zahvaljujem se kolegama. i svim članovima Zavoda za analitičku kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala prof. dr.sc Ernestu Meštroviću koje je sve ove godine vjerovao u mene i pružao mi podršku u izradi ove disertacije.

Hvala Franu, koji mi je usadio vjeru i motiv da završim ovu disertaciju.

Hvala mojoj ustanovi i svim kolegama iz Pliva Hrvatska d.o.o. u Zagrebu na financijskoj pomoći i razumijevanju pri izradi disertacije.

Naposljetku, posebno se zahvaljujem svojim najdražima, posebno mami Radojki koja je uvijek vjerovala u mene.



## SAŽETAK

Doktorski rad opisuje razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku. Razvijena je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti s C18 nepokretnom fazom i gradijentnim eluiranjem. Razvijena metoda je validirana i napravljeni su eksperimenti prisilne razgradnje, prilikom čega je provjerena selektivnost metode klasičnim pristupom provjere čistoće pika uporabom detektora s nizom dioda kao i uporabom dvodimenzionalne kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti, te je provjerena čistoća pika uporabom spektrometrije masa visoke razlučivosti. Glavna razgradna onečišćenja identificirana su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane sa spregnutom spektrometrijom masa kao i primjenom dvodimenzionalne UHPLC vezane sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti. Pretpostavljeni su putevi razgradnje nepafenaka što omogućuje predviđanje toksičnosti razgradnih spojeva, objašnjen je utjecaj svjetlosti, vlažnosti, temperature, pH-vrijednosti i prisutnosti oksidansa na razgradnju nepafenaka te su predloženi odgovarajući kinetički modeli razgradnje u kiselim i baznim uvjetima kao i razgradnje uslijed oksidacije. Razvijena metoda je dodatno provjerena uporabom komercijalnog računalnog program DryLab® uz pomoću kojega se na temelju dvanaest preliminarnih eksperimenata predvidjela promjena kromatografskog razlučivanja s promjenom eksperimentalnih uvjeta. Dobiveni optimalni uvjeti provjereni su eksperimentalno te je uočeno slaganje matematičkog modela i eksperimentalnih podataka. Potvrđeno je teorijsko područje robusnosti metode, odnosno višedimenzionalno područje unutar kojega varijacije kritičnih procesnih parametara ne uzrokuju značajne promjene kritičnih značajki kvalitete. Razvijena je i validirana metoda fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja. Razvijene metode su uspređene s aspekta osjetljivosti, razlučivanja kao i granica primjene.

**Ključne riječi:** *nepafenak, prisilna razgradnja, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti, fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima, dvodimenzionalna kromatografija ultravisoke djelotvornosti, spektrometrija masa*

## SUMMARY

The doctoral thesis describes development of analytical methods for determination of impurities in nepafenac active pharmaceutical ingredient. Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) method was developed using C18 stationary phase and gradient elution. Method was validated and forced degradation studies were performed. During the studies, selectivity of method was checked by peak purity determination using diode array detectors and by using two-dimensional liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. Main degradation impurities were identified using ultra-high performance liquid chromatography coupled with different mass spectrometers (triple quadrupole mass spectrometer and quadrupole time of flight mass spectrometer: QTOF). QTOF was used for determination of exact masses. Main degradation routes of nepafenac were proposed, which will enable to predict toxicity of potential degradation impurities. Influence of light, humidity, temperature, pH and presence of oxidants on the degradation of nepafenac active substance was investigated, and the kinetic model for decomposition was proposed. Developed methods were cross investigated by using commercial software for UHPLC method development DryLab®. DryLab enabled prediction of retention times in dependence of method parameters from 12 preliminary experiments. The obtained optimal method conditions were checked and mathematical model was confirmed by experiments. Robust space of the method was confirmed, within robust space of the method minimal changes of critical process parameters doesn't influence on critical quality attributes. Orthogonal method for determination of impurities in nepafenac active substance was developed by using supercritical fluid chromatography (SFC). Developed SFC method was validated and compared to developed UHPLC method.

**Keywords:** *nepafenac, forced degradation, ultra-high performance liquid chromatography, supercritical fluid chromatography, two-dimensional ultra-high performance liquid chromatography, mass spectrometry*

## TABLE OF CONTENTS

1.	UVOD .....	1
2.	OPĆI DIO.....	3
2.1.	Nepafenak .....	3
2.2.	Onečišćenja u aktivnim djelatnim tvarima.....	4
2.3.	Kromatografija .....	5
2.3.1.	<i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti</i> .....	10
2.3.2.	<i>Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti</i> .....	11
2.3.3.	<i>Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija</i> .....	13
2.3.3.1.	<i>Primjena dvodimenzionalne kromatografije u farmaceutskoj industriji</i> .....	16
2.3.4.	<i>Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima</i> .....	18
2.3.4.1.	<i>Primjena SFC u farmaceutskoj industriji</i> .....	22
2.4.	Spektrometrija masa.....	24
2.4.1.	Analizatori masa.....	29
2.4.1.1.	<i>Kvadripolni analizator masa</i> .....	30
2.4.1.2.	<i>Analizator mase koji mjeri vrijeme preleta</i> .....	31
2.5.	Kvaliteta ugrađena u dizajn.....	32
2.6.	Solvofobna teorija .....	34
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	38
3.1.	Materijali .....	38
3.1.1.	<i>Kemikalije</i> .....	38
3.1.2.	<i>Standardi</i> .....	39
3.1.3.	<i>Nepokretne faze korištene u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti</i> .....	42
3.1.4.	<i>Nepokretne faze korištene u razvoju metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima</i> .....	42
3.2.	Instrumenti .....	43
3.2.1.	<i>Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan s detektorom s nizom dioda (UHPLC-DAD)</i> .....	43
3.2.2.	<i>Dvodimenzionalni tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF)</i> .....	44
3.2.3.	<i>Dvodimenzionalni tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF)</i> .....	45
3.2.4.	<i>Kromatograf za fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (UPC<sup>2</sup>-PDA)</i> .....	47
3.2.5.	<i>Uređaj za osvjetljivanje simuliranim zračenjem</i> .....	47
3.3.	Metode rada.....	48
3.3.1.	<i>Priprema otopina</i> .....	48

3.3.2.	<i>Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana s detektorom s nizom dioda</i> .....	50
3.3.3.	<i>Modeliranje kromatografske separacije</i> .....	50
3.3.4.	<i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrijom masa</i> 51	
3.3.4.1.	<i>Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornost vezana s trostrukim kvadripolom</i> .....	51
3.3.4.2.	<i>Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa visoke razlučivosti</i> .....	52
3.3.5.	<i>Validacija metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti</i> .....	52
3.3.6.	<i>Prisilna razgradnja nepafenaka</i> .....	54
3.3.7.	<i>Kinetike prisilne razgradnje nepafenaka</i> .....	56
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	58
4.1.	Razvoj metode UHPLC-DAD za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja .....	58
4.1.1.	<i>Prikladnost sustava</i> .....	63
4.2.	Razvoj metode uporabom kvalitete ugrađene u dizajni (QbD).....	64
4.3.	Validacija metode UHPLC-DAD za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja .....	68
4.3.1.	<i>Specifičnost</i> .....	68
4.3.2.	<i>Linearnost</i> .....	70
4.3.3.	<i>Granice kvantifikacije i kvalifikacije</i> .....	70
4.3.4.	<i>Točnost i iskorištenje</i> .....	71
4.3.5.	<i>Preciznost</i> .....	72
4.3.6.	<i>Robusnost</i> .....	72
4.3.7.	<i>Stabilnost</i> .....	73
4.4.	Prisilna razgradnja nepafenaka .....	73
4.5.	Kinetika razgradnje nepafenaka.....	74
4.6.	Identifikacija razgradnih produkata primjenom metode UHPLC-QQQ.....	76
4.7.	Identifikacija razgradnih produkata primjenom metode 2D-UHPLC-QTOF.....	81
4.8.	Optimizacija metode 2D-UHPLC-QTOF za drugu dimenziju .....	81
4.8.1.	<i>Određivanje spektralne čistoće pika nepafenaka uporabom metode 2D-UHPLC-QTOF</i> .....	83
4.8.2.	<i>Određivanje spektralne čistoće pika nepafenaka uporabom metode 2D-UHPLC-QTOF</i> .....	85
4.9.	Razvoj metode fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima (UPC <sup>2</sup> -PDA) za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja .....	87
4.10.	Validacija metode UPC <sup>2</sup> -PDA za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja .....	91
5.	ZAKLJUČCI.....	95

6. LITERATURA.....	97
7. PRILOZI.....	109

## 1. UVOD

Trenutno važeći standardi i zakonske regulative zahtijevaju od farmaceutske industrije ne samo da proizvodi djelatne tvari visoke čistoće, nego i detaljno poznavanje onečišćenja prisutnih u djelatnoj tvari i gotovom lijeku. Onečišćenjem se smatraju neželjene komponente prisutne uz djelatnu tvar koje nastaju tijekom proizvodnje lijeka ili njegovom razgradnjom i mogu utjecati na učinkovitost lijeka i njegovu sigurnu primjenu. Različita istraživanja pokazala su da onečišćenja nastala razgradnjom djelatne tvari mogu biti potencijalno genotoksična, mutagena ili kancerogena. Stoga određivanje onečišćenja nakon provedenih testova prisilne razgradnje (eng. *stress tests*) postavlja nove izazove i ciljeve moderne kemijske analize u farmaceutskoj industriji. To obuhvaća identifikaciju onečišćenja, njihovu strukturnu karakterizaciju i kvantitativno određivanje u djelatnoj tvari i gotovom lijeku te procjenu biološke sigurnosti svakog pojedinog onečišćenja.

S ciljem boljeg razumijevanja puteva razgradnje nepafenaka, svrha istraživanja bila je razviti kromatografske metode za određivanje procesnih i razgradnih onečišćenja u djelatnoj tvari nepafenak, prvo uporabom klasičnog pristupa, a zatim pristupom „kvalitete osigurane dizajnom“. Razvijena metoda mora omogućiti identifikaciju razgradnih onečišćenja i osigurati brze rutinske analize djelatne tvari u laboratorijima kontrole kvalitete.

Sama izvedba doktorskog rada sastojala se od četiri cjeline. U prvoj cjelini napravljen je razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (eng. *ultra high performance chromatography*, UHPLC) prilikom čega su ispitane različite pokretne i nepokretne faze kao i različita gradijentna eluiranja. Razvijena metoda je validirana i napravljeni su eksperimenti prisilne razgradnje, prilikom čega je provjerena selektivnost metode klasičnim pristupom provjere čistoće pika uporabom detektora s nizom dioda (eng. *diod array detector*, DAD). Glavna razgradna onečišćenja identificirana su primjenom kromatografije ultra visoke djelotvornosti veznom sa spregnutom spektrometrijom masa (eng. *tandem mass spectrometry*, MS/MS, trostrukim kvadripolom). Određena su vremena poluraspada kao i kinetika razgradnje nepafenaka za razgradnju u kiselim i baznim uvjetima te razgradnju uslijed oksidacije.

U drugoj cjelini, razvijena metoda dodatno je provjerena uporabom komercijalnog računalnog program DryLab® uz pomoću kojega se, na temelju dvanaest preliminarnih eksperimenata, predviđjela promjena kromatografskog razlučivanja s promjenom eksperimentalnih uvjeta. Optimalni uvjeti provjereni su eksperimentalno. U ovom dijelu rada potvrđeno je teorijsko

područje robusnosti metode (eng. *design space*), odnosno višedimenzionalno područje unutar kojega varijacije kritičnih procesnih parametara ne uzrokuju značajne promjene kritične značajke kvalitete. Eksperimentalno je potvrđeno slaganje modela dobivenog računalnim programom.

U trećoj cjelini razgradni produkti identificirani su primjenom dvodimenzionalne kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti (2D UHPLC-QTOF), te je provjerena čistoća pika uporabom spektrometrije masa visoke razlučivosti koja daje dodatnu dimenziju obzirom da srodni spojevi mogu imati spektar sličan spektru djelatne tvari.

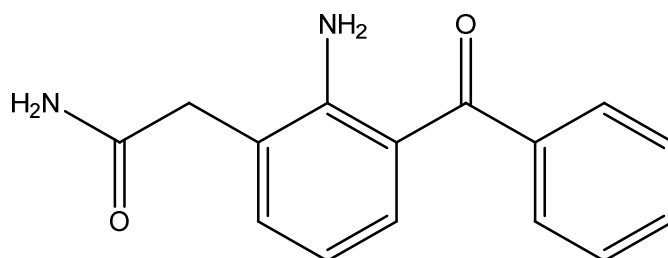
U četvrtoj cjelini, razvijena je metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima (eng. *supercritical fluid chromatography*, SFC) za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja, prilikom čega su ispitane različite pokretne i nepokretne faze, gradijenti eluiranja, različiti tlakovi na detektoru kao i temperature. Razvijena metoda je validirana. Poseban osvrt dan je na usporedbu razvijenih metoda s aspekta osjetljivosti, razlučivanja kao i granica primjene.

Poznavanje puteva razgradnje važno je jer omogućuje prepoznavanje potencijalnih razgradnih onečišćenja prilikom pripreve formulacije za oftalmičku suspenziju. Nadalje, poznavanje puteva razgradnje omogućuje predviđanje potencijalne toksičnosti onečišćenja koja mogu biti prisutna u djelatnoj tvari nepafenak. Obzirom na nepostojanje podataka u literaturi o stabilnosti djelatne tvari nepafenak, ovim radom objašnjen je utjecaj svjetlosti, vlažnosti, temperature, pH-vrijednosti i prisutnosti oksidansa na razgradnju nepafenaka te su predloženi odgovarajući kinetički modeli razgradnje.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Nepafenak

Nepafenak (2-amino-3-benzoil benzen acetamid) je žuti kristalinični prah gotovo netopljiv u vodi s koeficijentom razdiobe oktanol-voda ( $K_{ov}$ ) jednakim 128 i talištem pri 185 °C [1]. [1]. Molekulska formula je  $C_{15}H_{14}N_2O$ , a relativna molekulska masa ( $M_r$ ) iznosi 254,3. Strukturna nepafenaka prikazana je na **Slici 1**.



**Slika 1.** Strukturna formula nepafenaka

Nepafenak je nesteroidni protuupalni lijek koji se proizvodi kao 0,1 %-tna suspenzija te se koristi kao oftalmički lijek za topikalnu primjenu [2]. U oftalmologiji, nesteroidni protuupalni lijekovi koriste se za stabilizaciju širenja zjenice prilikom intra-okularnih operacija te u terapijama alergijskog konjunktivitisa, postoperativnih upala i boli [3]. Nepafenak se koristi za prevenciju i liječenje postoperativne boli i upale povezane s operacijom katarakte te smanjenja rizika od postoperativnog makularnog edema povezanog s operacijom katarakte kod bolesnika s dijabetesom[4]. Djelatna tvar nepafenak ugrađuje se u lijek u obliku 0,1 %-tne oftalmičke suspenzije, komercijalnog imena Nevanac<sup>®</sup> kao i u obliku 0,3 %-tne suspenzije komercijalnog imena Ilevro<sup>™</sup>. U SAD-u je odobren kao lijek protiv bolova i upala poslije operacije mrežnice [5]. U Europi je Nevanac<sup>®</sup> odobren za smanjenje rizika kod postoperativnih zahvata operacije mrežnice kod pacijenta s dijabetesom [6]. Studije provedene na različitim životinjskim modelima kod upale, edema i angiogeneze pokazale su da je nepafenak učinkovit pri topičkim okularnim administracijama [2, 6]. Za razliku od ostalih protuupalnih lijekova, nepafenak u okularnim tkivima prelazi deaminacijom u amfenak [7, 8]. Oba, nepafenak i amfenak su reverzibilni inhibitori ciklooksigenaze enzima COX-1 i COX-2, dok amfenak učinkovito inhibira obje isoforme, pogotovo COX-2 na vrlo ireverzibilan način [2, 8, 9]. Inhibicijom COX enzima dolazi do blokade pri formiranju različitih protuupalnih medijatora,



uključujući i prostanglandine, koji se povezuju s upalama i edemom [10, 11]. Dokazano je da nakon topikalne primjene nepafenaka dolazi do inhibicije sinteze prostangladina [6].

U literaturi je opisano nekoliko metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj tvari nepafenaka. Trenutno ne postoji službena američka (eng. *United States Pharmacopeia Convention*, USP) niti europska (eng. *European Pharmacopoeia*, EP) farmakopeja za nepafenak. Jedina metoda pronađena u literaturi je spektrofotometrijsko određivanje ukupnog sadržaja nepafenaka u lijeku [12]. Također, do sada su objavljene tek dvije metode za određivanje onečišćenja u djelatnoj tvari nepafenak koje se temelje na tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti uz primjenu detektora s nizom dioda (HPLC-DAD) [13, 14]. Metoda opisana u patentu [13] traje 65 minuta i razdvaja samo tri onečišćenja, dok metoda koju su razvili Lipiec-Abramskaal i suradnici [14] razdvaja osam onečišćenja unutar 29 minuta. Do sada su u literaturi opisana procesna onečišćenja i intermedijeri ali nisu objašnjeni putevi razgradnje niti su predložene strukture razgradnih onečišćenja.

## 2.2. Onečišćenja u aktivnim djelatnim tvarima

Prema smjernicama Međunarodnog odbora za usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), onečišćenje se definira kao sastojak aktivne djelatne tvari koji nema definiran kemijski entitet kao aktivna djelatna tvar [15].

Prema ICH smjernicama [15] onečišćenja se mogu klasificirati u sljedeće kategorije:

- organska onečišćenja,
- anorganska onečišćenja i
- ostatna otapala.

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa ili pohrane djelatne aktivne tvari. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, ovisno o maksimalnoj dnevnoj dozi, kao i jesu li prisutna u aktivnoj djelatnoj tvari. Organska onečišćenja uključuju:

- polazne materijale,
- nusprodukte reakcije,
- intermedijere,
- razgradne produkte,
- reagense, ligande i katalizatore.

Prema maksimalnoj dnevnoj dozi određene su granice kvantifikacije, identifikacije i toksikološke kvalifikacije onečišćenja (**Tablica 1.**) [15].

**Tablica 1.** Propisane granice kvantifikacije, identifikacije i toksikološke kvalifikacije onečišćenja [15]

Maksimalna dnevna doza	Granica kvantifikacije	Granica identifikacije	Granica toksikološke kvalifikacije
$\leq 2 \text{ g dan}^{-1}$	0,05 %	0,10 % ili $1,0 \text{ mg dan}^{-1}$ (ovisno koja granica je niža)	0,15 % ili $1,0 \text{ mg dan}^{-1}$ (ovisno koja granica je niža)
$> 2 \text{ g dan}^{-1}$	0,03 %	0,05 %	0,05 %

Anorganska onečišćenja su rezultat proizvodnog procesa aktivne djelatne tvari. Uobičajeno su identificirana i uključuju:

- reagense, ligande, katalizatore,
- teške metale ili tragove metala,
- anorganske soli i
- ostale materijale (ugljen, dijelove filtara i sl.).

Ostatna otapala su organske ili anorganske tekućine koje se koriste u pripravi aktivne djelatne tvari. Obzirom da je poznata toksičnost otapala, ona se klasificiraju prema toksičnosti [16]:

- klasa I: otapala koja su toksična, kancerogena i opasna za okoliš – nije ih preporučljivo koristiti u proizvodnji djelatne aktivne tvari,
- klasa II: otapala koja su djelomično toksična u većim dozama te su limitirana na  $0,1 \text{ mg dan}^{-1}$ ,
- klasa III: otapala male toksičnosti koja su limitirana do 5000 ppm u djelatnim aktivnim tvarima.

### 2.3. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna dok se druga, pokretna, giba u određenom smjeru [17].

Obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze kromatografske tehnike se dijele na: razdjelnu, adsorpcijsku, afinitetnu, iono-izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem [17-19]:

- razdjelna kromatografija – ravnoteža se uspostavlja između dviju kapljevina, što znači da je i nepokretna faza kapljevina vezana na inertni čvrsti nosač,
- adsorpcijska kromatografija – ravnoteža se uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa,
- afinitetna kromatografija – na površini čvrste faze nalaze se različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, do vezanja dolazi zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze,
- kromatografija isključenjem – nepokretna faza je materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima, razdvajanje molekula zbiva se zbog razlike u molekulskoj masi i obujmu.
- iono-izmjenjivačka kromatografija – razdvajanje se temelji na ravnotežnom procesu između nabijenih funkcionalnih grupa na stacionarnoj fazi i iona prisutnih u uzorku i mobilnoj fazi.

Podjela kromatografskih tehnika moguća je i na temelju sastava pokretne faze [17]:

- plinska kromatografija – pokretna faza je inertni plin,
- tekućinska kromatografija – pokretna faza je tekućina male viskoznosti,
- fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima – pokretna faza je gusti plin (fluid) iznad svoje kritične temperature i tlaka.

Grafički prikaz odziva detektora o vremenu ili volumenu eluiranja naziva se kromatogram. Položaj kromatografskog pika na vremenskoj osi može poslužiti za identifikaciju sastojka, a iz površine ispod kromatografskog pika moguće je izračunati koncentraciju odgovarajućeg sastojka [20]. Obzirom da je površina kromatografskog pika proporcionalna koncentraciji, udio onečišćenja u uzorku moguće je izračunati iz sljedećih formula [21].

Omjer površine ispod kromatografskog pika i koncentracije naziva se faktor odziva,  $RF$ :

$$RF = \frac{\text{površina pika}}{\text{koncentracija}} \quad (1)$$

Račun se temelji na činjenici da ja faktor odziva konstantan, te da će za standard biti jednak kao i za uzorak:

$$RF_{STD} = RF_{uzorka} \quad (2)$$

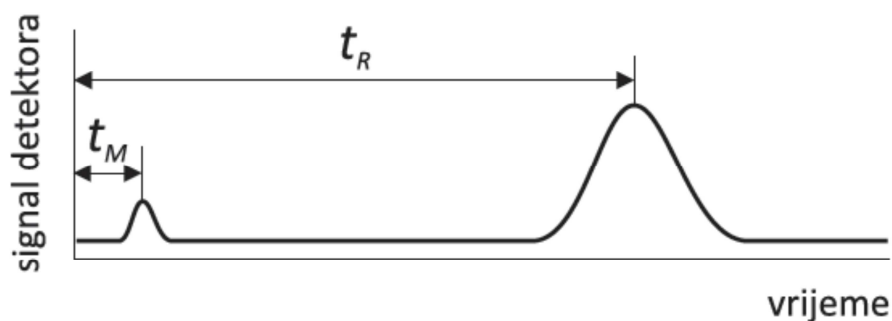
Iz toga slijedi:

$$koncentracija\ onečišćenja = \frac{površina}{RF_{STD}} \quad (3)$$

Pojedina onečišćenja je teško pripraviti te se stoga onečišćenja kvantificiraju prema standardu glavnog analita. Ukoliko onečišćenja nemaju jednak faktor odziva kao i glavni analit tada je potrebno uzeti u obzir faktor korekcije, koji se naziva relativni faktor odziva (eng. *relative response factor*, RRF).

$$koncentracija\ uzorka = \frac{površina\ uzorka}{RF_{STD}} \cdot RRF \quad (4)$$

Svaki analit ima svoje vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) koje je karakteristično za pojedini analit a predstavlja vrijeme između trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu tvar. 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 [17]. Odnos vremena zadržavanja i zadržanog vremena prikazan je na **Slici 2**.



**Slika 2.** Odnos vremena zadržavanja analita,  $t_R$ , i vremena zadržavanja pokretne faze,  $t_M$  [22]

Prilagođeno vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) jest vrijeme koje otopljena tvar provede vezana na nepokretnu fazu. Vrijeme zadržavanja jednako je zbroju zadržanog i prilagođeno vremena zadržavanja:

$$t_R = t_M + t_R' \quad (5)$$

Omjer vremena koje otopljena tvar provede u nepokretnoj fazi prema vremenu koje provede u pokretnoj fazi naziva se *faktor zadržavanja* ( $k$ ) [20] koji se računa prema sljedećem izrazu:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (6)$$

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. Mogućnost istovremene analize više analita ovisi o razlučivanju kromatografskih pikova unutar istog kromatograma.

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

$$\alpha = \frac{k(B)}{k(A)} \quad (7)$$

Na faktor zadržavanja i separacijski faktor utječu [23]:

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

Kvaliteta separacije između dva kromatografska pika mjeri se razlučivanjem ( $R_S$ ) između susjednih pikova [23] koje je definirano izrazima (8) i (9):

$$R_S = \frac{2\Delta t}{(w_1 + w_2)} \quad (8)$$

$$R_S = \frac{1}{4} \cdot (\alpha - 1) \cdot N_1^{\frac{1}{2}} \cdot \frac{k_1}{1 + k_1} \quad (9)$$

$k_1$  faktor zadržavanja

$N_1$  broj teoretskih odsječaka prvo-eluirane komponente.

$w$  bazna širina eluirane komponente

$\Delta t$  razlika u retencijskim vremenima prvo i drugo eluirane komponente

Jednadžba (9) vrlo je korisna pri razvoju metoda jer ukazuje na faktore koji utječu na kromatografsko razlučivanje.

Broj teoretskih odsječaka predstavlja broj pseudoravnoteža ili faznih prijelaza postignut na određenoj koloni i definiran je sljedećim izrazom (10):

$$N = 16 \cdot \frac{t_R^2}{w} \quad (10)$$

Prolazak uzorka kroz kolonu može dovesti do širenja vrpce, te utjecati na učinkovitost odjeljivanja. Prema klasičnoj teoriji, kolona se može podijeliti na određeni broj odsječaka koji imaju svoj visinu (eng. *height equivalent to a theoretical plate*, HETP). Za odjeljivanje sastojaka uzorka potrebno je imati dovoljno odsječaka u kojima se uspostavlja ravnoteža razdiobe analita između nepokretne i pokretne faze. Manja HETP vrijednost, odnosno veći broj odsječaka ukazuju na bolje odjeljivanje sastojaka [18, 19].

Na broj teoretskih odsječaka može se utjecati promjenom:

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

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

Asimetrijski faktor ( $A_s$ ) također služi za procjenu djelotvornosti kolone a računa se prema izrazu (11):

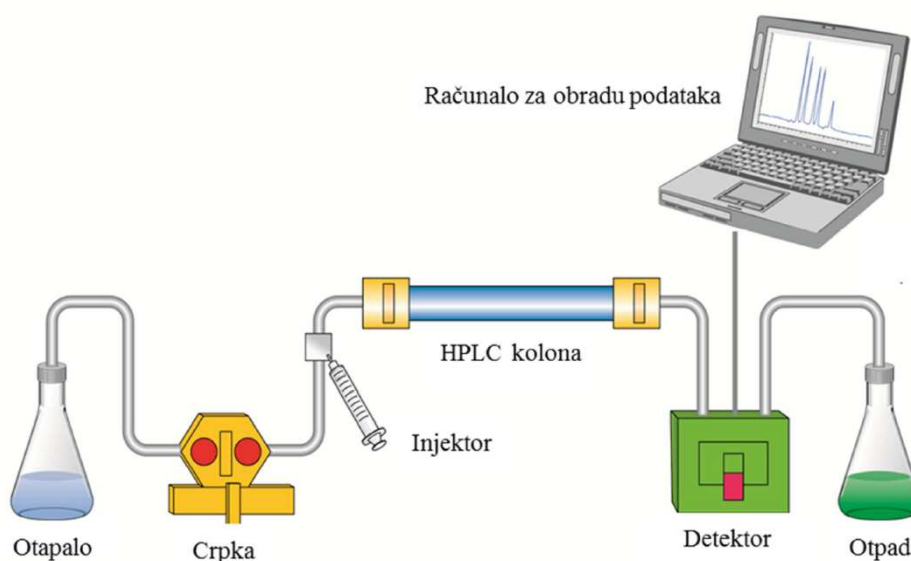
$$A_s = \frac{B}{A}$$

B desna širina kromatografske krivulje na 10% njene visine.

A lijeva širina kromatografske krivulje na 10% njene visine

### 2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je najčešće korištena tehnologija za analizu lijekova u zadnjih 30 godina [24, 25]. 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 [26, 27]. Koristi se za određivanje sadržaja aktivne djelatne tvari, razgradnih produkata, onečišćenja i intermedijera kao i praćenja reakcije prilikom sinteze aktivne djelatne tvari [28]. Shematski prikaz HPLC uređaja nalazi se na **Slici 3**.



**Slika 3.** Shematski prikaz uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti [29]

Tekućinski kromatograf sastoji se od [26, 30]:

- *spremnika pokretne faze i sustava za obradu otapala* – sastoji se od jednog ili više spremnika u kojima se nalazi otapalo. U sklopu sustava nalazi se oprema za uklanjanje plinova i čvrstih čestica iz otapala.
- *crpke* – omogućuju konstanto unošenje pokretne faze u kolonu. Zahtjevi za crpke su sljedeći: tlakovi do 40 MPa, izlaz bez pulsiranja tlaka, brzine protoka od 0,1 do 10 mL min<sup>-1</sup>, reproducibilnost protoka i otpornost na koroziju izazvanu uporabom različitih otapala. Za primjenu u tekućinskoj kromatografiji pogodne su dvije vrste mehaničkih crpki: crpka s vijčanim pogonom i recipročna crpka. Recipročna crpka sastoji se od male cilindrične komore koja se puni i prazni pomicanjem klipa. Pomicanje klipa stvara pulsirajući protok koji treba prigušiti. Prednosti recipročnih

pumpi su mali unutarnji volumen, visoki vanjski tlak, mogućnost primjene gradijentnog eluiranja, stalni protoci koji ne ovise o povratnom tlaku u koloni ni viskoznosti otapala.

- *sustava za automatizirano unošenje uzorka* – služi za automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu. Uzorak se najčešće unosi putem plinskog ventila, uz njega se nalazi više izmjenjivih petlji preko kojih se na kolonu mogu nanositi različiti volumeni uzorka.
- *kolone* – najčešće je čelična cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza. Dimenzije kolone, duljina i unutarnji promjeri mogu biti različiti..
- *detektora* – ne postoji univerzalni detektor već njegov odabir detektora ovisi prirodi uzorka. Detektori koji se u tekućinskoj kromatografiji najčešće primjenjuju temelje se na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja. Najčešći detektori su spektrofotometri, detektori s nizom fotoosjetljivih dioda (DAD), fluorescencijski detektori (eng. *fluorescence detector*, FLD), elektrokemijski detektori (eng. *electrochemical detector*, ED), detektori indeksa loma (eng. *refractive indeks detector*, RID) ili detektori raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (eng. *evaporative light-scattering detector*, ELSD). 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 vanjske podražaje te osigurava linearan odgovor u širokom koncentracijskom području [31].

### 2.3.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti je nova moderna analitička tehnika temeljena na napretku u instrumentaciji i koristi nepokretnu fazu s česticama promjera manjeg od 2  $\mu\text{m}$  s ciljem ostvarivanja boljeg razlučivanja i osjetljivosti te veće brzine analize u odnosu na klasične HPLC metode [32]. Faktor koji utječe na poboljšanje separacije je materijal nepokretne faze.

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

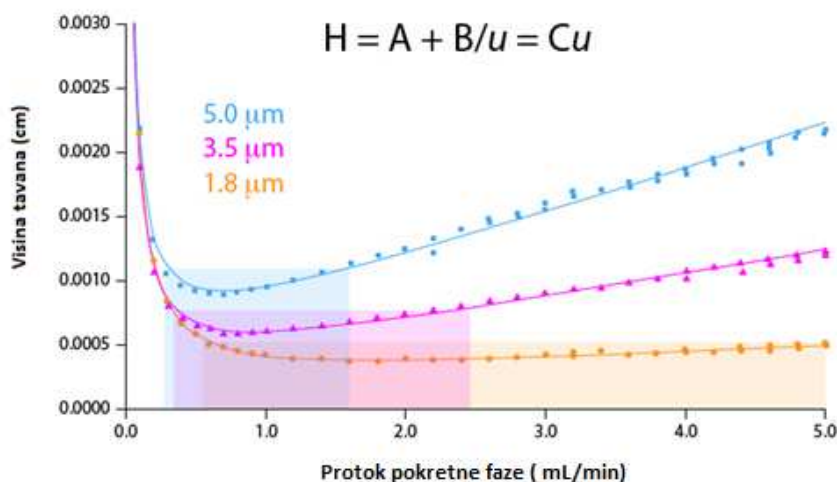
$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (12)$$



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 HETP. Obzirom da je veličina čestica jedna od varijabli, Van Deemeter-ova krivulja objašnjava potrebu za razvojem kolona s manjim promjerom čestica obzirom da dolazi do povećanja efikasnosti kolone pri većim linearnim brzinama što ima za posljedicu kraće vrijeme analize i bolju separaciju. Koeficijent vrtložne difuzije (A) ne ovisi o linearnoj brzini pokretne faze, predstavlja proces gibanja molekule iz sredine veće koncentracije u sredinu manje koncentraciji. Najmanji je kada je promjer čestica u koloni mali i ujednačen. Koeficijent longitudinalne difuzije (B) predstavlja tendenciju molekule k prirodnoj difuziji, ovaj efekt se smanjuje pri visokim brzinama stoga se dijeli s linearnom brzinom. 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 zaostaje u pokretnoj fazi i stoga je on proporcionalan brzini [24-26]. Idealnu Van Deemeter-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  $\mu\text{m}$ . Utjecaj veličine čestica na oblik i položaj Van Deemeter-ove krivulje prikazan je na **Slici 4**. Obzirom na visoke tlakove do kojih dolazi zbog uporabe čestica manjih od 2  $\mu\text{m}$ , razvijeni su UHPLC sustavi. U odnosu na HPLC sustave, njihove prednosti su veća efikasnost i brzina analize, koji su ostvareni uporabom čestica promjera manjih od 2  $\mu\text{m}$  kao i uporabom kolona kraćih od 10 cm. Van Deemeter-ova jednadžba pokazuje da uporabom čestica promjera manjih od 2  $\mu\text{m}$  raste efikasnost što dovodi do kraćeg vremena analize, ali istovremeno dolazi do rasta tlaka što ograničava uporabu HPLC uređaja koji mogu raditi na tlakovima do 400 bara. Korištenjem kratkih kolona dolazi do povećanja broja teoretskih odsječaka što ima za posljedicu kraće vrijeme analize uz bolju separaciju [33-37]. Današnji UHPLC uređaji imaju crpke koje mogu raditi na višim tlakovima (do 1200 bara) Sustavi za injektiranje uzoraka su dizajnirani na način da pokretna faza prolazi kroz iglu, čime se postiže brža i efikasnija separacija [38-41].



**Slika 4.** Van Deemter-ova krivulja

Prednosti UHPLC tehnike u odnosu na HPLC [32]:

- kraće vrijeme analize ,
- bolja osjetljivost,
- ista ili bolja selektivnost, osjetljivosti i dinamički područje LC analiza,
- bolja separacija,
- niža cijena analize i
- manja potrošnja otapala.

Nedostatak je kraći vijek trajanja kolona uslijed visokih tlakova [32].

### 2.3.3. Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija

Pokazano je da je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana s različitim detektorima (DAD, MS, i dr.) najbolji izbor za analizu razgradnih produkata, određivanje farmakokinetike [42, 43] i određivanje metabolita [44, 45].

Kontinuiranim razvojem novih nepokretnih faza za kromatografiju obrnutih faza (eng. *reversed phase liquid chromatography*, RPLC) sa stabilnim materijalima, koji omogućuju široko područje pH-vrijednosti pokretne faze i uporabu širokog temperaturnog područja, omogućili su da RPLC postane najraširenija tehnika u farmaceutskim laboratorijima [46-49].

Ponekad nije moguće napraviti dovoljno dobru separaciju i kvantifikaciju svih razgradnih i procesnih onečišćenja koja mogu biti prisutna u aktivnoj djelatnoj tvari.

Za separaciju, kvalifikaciju i kvantifikaciju u takvim slučajevima koristi se dvodimenzionalna tekućinska kromatografija (eng. *two dimensional liquid chromatography*, 2D-LC), koja

također može ubrzati separaciju u odnosu na jednodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju [50, 51].

Prema Giddings-u [52], izraz višedimenzionalna separacija (uključujući i 2D-LC) odnosi se na tehnike u kojima:

- komponente uzorka prolaze dvije ili više nezavisnih separacija
- komponente se razdvoje u prvom koraku, a u drugom koraku se analiti od interesa transferiraju u drugu fazu pogodnu za analize poput spektrometrije masa.

Dvodimenzionalne separacije mogu se raditi u *off-line* modu i *on-line* načinu rada. Za *off-line* način rada moguće je koristiti klasični HPLC instrument, jer se frakcije nakon prve kolone skupljaju i naknadno se svaka frakcija injektira u drugu dimenziju. Nedostatak takvog pristupa je rizik od gubitka uzorka. Za razliku od *off-line* pristupa, *on-line* pristup je mnogo brži, automatiziraniji i reproducibilniji.

Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija može se podijeliti [52]:

- postupak u kojem se samo ograničen broj uzoraka prenosi u drugu dimenziju (eng. *heart-cutting*), označen s LC-LC. Ovaj pristup koristi se kada je potrebno analizirati manji broj pikova iz prve dimenzije.
- sveobuhvatnu (eng. *comprehensive*) dvodimenzionalnu tekućinsku kromatografiju, koja se označava s LCxLC. U ovom slučaju, cijeli uzorak injektiran u prvoj dimenziji sakuplja se u male frakcije i prenosi u drugu dimenziju [53, 54].

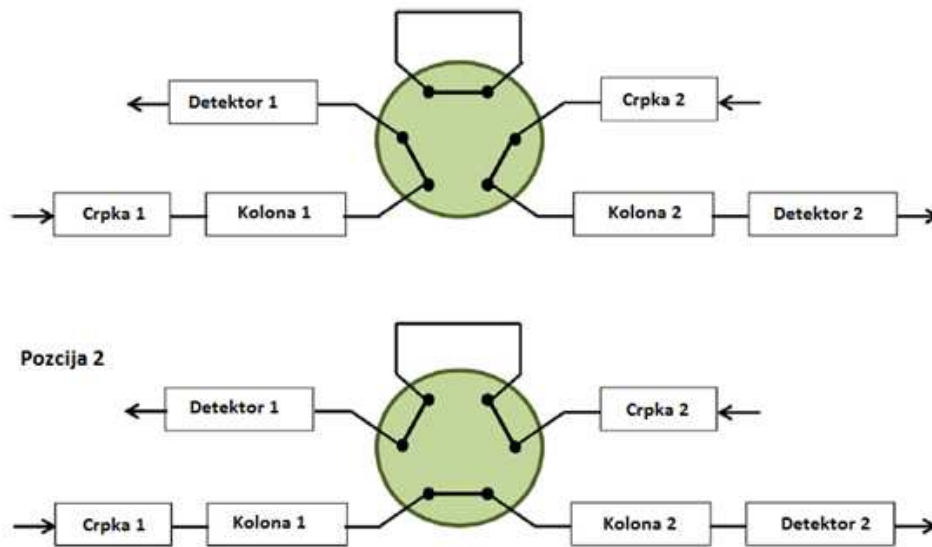
Metode za prijenos uzoraka u drugu dimenziju su:

- izravni prijenos,
- prijenos uz pomoć petlji za pohranu uzoraka i
- prijenos pomoću kolona za zadržavanje uzoraka.

#### *Izravni prijenos uzoraka*

Izravni prijenos uzorka iz prve u drugu dimenziju koristi se isključivo u LC-LC analizama, za što se koristi sustav ventila s dvije pozicije (**Slika 5.**). Mijenjajući poziciju ventila, frakcija iz prve dimenzije prebacuje se u drugu dimenziju. Nakon povratka u početnu poziciju, započinje analiza u drugoj dimenziji. Do početka 2000-ih, izravni prijenos uzorka korišten je u 40 % 2D-LC aplikacija [55, 56]. U to doba, 90 % metoda u *heart-cut* načinu rada koristilo je izokratno eluiranje u barem jednoj dimenziji. Razlog tome je što se uporabom izokratnog eluiranja smanjuju potencijalni problemi uslijed korištenja različitih otapala i početnog

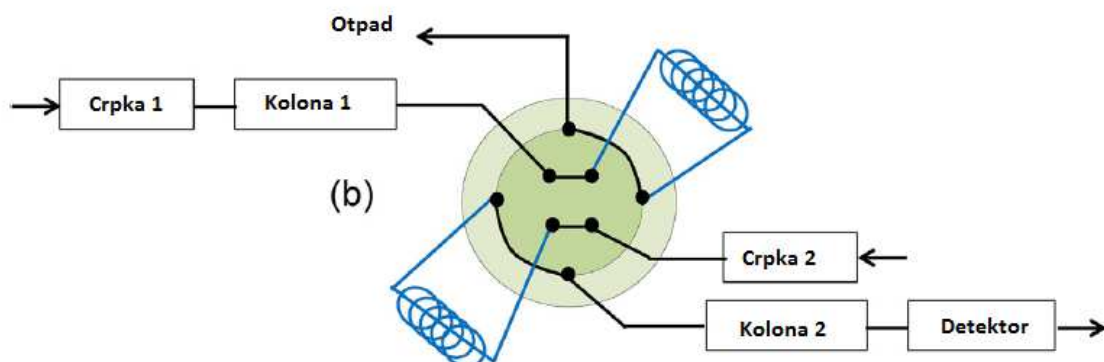
sastava pokretne faze u drugoj dimenziji što može rezultirati cijepanjem kromatografskih pikova.



**Slika 5.** Sustav ventila s dvije pozicije [57]

#### *Prijenos uzorka pomoću petlji za pohranu uzoraka*

Za razliku od izravnog prijenosa, kada se uzorak prenosi u drugu dimenziju pomoću petlji za pohranu uzorka moguće je koristiti izokratno i gradijentno eluiranje. U ovom slučaju ventili su opremljeni petljama za pohranu uzoraka (**Slika 6.**), te se na taj način omogućuje pohrana većeg broja uzoraka za drugu dimenziju. Broj petlji na ventilu ovisi od uređaja do uređaja, jednostavni sustavi s jednom petljom koriste se za analize tragova ili kiralne separacije [58, 59] kada je potrebno analizirati samo jedan kromatografski pik iz prve dimenzije. Sustavi s većim brojem petlji (6, 8 i 10) i većim brojem ventila koriste se za *heart-cutt* i *multiple-heart-cutt* 2D-LC [60, 61] ili sveobuhvatnu 2D-LC [62, 63].

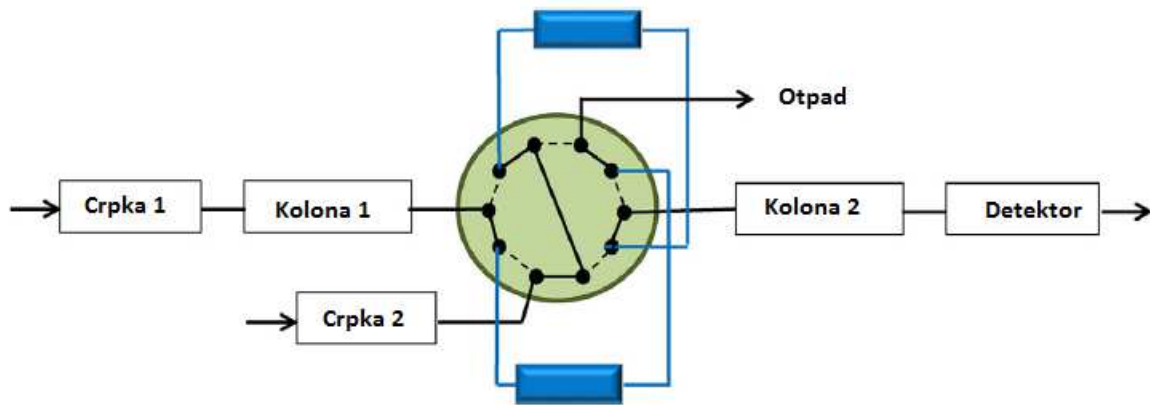


**Slika 6.** Sustav za pohranu uzorka pomoću petlji [64]

Nedostatak sustava s višestrukim petljama je slaba mješljivost pokretnih faza ukoliko su u prvoj dimenziji primjenjuje kromatografija normalnih fazna a u drugoj kromatografija obrnutih faza. U literaturi je u takvim slučajevima zabilježena pojava sistemski pikova, artefakata [65].

#### *Prijenos uzorka pomoću kolona za zadržavanje uzorka*

Petlje za pohranu uzoraka moguće je zamijeniti kolonama za zadržavanje uzorka (**Slika 7.**). Odabir nepokretne faze ovisi o svojstvima uzorka i o otapalima iz pokretnih faza korištenih u obje dimenzije. U odnosu na petlje, kolone za pohranu uzorka omogućuju postizanje veće osjetljivosti te imaju mogućnost obogaćivanja uzorka uzastopnim injektiranjima. Nedostatak im je složeniji razvoj metode za drugu dimenziju [65].



**Slika 7.** Sustav za zadržavanje uzorka pomoću kolone [66]

#### *2.3.3.1. Primjena dvodimenzionalne kromatografije u farmaceutskoj industriji*

Razvojem tehnologije u zadnjih desetak godina došlo je do značajnog povećanja uporabe 2D-LC tehnika u industriji. Najveći izazovi pri razvoju analitičkih metoda predstavlja potencijalno koeluiranje nepoznatih spojeva s API-jem ili drugim onečišćenjima. 2D-LC se koristi za razdvajanje pikova u drugoj dimenziji, ukoliko postoji problem u selektivnosti metode, postoji cijeli niz aplikacija kada se koristi 2D-LC. Najčešće se koristi za analizu tragova, kiralne analize, profiliranje uzoraka ili za spektrometriju masa u drugoj dimenziji.

### *Analiza tragova*

Dvodimenzionalna kromatografija omogućuje razvoj osjetljivih metoda za praćenje farmakokinetike ili drugih farmakoloških ispitivanja. Primjena 2D-LC omogućila je detekciju i kvantifikaciju analita pri vrlo niskim koncentracijama, pogotovo u biološkim uzorcima pri čemu je moguće odrediti analite pri koncentraciji od 50 ng L<sup>-1</sup> uz UV detekciju [67-70]. Prilikom ranog razvoja lijeka ili aktivne djelatne tvari, 2D-LC može se koristiti za detekciju i identifikaciju onečišćenja [71-73].

### *Kiralne analize*

Pri kiralnim separacijama, 2D-LC se pokazala vrlo korisnom tehnikom jer omogućuje prijenos male količine čiste komponente u drugu dimenziju čime se produljuje životni vijek kiralne kolone.

Generalno, u prvoj dimenziji analit se razdvaja od onečišćenja i ostalih tvari koje mogu utjecati na životni vijek kiralne kolone, a nakon toga se čisti uzorak prenosi u drugu dimenziju [74, 75].

### *Profiliranje uzorka*

Sveobuhvatna 2D-LC omogućuje dobivanje informacija o uzorku. 2D-LC separacije se koriste i kod studija razgradnje prilikom validacija analitičkih metoda kao i kod analiza smjesa lijekova. U literaturi postoji podatak o korištenju *off-line* načina rada kod razvoja i studija razgradnji Alprazolam tableta [76], te *on-line* način rada metodom RPLCxRPLC-UV/MS za određivanje razgradnih produkata [77].

### *Spektrometrija masa u drugoj dimenziji*

Ukoliko se u razvijenoj LC-UV metodi koristi nehlapivi pufer, identifikacija nepoznatih onečišćenja spektrometrijom masa nije moguće bez prilagodbe postojeće metode. Ponekad razvoj kromatografske metode pogodne za identifikaciju spektrometrijom masa može utjecati na selektivnost već razvijene metode. Primjena 2D-LC omogućuje korištenje već razvijene metode za rutinske analizu [78, 79]. Upotreba lako hlapivog pufer u drugoj dimenziji omogućuje efikasnu i brzu identifikaciju nepoznatih onečišćenja. Istraživanja su pokazala da se uporabom 2D-LC povećava granica detekcije MS detektora pri detekciji onečišćenja u tragovima na način da dolazi do smanjenja interakcije glavne komponente u MS detektoru [80].

#### 2.3.4. *Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima*

Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima je kromatografska tehnika koja se temelji na svojstvima tekućinske i plinske kromatografije, pri uvjetima temperature i tlaka pri kojima se pokretna faza ponaša kao superkritični fluid [81].

Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima počiva na principima kromatografije normalnih faza, zbog niske viskoznosti fluida u superkritičnom stanju, kolona ima visoku efikasnost [82]. Prva upotreba fluida u superkritičnom stanju dokumentirana je još davne 1962. [83]. Uočeno je da se neki fluidi prilikom tlačenja i grijanja iznad njihove kritične točke, ponašaju kao eluensi u kromatografiji. Viskoznost i difuzivnost takvog fluida je vrlo blizu karakteristika plinova što rezultira porastom efikasnosti separacije pri visokoj brzini pokretne faze ali se i dalje zadržava vrlo nizak tlak. Nadalje, njihova gustoća i moć otapanja, koji su vrlo slični karakteristikama tekućina, rezultiraju dobrom topljivosti i brzim prijenosom analita. Unatoč tim zanimljivim karakteristikama, farmaceutska industrija nije pokazala zanimanje za SFC u to vrijeme, nego nastavlja s korištenjem klasičnih i razvijenih tekućih i plinskih kromatografskih tehnika. Daljnji razvoj SFC tehnika odvijao se u ranim 1980-tim kada je predstavljen koncept kapilarne SFC (cSFC) [84-87]. cSFC se temelji na korištenju kapilara ili otvorenih tubularnih kolona s pokretnom fazom koja je bila u potpunosti superkritični fluid ili eventualno superkritični fluid s dodatkom vrlo malo modifikatora. Ovakva tehnika svoju inicijalnu primjenu našla je u plinskoj kromatografiji. Nekoliko fluida može se koristiti za SFC budući da imaju kritični tlak ( $p_k$ ) i kritičnu temperaturu ( $T_k$ ) koji se mogu jednostavno postići. Unatoč tome, ugljični dioksid ( $\text{CO}_2$ ) nametnuo se kao preferirani superkritični fluid u odnosu na ostale poput primjerice ugljikovodika [88, 89],  $\text{N}_2\text{O}$  ili amonijaka [90] koji su imali nekoliko nedostataka vezanih uz sigurnost, koroziju, neprikladnosti za termički nestabilne spojeve i utjecaj na okoliš [91].

U nekoliko zadnjih godina, SFC se naglo razvila, a najviše tomu doprinijela je nova generacija instrumenata i kolona. Razvojem naprednih instrumenata najveći napredak ostvaren je u rješavanju poznatih nedostataka SFC kao što su slaba UV osjetljivost, ograničena pouzdanost i slabe mogućnost kvantifikacije.

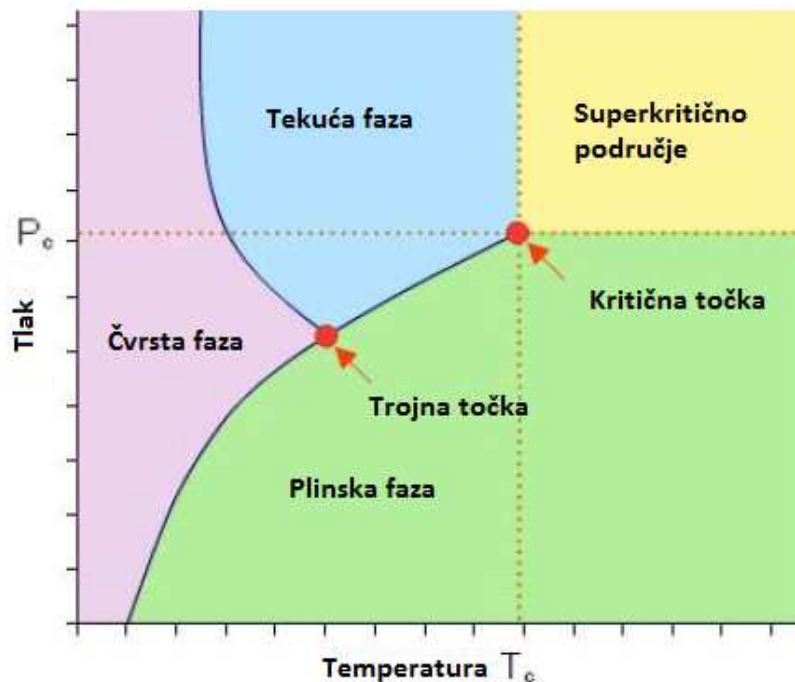
Nepokretne faze koje se koriste u SFC jednake su nepokretnim fazama koje se trenutno koriste u kromatografiji normalnih faza. Za separaciju se koriste različite pokretne faze, iako se one koje se temelje na ugljikovom dioksidu najčešće koriste. Pri odabiru pokretne faze za SFC sustave važno je imati na umu da ugljikov dioksid najčešće zahtjeva dodatak organskih modifikatora (kao što su alkoholi) za eluiranje polarnih analita [92, 93].

Nedostaci SFC su uglavnom vezani uz pokretnu fazu ili opremu a uključuju [94, 95]:

- ograničen odabir pokretne faze,
- ograničenu topljivost analita u pokretnoj fazi,
- neželjene reakcije s pokretnom fazom (na primjer, pri superkritičnim uvjetima CO<sub>2</sub> stvara karbamične kiseline s primarnim ili sekundarnim aminima) te
- ponavljanje i konsantno formiranje gradijenta koji uključuje i superkritični CO<sub>2</sub> i polarni organski modifikator.

### *Superkritični fluidi*

Za svaku tvar koja ostaje stabilna iznad svojih kritičnih uvjeta (grijana iznad njene kritične temperature i tlačena iznad njenog kritičnog tlaka) kaže se da je u superkritičnom stanju a tvari pri takvim uvjetima nazivamo superkritični fluidi [89] (**Slika 8.**). Pri tome, kritični tlak ( $p_k$ ) podrazumijeva najviši tlak pri kojem se, povećanjem temperature, tekućina može pretvoriti u plin, a kritična temperatura ( $T_k$ ) je najveća temperatura pri kojoj se tekućina može povećanjem tlaka pretvoriti u plin.



**Slika 8.** Fazni dijagram

Kritična točka definira uvjete (temperatura, tlak i ponekad sastav) pri kojima fluid ulazi u superkritično područje te ima nisku viskoznost.



Trojna točka čiste tvari određena je temperaturom i tlakom pri kojima koegzistiraju tri faze te tvari (plinovita, tekuća i kruta) u termodinamičkoj ravnoteži.

Za čisti ugljikov dioksid kritična točka nalazi se pri  $T_k=31,1$  °C i  $p_k=73,8$  bara, dok je trojna točka pri  $T_{tr}=-56,6$  °C i  $p_{tr}=5,17$  bara.

Plin neće kondenzirati u tekuće stanje iznad svoje kritične temperature bez obzira kako se tlak podizao. Na isti način, tekućina neće prelaziti u plinovito stanje iznad svojeg kritičnog tlaka bez obzira koliko se temperatura podizala [96].

Superkritični fluidi nisu ni tekućine ni plinovi, može se reći da su to fluidi s moći otapanja sličnom tekućinama, ali sa različitim svojstvima nego plinovi. Zbog toga ne možemo definirati superkritične fluide kao tekućine ili plinove ali upravo zato su zanimljivi kao pokretne faze za kromatografsko razdvajanje.

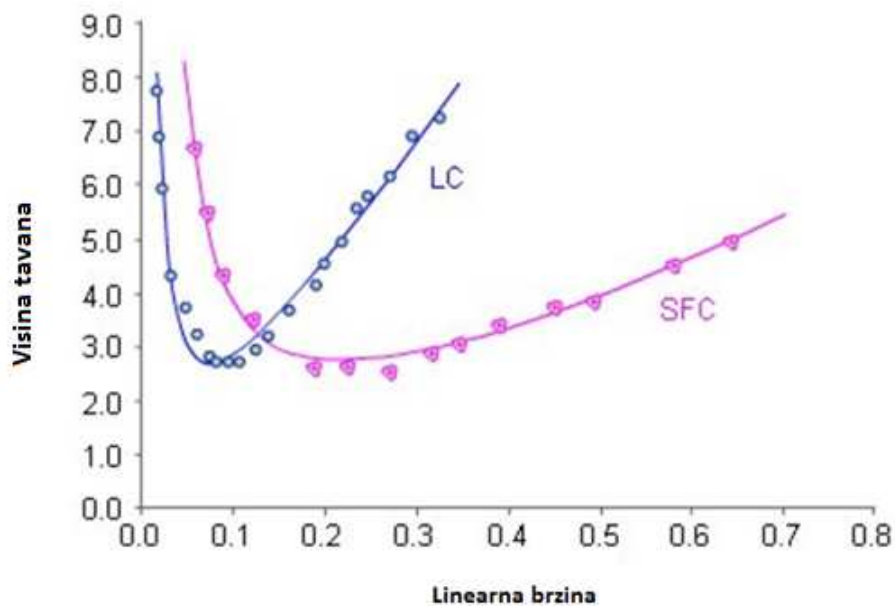
Korištenje prikladnih uvjeta temperature i tlaka, te sastava pokretne faze kritično je u SFC separaciji. Zbog različitih razloga, izvedbe instrumenta i načela rada, te utjecaja zbog dodavanja modifikatora, može se reći da korisnici zapravo rade sa donekle superkritičnim fluidima – no unatoč tome bitnija je ponovljivost primjenjenih uvjeta nego apsolutna potvrda da se radi u superkritičnim uvjetima. Varijacije koje uključuju koncentraciju ili vrstu organskog modifikatora promijeniti će superkritične karakteristike sustava.

U usporedbi s tekućinama (**Tablica 2.**), superkritični fluidi imaju veći koeficijent difuzije i manji otpor prema prijenosu mase – oboje rezultira oštrijim kromatografskim pikovima pri višim optimalnim linearnim brzinama što je vidljivo iz van Deemterovih krivulja [97].

**Tablica 2.** Odabrana indikacijska fizikalno-kemijska svojstva tekućina, plinova i superkritičnih fluida [82]

Svojstvo	Tekućina	Plin	Superkritični fluid
Gustoća ( $\text{kg m}^{-3}$ )	1000	1	200 – 800
Viskoznost (mPa)	0,5 – 1,0	0,01	0,05 – 0,1
Difuzivnost ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )	$10^{-5}$	0,1	$10^{-4}$ – $10^{-3}$

Općenito, optimalna linearna brzina za superkritični fluid je oko tri puta veća od eluenta u kondenziranoj fazi (**Slika 9.**), što rezultira bržom SFC separacijom bez gubitka u efikasnosti, odnosno razlučivanja.



**Slika 9.** Van Deemterova krivulja za SFC i LC

Detaljna usporedba fizikalno-kemijskih svojstava superkritičnih fluida i plinova govori da superkritični fluidi rezultiraju:

- povećanjem gustoće (100 – 1000 puta),
- povećanjem viskoznosti i
- povećanjem otapanja (budući da je topljivost analita obično vezana uz gustoću pokretne faze pri danoj temperaturi).

Za razliku od plinske kromatografije, pri radu sa SFC mogu se koristiti niske temperature.

Rad pri nižim temperaturama rezultira sljedećim prednostima:

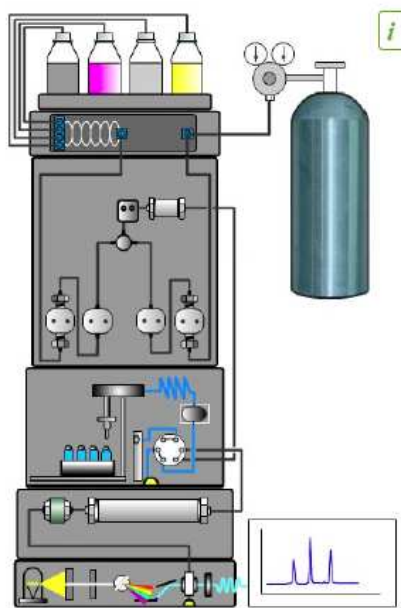
- smanjenje faktora zadržavanja,
- povećanje potencijala za enantioselektivnost i
- mogućnost analize temperaturno osjetljivih uzoraka.

#### *SFC instrumenti*

SFC sadrži mnogo karakteristika tekućinske i plinske kromatografije i upravo zato, može se reći da se nalazi između tekućinske i plinske kromatografije. Postoje 2 glavne izvedbe SFC [97]:

- kapilarna SFC: ovaj oblik SFC-a predstavlja sličnosti sa klasičnom kapilarnom GC-om i
- tipični SFC: ovaj oblik SFC-a predstavlja sličnosti sa klasičnom kapilarnom HPLC-om.

**Slika 10.** ilustrira SFC instrument.



**Slika 10.** Shema SFC uređaja [84]

Danas se najviše primjenjuje SFC koja koristi HPLC opremu za postizanje separacije pri superkritičnim uvjetima. Postoji nekoliko ključnih karakteristika koje razlikuju pakiranu SFC u odnosu na tradicionalnu HPLC izvedbu koje uključuju:

- potreba za spremnikom za CO<sub>2</sub>,
- oprema za regeneraciju CO<sub>2</sub> (npr. uklanjanje ostatka organskog modifikatora prije recirkuliranja ili odlaganja u spremnik) i
- restrikcija tlaka postavljena iza kromatografske kolone.

Separacija pri superkritičnim uvjetima provodi se pri protocima pokretne faze od nekoliko mililitara u minuti i volumenima injektiranja u rasponu od nekoliko do nekoliko stotina mikrolitara što SFC čini prikladnim za rad kao preparativni.

Miješanje CO<sub>2</sub> pri superkritičnim uvjetima s organskim modifikatorom ostvaruje se na sličan način kao miješanje otapala u HPLC-u.

#### 2.3.4.1. *Primjena SFC u farmaceutskoj industriji*

Cilj svake analize u farmaceutskoj industriji je odrediti kvalitetu aktivne djelatne tvar ili lijeka primjenom različitih analitičkih tehnika. Smatra se da je tehnika tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane s različitim detektorima (najčešće DAD ili MS) zlatni standard

industrije. Usprkos velikom broju dostupnih nepokretnih faza i velikom broju parametara metode koji se mogu optimizirati pri razvoju metoda, nije moguće uvijek razdvojiti sve komponente prisutne u uzorku, pogotovo ukoliko su različite komponente bazične, kisele ili neutralne prirode. Veliki problem predstavlja i minimalni zahtjev za razlučivanje od 1,5 što može predstavljati potencijalni problem zbog velike koncentracije aktivne djelatne tvari u odnosu na onečišćenja što rezultira širokim pikom glavne komponente. Zbog različite selektivnosti tehnike kao i značajnog napretka u razvoju analitičke instrumentacije, u novije vrijeme za analize aktivnih djelatnih tvari i lijekova koristi se fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima. Ortogonalna selektivnost metode bitna je zbog onečišćenja koja zbog sličnosti aktivnoj djelatnoj tvari eluiraju zajedno s njom. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima slična je kromatografiji normalnih faza te je zbog toga pogodna za analize nepolarnih spojeva poput lipida [98], vitamina [99, 100] i steroida [101, 102]. Dodatkom polarnih otapala poput metanola, etanola, izopropanola ugljičnom dioksidu pri superkritičnim uvjetima moguće je eluiranje polarnih analita, što omogućuje široki spektar analiza. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima može se koristiti kao kromatografija normalnih ili obrnutih faza ovisno o nepokretnoj fazi. Razvojem novih pokretnih faza, SFC se često koristi i za analizu polarnih spojeva [103-105] što je čest slučaj u analizama farmaceutika i njihovih metabolita [106]. Brojne prednosti koje donosi rad s fluidnom kromatografijom pri superkritičnim uvjetima u odnosu na klasične metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti ipak nisu dovoljne da se počne rutinski koristiti u većem obujmu u laboratorijima kontrole kvalitete. SFC se više koristi u fundamentalnim studijama i za separaciju kiralnih spojeva nego za kvantitativnu analizu. U prošlosti, uporaba SFC bila je ograničena lošijom osjetljivošću i reproducibilnošću u odnosu na HPLC, te nije bilo moguće razviti robusnu metodu niti je validirati [107]. Najveći nedostatak bio je loša osjetljivost UV detekcije u odnosu na LC-UV, zbog velikog šuma bazne linije. Visoki šum bazne linije bio je posljedica fluktuacije tlaka zbog promjene gustoće superkritičnog fluida. Međutim, zadnjih nekoliko godina novim dizajnom regulatora tlaka (eng. *back pressure*) omogućena je bolja kontrola tlaka [108, 109]. Osjetljivost metoda za analize onečišćenja je ključna, obzirom da granica kvantifikacije mora biti od 0,02 % – 0,05 % u odnosu na aktivnu djelatnu tvar te da omjer šuma i signala mora biti veći od 10. Da bi se to ostvarilo i da bi bilo moguće validirati takve metode, potrebno je imati niski šum bazne linije [108-109]. Razvojem kolona s dimenzijama čestica manjim od 2  $\mu\text{m}$  potrebno je koristiti brzinu snimanja veću od 10 Hz, a povećanje brzine snimanja rezultira još većim šumom bazne linije [108]. Detektori na SFC instrumentima i dalje imaju veći šum bazne linije

u odnosu na HPLC, ali razvojem opreme šum je značajno smanjen. Uporaba visokih tlakova te niskih temperatura kolone rezultira nižim šumom bazne linije [109]. Razvojem SFC instrumenata, ova tehnika se može koristiti za kvantitativne analize onečišćenja u aktivnim djelatnim tvarima, s granicama kvantifikacije od 0,05 % – 0,10 % [110-112]. Prvu validaciju metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima ultravisoke djelotvornosti (eng. *ultra high performance supercritical fluid chromatography*, UHPSFC) i usporedbu s postojećom UHPLC metodom načinili su Dispas i suradnici [113]. Oni su usporedili metode s kvantitativnog aspekta te načinili validaciju s realnim uzorcima. Usporedbu profila onečišćenja SFC i UHPLC metode prvi su načinili Wang i suradnici 2011. godine [114] koji su razvili i parcijalno validirali (podešavanjem koncentracije uzorka) ortogonalnu SFC metodu za analizu mometazon fluorata. Granica kvantifikacije razvijene SFC metode iznosi 0,05 %, a obje metode omogućile su razdvajanje svih onečišćenja. Selektivnost HPLC i SFC metode je bila ortogonalna, onečišćenja koja su eluirala prva HPLC metodom, SFC metodom eluirala su zadnja. Slična usporedba metoda [111], načinjena je analizom lijeka s dvije djelatne tvari i njihovih srodnih spojeva. Bazična monoklorirana triciklična-heterocilična djelatna tvar sa šest srodnih spojeva i djelatna tvar aripiprazole s osam srodnih spojeva razdvojeni su SFC metodom. Ortogonalna metoda imala je dobru ponovljivost s obzirom na vremena zadržavanja i značajno bolju osjetljivost (~12 puta veću) što je omogućilo upotrebu razvijene metode za određivanje onečišćenja s granicom kvantifikacije od 0,1 %. Razvojem novije generacije instrumenta prvenstveno UPC<sup>2</sup> Waters instrumenata, pokazale su se dodatne prednosti SFC kao ortogonalne tehnike: jednoličnija raspodjela pikova kroz cijeli kromatogram, manji nagib bazne linije i jednostavniji razvoj metoda u odnosu na UHPLC metode [106].

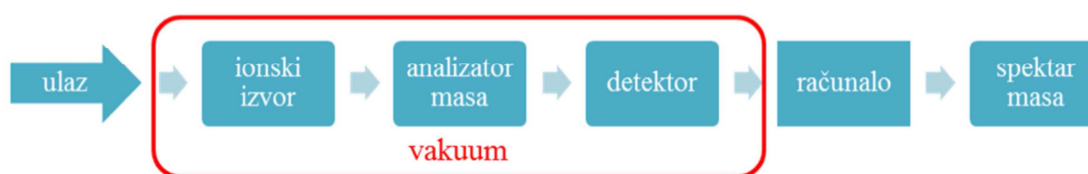
#### 2.4. Spektrometrija masa

Tekućinska kromatografija i spektrometrija masa do prije dvadesetak godina bile su dvije potpuno odvojene tehnike, uglavnom zbog nepostojanja odgovarajućeg sučelja putem kojeg bi se povezale ove dvije tehnike. Sedamdesetih i osamdesetih godina, međutim, došlo je do povezivanja LC i MS na područjima mehanizama desorpcije, otparavanja i ionizacije analita u tekućoj fazi, ionizacije pri atmosferskom tlaku i povezivanja ionizatora i analizatora, što je predstavljalo ogroman iskorak k rutinskoj upotrebi tzv. vezanog sustava LC-MS [21, 22, 115-118].

Spektrometrija masa temelji se na ionizaciji i fragmentaciji molekula uzorka, odabiru pojedinih ioniziranih strukturnih fragmenata te njihovoj detekciji [119, 120].

Spektrometar masa sastoji se od četiri dijela (**Slika 11.**):

- 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 11.** Shematski prikaz spektrometra masa

Prilikom ulaska u ionski izvor molekula se može ionizirati brzim elektronima pri čemu nastaje molekulski ion (13):



Molekulski ion podliježe fragmentaciji te nastaju ioni produkti. Fragmentacijom može nastati ion produkt s parnim brojem elektrona i radikal ili ion s neparnim brojem elektrona i neutralna molekula. Dobiveni ioni razdvajaju se u analizatoru masa na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ) i detektiraju [119]. 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. Ukoliko je potrebno dobiti djelomičnu ili potpunu fragmentaciju, koristi se:

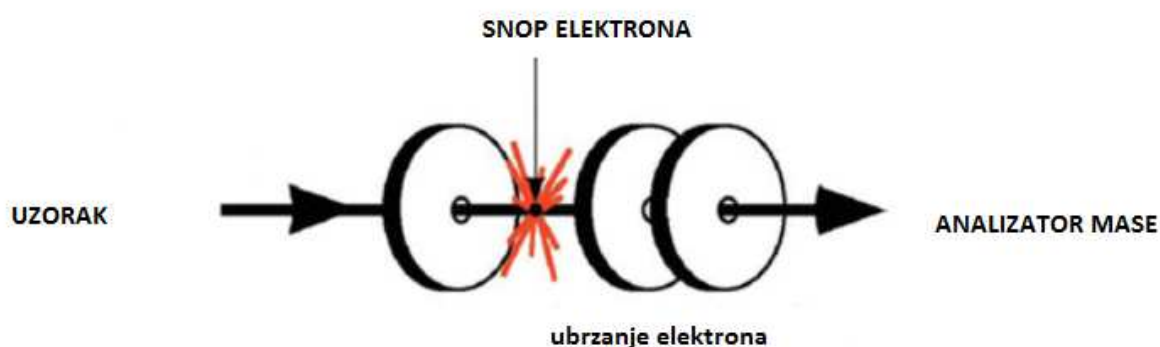
- ionizacija elektronima (eng. *electron impact ionisation*, EI),
- kemijska ionizacija (eng. *chemical ionisation*, CI) i
- ionizacija brzim atomima (eng. *fast atom bombardment*, FAB).

Ukoliko je potrebno dobiti blagu ionizaciju tada se koriste sljedeće tehnike ionizacije:

- 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).

### *Ionizacija elektronima*

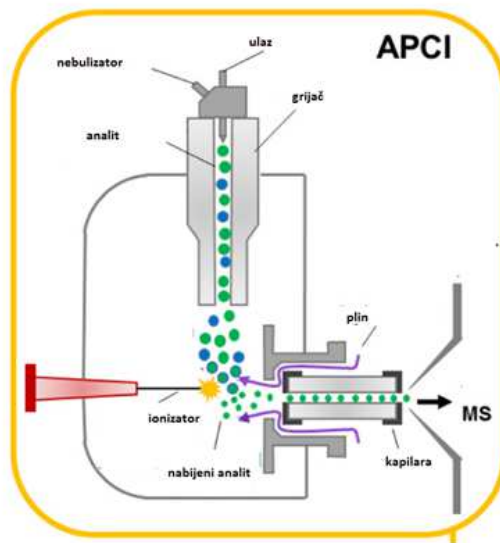
Ionski izvor za ionizaciju elektronima sastoji se od grijane katode od volframa ili renija koja emitira elektrone. Elektroni se ubrzavaju razlikom potencijala između katode i anode te sudaraju s molekulama uzorka pri čemu nastaju ioni koji se usmjeravaju prema ionizatoru masa. Ionizacija elektronima uzrokuje znatnu fragmentaciju te pregradnje između novonastalih produktnih iona. Proces ionizacije elektronima prikazan je na **Slici 12**. Navedena tehnika ionizacije koristi se za analizu molekula koje daju stabilne molekulske ione te za određivanje molekulske strukture na temelju karakterističnih fragmenata [119].



**Slika 12.** Proces ionizacije elektronima [121]

### *Kemijska ionizacija*

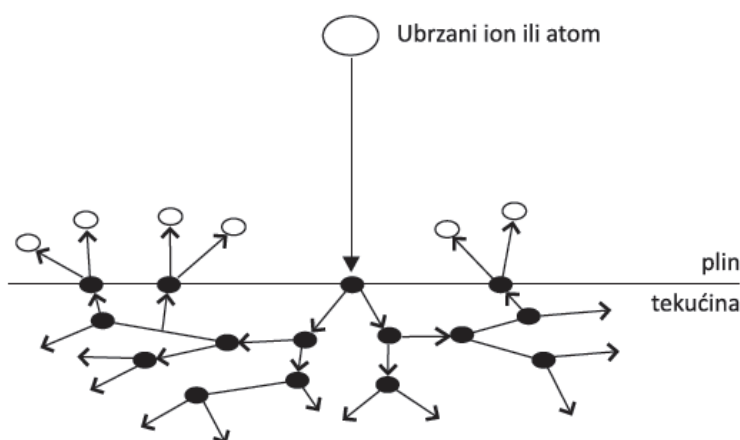
Kemijska ionizacija uključuje analizu analita pomoću plina reagensa prisutnog u ionskom izvoru. Plin reagens ionizira se elektronima te reagira s molekulama analita pri čemu mogu nastati kationi ili anioni. Proces kemijske ionizacije prikazan je na **Slici 13**. Fragmentacija korištenjem kemijske ionizacije slabija je u odnosu na ionizaciju elektronima jer nastali ioni posjeduju manju energiju. Kemijska ionizacija može se provoditi pri sniženom ili pri atmosferskom tlaku (eng. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Prednost ionizacije pri atmosferskom tlaku je veća učinkovitost ionizacije zbog većeg broja sudara između molekula i plina reagensa [119].



**Slika 13.** Proces kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku [122]

### *Ionizacija brzim atomima*

Ionizacija brzim atomima je tehnika ionizacije u kojoj se otapalo s kolone uvodi izravno u područje visokog vakuuma, a radi isključivo sa sektorskim analizatorima koji imaju radni protok od 0,5 – 10 mL u minuti. Pri tome, sredstvo ionizacije su atomi Xe, Ar ili Cs dodatno usmjereni i ubrzani (8 keV) prema molekulama analita koji se pak nalazi u matrici (nitrobenzilni alkohol, glicerol ili tioglicerol). Pokretna faza, analit i matrica, na ulazu u ionizator razmazuju se u tanki sloj, pokretna faza otparava a matrica i analit se izlažu udaru ubrzanih atoma (**Slika 14.**). Mehanizam ionizacije je desorpcija, a ionizacija može biti pozitivna i negativna. Ova je ionizacija poznata kao LSIMS (eng. *liquid secondary ionizati on mass spectrometry*) [22, 120].

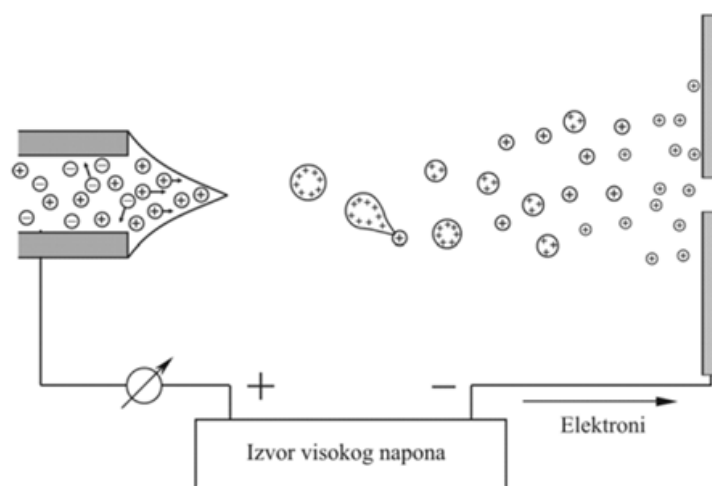


**Slika 14.** Proces ionizacije brzim atomima [22]



### *Ionizacija elektroraspršenjem*

Proces ionizacije elektroraspršenjem uključuje nebulizaciju tekuće faze uz nastajanje nabijenih kapljica i desolvataciju iona analita pri atmosferskom tlaku te njihov odlazak u plinsku fazu. Tekući uzorak uvodi se u ionski izvor pomoću metalne kapilare što omogućava nabijanje površine tekućine koja izlazi iz kapilare u obliku raspršenih kapljica. Otapalo iz nabijenih kapljica isparava upotrebom plina za sušenje (dušik). Smanjenjem volumena kapljice povećava se površinska gustoća naboja sve dok odbojne Coulombove sile ne uzrokuju potpuni raspad kapljice i nastajanje mikrokapljica koje prelaze u ione. Ekspanzijom plina nastali ioni uvode se u vakumirani prostor te kroz sustav leća u analizator masa [119]. Na **Slici 15.** dan je shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem.

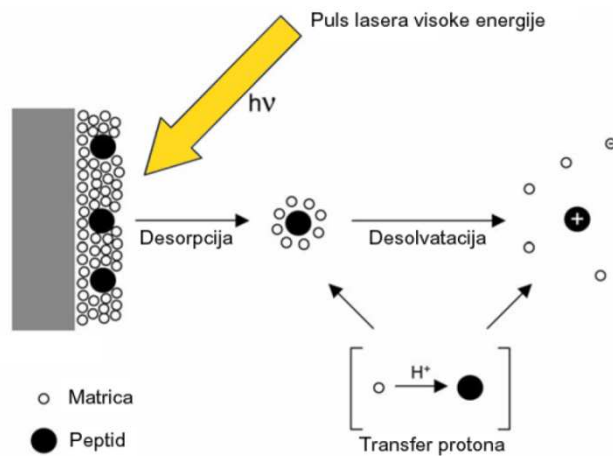


**Slika 15.** Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem [123].

### *Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem*

Ionizacija tehnikom MALDI obuhvaća dva koraka. U prvom koraku uzorak se otapa u otapalu koje sadrži male organske molekule, odnosno matrici. Molekule u sastavu matrice imaju veliki apsorpcijski koeficijent pri valnoj duljini laserske pobude, što omogućava njihovu desorpciju. Kao matrice najčešće se upotrebljavaju otopine  $\alpha$ -cijano-4-hidroksinamatne kiseline, trihidroksiacetofoneona ili 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline. Izbor otapala ovisi o polarosti uzorka. Nakon otapanja uzorka, otopina se suši čime se uklanja otapalo. Drugi korak ionizacije odvija se u vakuumu unutar izvora spektrometra masa. Pobudom kratkim laserskim pulsevima dolazi do desorpcije matrice s uzorkom nakon čega slijedi desolvatcija i

ionizacija koja uključuje prijenos protona u plinovitom stanju (**Slika 16.**). Dobiveni ioni ubrzavaju se uslijed razlike potencijala i usmjeravaju prema analizatoru [119].



**Slika 16.** Shematski prikaz ionizacije tehnikom MALDI[124].

#### 2.4.1. Analizatori masa

Analizatori masa imaju svrhu razdvajanja nastalih iona u vakuumu na temelju njihovih omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Postoji nekoliko vrsta analizatora masa [119]:

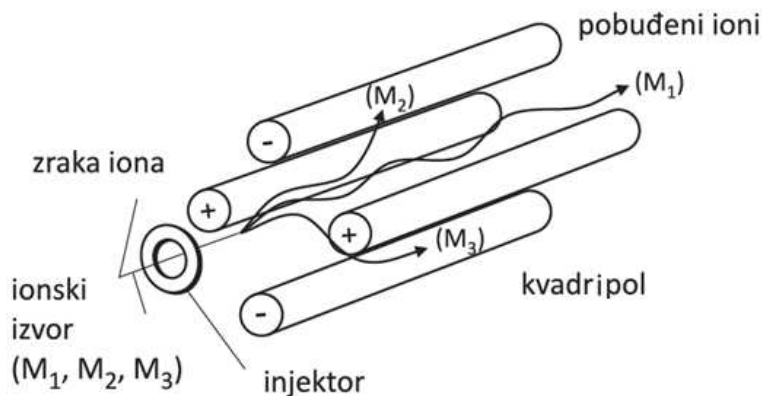
- kvadripolni analizator mase (eng. *quadrupole mass analyzer*, Q).
- kvadripolni analizator masa s ionskom klopkom (eng. *ion trap*, IT).
  - linearni (eng. *linear ion trap*, LIT).
  - orbitalni (*Orbitrap*).
- analizator koji mjeri vrijeme preleta (eng. *time of flight*, TOF).
- analizator mase ionsko-ciklotronske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

Primjena analizatora mase ovisi o njihovim svojstvima. Najznačajniji parametri koji određuju svojstva pojedinog analizatora su: osjetljivost, gornja granica vrijednosti omjera  $m/z$ , razlučivanje i točnost mjerenja. Osjetljivost analizatora mase definirana je kao najmanji omjer mase i naboja koji se još može detektirati. Radno područje analizatora mase određeno je osjetljivošću i gornjom granicom vrijednosti  $m/z$ . Razlučivanje je omjer srednje mase i najmanje razlike u masama dvaju iona čiji se signali još mogu razlučiti. Točnost mjerenja određena je slaganjem izmjerene i prave vrijednosti  $m/z$ . Najvažniji su analizator masa koji mjeri vrijeme preleta i kvadripolni analizator masa.

### 2.4.1.1. Kvadripolni analizator masa

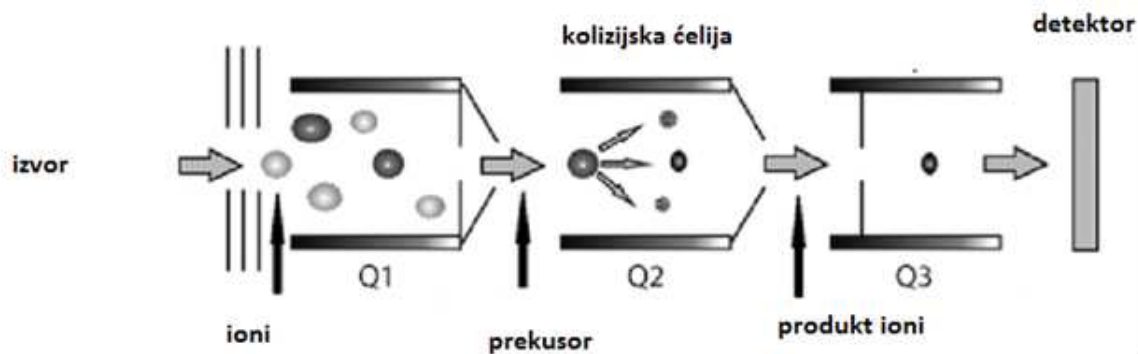
Kvadripol (Slika 17.) je jedan od najzastupljenijih analizatora masa. Sastoji se od četiri elektrode koje su dijagonalno električki povezane. Pri tome, jedan par elektroda ima pozitivni, a drugi negativni polaritet. Dodatno su ti parovi elektroda spojeni s radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180 stupnjeva izvan faze. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite vrijednosti  $m/z$  i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule [22].

Zbog brzine skeniranja koju je moguće postići, kvadripolni analizator masa posebno je pogodan za vezane tehnike poput plinske ili tekućinske kromatografije vezane sa spektrometrijom masa. Glavni nedostatak kvadripolnog analizatora je slabije razlučivanje i manja točnost u odnosu na ostale vrste analizatora.



Slika 17. Kvadripolni analizator masa [22]

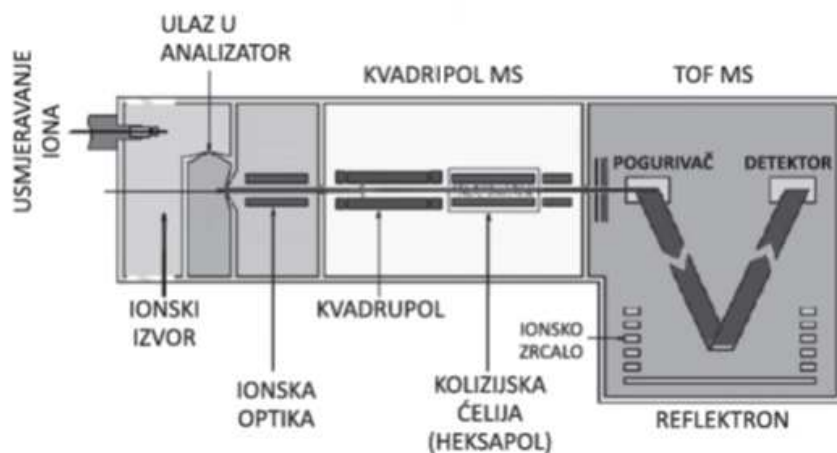
Spregnuta spektrometrija masa (MS/MS,  $MS^n$ ) omogućava povezivanje nekoliko procesa izbora masa koji slijede jedan za drugim. Pri tome, prostorno spregnuti uređaji zahtijevaju odvojene analizatore masa za svaki stupanj MS/MS analize. Primjer je trostruki kvadripol (eng. *triple quadrupol*, QqQ) (Slika 18.) koji se najčešće koristi za kvantitativne analize u farmaceutskoj industriji jer osigurava veću selektivnosti u odnosu na jednostruki kvadripol. Tijekom QqQ analize u prvom kvadripolu (Q1) dolazi do ionizacije spoja, u drugom kvadripolu (kolizijskoj ćeliji) (q2) dolazi do fragmentacije molekule na određene fragmente a u trećem kvadripolu (Q3) prate se odabrani fragmentni ioni. Na taj način na kromatogramu se detektira jedna molekula s molekulskim ionom i odabranim fragmentnim ionom.



Slika 18. Trostruki kvadripolni analizator masa [124]

#### 2.4.1.2. Analizator mase koji mjeri vrijeme preleta

Princip rada analizatora TOF 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. Vrijeme preleta iona do detektora je između 5  $\mu\text{s}$  i 100  $\mu\text{s}$ . Analizatori TOF (Slika 19.) mogu imati ugrađeno ionsko ogledalo (eng. *reflectron*, *ion mirror*), koje omogućava da ioni istih masa, a različitih  $E_k$ , istovremeno dođu do detektora. Analizatori TOF često se hibridiziraju s kvadripolnim analizatorima, što im daje mogućnost analiza MS/MS [22, 125].



Slika 19. TOF analizator [22]

## 2.5. Kvaliteta ugrađena u dizajn

U farmaceutskoj industriji cilj razvoja proizvoda je razviti kvalitetan proizvod te imati reproducibilan proizvod željene kvalitete. Razvoju analitičkih metoda pridaje se velika pažnja, pri čemu su sve veći zahtjevi za sustavnim pristupom razvoju metoda. Tradicionalni pristup razvoju metode u kojem se mijenja i promatra jedan po jedan faktor, dok se ostali drže konstantnima, zahtijeva veliki broj eksperimenata bez garancije da će se postići optimalni rezultati što može zahtijevati daljnji rad na razvoju metode. Unazad nekoliko godina, nakon implementacije od strane nekoliko svjetskih regulatornih tijela, poput Američke agencije za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA), Europske agencije za lijekove (eng. *European Medicines Agency*, EMA), japanske Agencije za lijekove i medicinsku opremu (eng. *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*, PMDA) i kanadskog vladinog Odjela za zdravlje (eng. *Health Canada*, HC), pristup „kvaliteti osiguranoj dizajnom“ (eng. *quality by design*, QbD) postao je integralni dio razvoja farmaceutskih proizvoda i procesa. Važnost uvođenja QbD istaknuta je i u priručniku koji je izdala ICH [126] kao sustavnog pristupa razvoju koji započinje definiranjem ciljeva, stavlja naglasak na proizvod te razumijevanje i kontrolu procesa na temelju znanstvenih činjenica i upravljanja rizicima. Ovakvim pristupom smanjuje se mogućnost pojavljivanja pogrešaka i nedostataka u procesu i samom proizvodu. U skladu s QbD pristupom tijekom razvoja procesa potrebno je definirati procesne varijable, proučiti njihove interakcije, implementirati strategiju kontrole i konačno kontinuirano nadzirati proces. Analitičke metode također su procesi na koje se mogu primijeniti principi QbD tijekom razvoja metode s ciljem razvoja robustne metode kojom se postižu pouzdani mjerni rezultat uz razumijevanja utjecaja različitih varijabli na kvalitetu dobivenih informacija. Primjena QbD pristupa u razvoju metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti opisana je u nekoliko radova [127-130].

Razvoj metode sastoji se od sljedećih koraka:

- definiranje cilja – razviti brzu, točnu, preciznu i selektivnu metodu za kvantitativno određivanje djelatne aktivne tvari i onečišćenja
- izbor kritičnih značajki kvalitete (eng. *critical quality attributes*, CQA), odnosno mjerljivih veličina koje omogućuju procjenu kvalitete razvijene analitičke metode. Za separacijske tehnike poput kromatografije uobičajena kritična značajka kvalitete je selektivnost metode izražena preko faktora razlučivanja ( $R_s$ ), a može se koristiti vrijeme trajanja analize, preciznost te granica kvantifikacije.

- procjena rizika, odnosno definiranje kritičnih procesnih parametara (eng. *critical process parameters*, CPP) čije varijacije mogu utjecati na kritične značajke kvalitete i stoga se moraju pratiti kako bi se osigurala željena kvaliteta rezultata analize. U kromatografskoj analizi veliki je broj parametara koji mogu utjecati na kvalitetu rezultata, stoga se preporuča u ovom koraku koristiti alate kvalitete poput dijagrama tijekom analitičkog procesa i Ishikawinog dijagram kako bi se identificirali kritični procesni parametri.
- planiranje eksperimenata (eng. *design of experiments*, DoE) i razvoj matematičkog modela koji opisuje ovisnost kritične značajke kvalitete o kritičnim procesnim parametrima te definiranje teoretskog područja robusnosti metode (eng. *design space*), odnosno višedimenzionalnog područja unutar kojega varijacije kritičnih procesnih parametara ne uzrokuju značajne promjene kritične značajke kvalitete.

Obzirom da je za dizajn eksperimenata potrebno razviti i prikladan matematički model, danas postoje mnogobrojni računalni programi koji ubrzavaju razvoj analitičkih metoda. Jedan od najznačajnijih računalnih programa je DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka). Uz pomoć programa DryLab® moguće je predvidjeti ponašanje analita na nepokretnoj fazi tako što se prvo definiraju parametri poput načina eluiranja, pH-vrijednosti i protoka pokretne faze, temperature, trajanja eluiranja i ostalo. Korištenjem programa DryLab® bitno se smanjuje broj potrebnih eksperimenata čime se skraćuje vrijeme potrebno za optimizaciju metode u nekim rutinskim primjenama, smanjuje se potrošnja kemikalija uz istovremeno dobivanje informacije o promjenama faktora (npr. temperatura, vremenski gradijent, pH-vrijednost) prilikom kromatografskih analiza [130-132].

## 2.6. Solvofobna teorija

Teorijska osnova računalnog programa DryLab® je proučavanje termodinamičke slobodne energije kromatografskog sustava i definiranje tzv. „solvofobnih retencijskih snaga” [132, 133]. Solvofobna teorija je model koji opisuje kromatografsko ponašanje spojeva koristeći principe klasične termodinamike. Prema toj teoriji, kromatografski proces je predstavljen kao reverzibilno vezivanje molekula analita s ugljovodikovim ligandima na površini nepokretne faze. Dominantan utjecaj na vezanje ima pokretna faza, prije nego same privlačne sile između analita i liganda, a sila koja je odgovorna za vezivanje je smanjivanje nepolarne površine izložene pokretnoj fazi [132].

Solvofobna teorija se zasniva na pretpostavci da se kromatografski proces promatra kao dva procesa, kao solvatacija i interakcija analita s nepokretnom fazom. Računa se retencijska slobodna energija ( $\Delta F^{\circ}_{\text{assoc}}$ ) kao suma promjene standardne slobodne energije uslijed procesa solvatacije ( $\Delta F^{\circ}_j$ ) i promjene standardne slobodne energije uslijed procesa adsorpcije analita na alkilnu grupu pokretne faze ( $\Delta F^{\circ}_{\text{vdw,assoc}}$ ) [134].

Proces solvatacije sastoji se od tri procesa:

1. formiranja „šupljina“ u pokretnoj fazi u cilju „prihvatanja” molekula analita,  $\Delta F_{c,j}$ ,
2. smanjenja slobodnog volumena i
3. interakcija molekula analita u „šupljinama” s molekulama iz njihove okoline ( $\Delta F_{i,j}$ ) [134].

Sve ove interakcije dovode do promjene slobodne energije retencijskog procesa opisane jednadžbom (14):

$$\Delta F^{\circ}_{\text{assoc}} = \Delta F^{\circ}_{\text{vdw,assoc}} + (\Delta F_{c,SL} + \Delta F_{i,SL}) - (\Delta F_{c,S} + \Delta F_{i,S}) - (\Delta F_{c,L} + \Delta F_{i,L}) - RT \ln \left( \frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (14)$$

Iz jednadžbe (14) izvedena je jednadžba (15) za faktor kapaciteta, mjerljivi kromatografski parametar:

$$k = A + BD + C\Delta A + \frac{D(\kappa e - 1)V_2}{3\gamma} + E + RT \ln \left( \frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (15)$$

gdje je:

S – analit,

L – ligand,

SL – kompleks analita i liganda,

$k$  – faktor kapaciteta,

A i C – konstante koje se određuju eksperimentalno

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

$\Delta A$  – površina solvofobnog kontakta između analita (S) i liganda s površinom nepokretne faze (L),  $m^2$

$\gamma$  – površinski napetost,  $N m^{-1}$

R – plinska konstanta,  $8.314 J K^{-1} mol^{-1}$

T – temperatura (K),

$p_0$  – atmosferski tlak (Pa),

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

$\kappa_e$  – molekularni parametar analita [132].

Jednadžba (15) opisuje utjecaj različitih faktora na faktor kapaciteta ( $k$ ) i to:

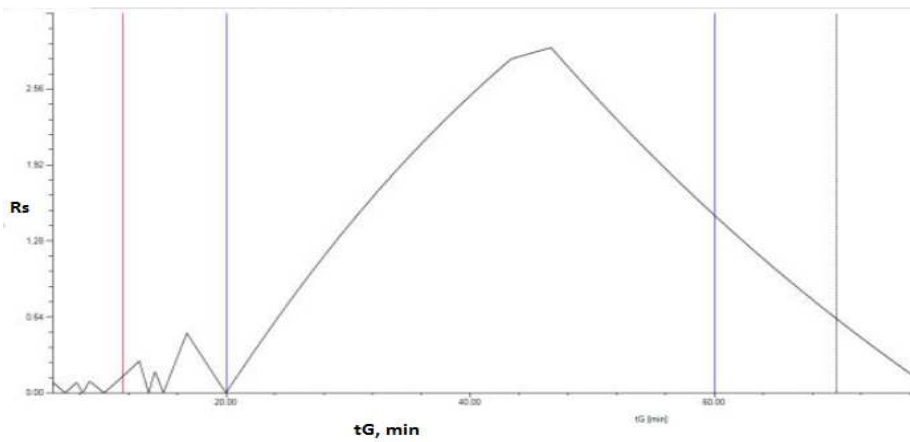
- utjecaj pokretne faze preko površinske napetosti ( $\gamma$ ) koja ovisi o sastavu pokretne faze,
- utjecaj temperature,
- utjecaj strukture analita i njegovog dipolnog momenta,
- utjecaj vrste nepokretne faze i
- utjecaj elektrostatskih svojstava i slobodnih energija [131, 134].

Nedostatak solvofobne teorije je fokus na ulogu pokretne faze u retencijskom ponašanju, pri čemu se ne uzimaju u obzir osobine nepokretne faze.

Računalni program DryLab® zasniva se na solvofobnoj teoriji uz primjenu egzo-termodinamičkih modela koji predstavljaju linearne funkcije zavisnosti  $\ln k$  o parametrima analita i eksperimentalnih promjenljivih parametara koji nisu termodinamički. Egzo-termodinamička zavisnost, koja se odnosi na zadržavanje analita, predstavljena je kao slobodna energija vezivanja (eng. *linear free energy relationship*, LFER), koja se sastoji od linearne solvatacijske energije vezivanja (eng. *linear solvation energy relationship*, LSER) i kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (eng. *quantitative structure activity relationship*, QSAR) [134]. Sam računalni program je jednostavan za uporabu, prije eksperimentalnih mjerenja potrebno je odlučiti koji parametri će se mijenjati, te se prati promjena vremena zadržavanja nakon promjene parametara. Generirani model kromatografskog ponašanja analita predstavlja se kritičnom mapom razlučivanja (eng. *critical resolution map*, CRM). Po definiciji, kritična mapa razlučivanja je najmanja vrijednost faktora razlučivanja ( $R_S$ ) između dva analita čije je razlučivanje najlošije (kritični par). Unosom rezultata inicijalne

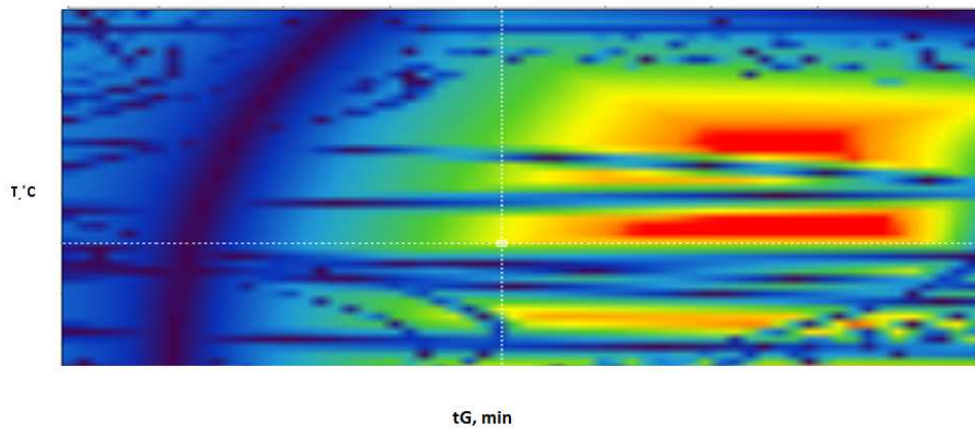


kromatografske analize program izračunava kritičnu vrijednost faktora razlučivanja i predstavlja je grafički u funkciji jednog parametra (1D mapa razlučivanja) pri čemu se kritična vrijednost faktora razlučivanja predstavlja na ordinati (**Slika 20.**).



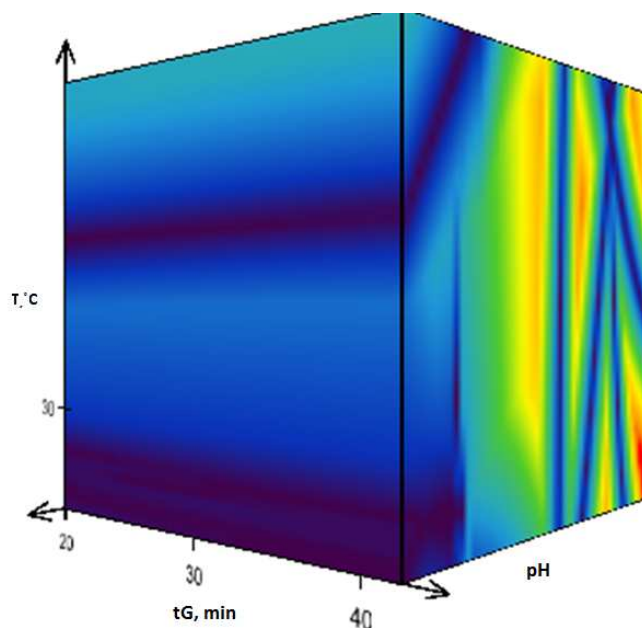
**Slika 20.** Primjer 1D mape razlučivanja

Kada se prati utjecaj dva parametra (2D mapa razlučivanja) kritična vrijednost faktora razlučivanja predstavljena je površinom različitih boja ovisno o postignutoj vrijednosti faktora razlučivanja (**Slika 21.**).



**Slika 21.** Primjer 2D mape razlučivanja

Moguće je pratiti istovremeni utjecaj tri parametra. U tom slučaju konstruira se 3D mapa razlučivanja u kojoj je kritična vrijednost faktora razlučivanja prikazana kockom a područja u različitim bojama, na površini i u unutrašnjosti kocke, odgovaraju vrijednostima faktora razlučivanja (**Slika 22.**). Pri tome, crvena boja predstavlja mjesta gdje je došlo do zadovoljavajućeg razlučivanja, dok su plavom bojom označena mjesta gdje postoje neka preklapanja ili gdje se pojavljuju neki drugi problemi tijekom analize [132, 133].



**Slika 22.**Primjer 3D mape razlučivanja

Od 2009. godine, u novoj verziji programa DryLab® v. 3.9 uvodi se mogućnost istovremene optimizacije tri kritična parametra predstavljena trodimenzionalnim mapama razlučivanja (3D kocka). Ova pogodnost pokazala se posebno korisnom u smislu smanjenja vremena izvođenja metoda opisanih u starijim izdanjima farmakopeja. Primjenom programa DryLab® 4 i UHPLC sustava, Schmidt [135] je uspio skratiti vrijeme trajanja metode za ispitivanje stupnja čistoće ebastina i njegovih farmaceutskih oblika sa 160 minuta na samo 3 minute. Nadalje, velika prednost programa DryLab® je što daje vizualni prikaz područja robusnosti metode čime omogućava lako uočavanje područja (vrijednosti ispitivanih parametara) u kojem promjene parametara na utječu na izvedbu metode što je vrlo korisno za optimizaciju metoda pristupom kvalitete ugrađene u dizajn.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada, njihova kemijska čistoća kao i proizvođač, prikazani su u **Tablici 3**.

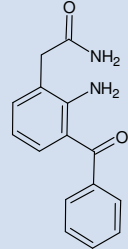
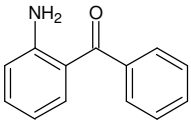
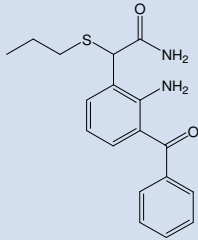
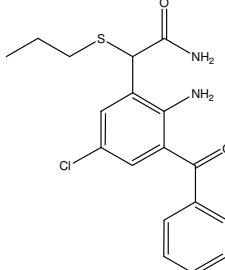
**Tablica 3.** Popis korištenih kemikalija

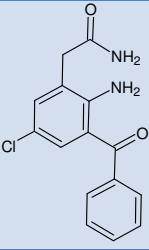
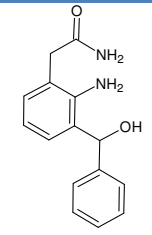
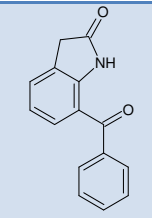
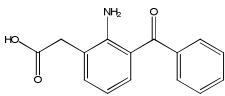
Naziv	Molekulska formula	Proizvođač	CAS broj	Čistoća
<b>Kalijev dihidrogen fosfat</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	101031156	<i>p.a</i>
<b>Amonijev dihidrogen fosfat</b>	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	7722-76-1	<i>p.a</i>
<b>Fosfatna kiselina</b>	$\text{H}_3\text{PO}_4$	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	7664-38-2	<i>p.a</i>
<b>Acetonitril</b>	$\text{CH}_3\text{CN}$	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	75-05-8	<i>p.a</i>
<b>Klorovodična kiselina</b>	$\text{HCl}$	Kemika, Zagreb, Hrvatska	7647-01-0	<i>p.a</i>
<b>Natrijev hidroksid</b>	$\text{NaOH}$	Kemika, Zagreb, Hrvatska	1310-73-2	<i>p.a</i>
<b>Vodikov peroksid, 30 %</b>	$\text{H}_2\text{O}_2$	Merck, Darmstadt, Njemačka	46424798 512	<i>p.a</i>
<b>Amonijev formijat</b>	$\text{NH}_4\text{HCO}_2$	Merck, Darmstadt, Njemačka	540-69-2	<i>p.a</i>
<b>Mravlja kiselina</b>	$\text{HCOOH}$	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	64-18-6	<i>p.a</i>
<b>Kalijev hidroksid</b>	$\text{KOH}$	Kemika, Zagreb, Hrvatska	67-56-1	<i>p.a</i>
<b>Metanol</b>	$\text{CH}_3\text{OH}$	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD	1310-58-3	<i>p.a</i>

### 3.1.2. *Standardi*

Popis standarda korištenih u ovom radu s njihovim molekulskim formulama i relativnim molekulskim masama nalazi se u **Tablici 4**. 2-aminobenzofenon nabavljen je od proizvođača Sigma–Aldrich (St. Luis, MI, USA). Svi ostali standardi sintetizirani su u TAPI Pliva, Hrvatska.

**Tablica 4.** Popis korištenih standarda i njihove strukturne formule

Naziv standarda	Molekulska formula, $M_r$	Struktura	Čistoća	Podrijetlo
<b>Nepafenak</b> <b>2-amino-3-benzoilbenzeneacetamide</b>	$C_{15}H_{14}N_2O_2$ 254,28		99,6 %	djelatna aktivna tvar
<b>2-aminobenzofenon</b> <b>(2-aminofenil)-fenil-metanon</b>	$C_{13}H_{11}NO$ 197,23		98,9 %	onečišćenje u početnom materijalu
<b>Tionepafenak</b> <b>2-(2-amino-3-benzoilfenil)-2-(propiltio)acetamid</b>	$C_{18}H_{20}N_2O_2S$ 328,43		98,0 %	intermedijer
<b>Cl-tionepafenak</b> <b>2-(2-amino-3-benzoil-5-klorofenil)-2-(propiltio)acetamid</b>	$C_{18}H_{19}ClN_2O_2S$ 362,87		99,0 %	procesno onečišćenje

<b>Cl-nepafenak</b> <b>2-(2-amino-3-benzoil-5-klorofenil)acetamid</b>	$C_{15}H_{13}ClN_2O_2$ 288,73		97,5 %	procesno onečiščenje
<b>Hidroksi-nepafenak</b> <b>2-(2-amino-3-(hidroksi(fenil)metil)fenil)acetamid</b>	$C_{15}H_{16}N_2O_2$ 256,30		97,6 %	procesno i razgradno onečiščenje
<b>Ciklički nepafenak</b> <b>7-benzoil-1,3-dihidro-2H-indol-2-one</b>	$C_{15}H_{11}NO_2$ 237,25		98,2 %	procesno i razgradno onečiščenje
<b>Amfenak</b> <b>(2-Amino-3-benzoilfenil)octena kiselina</b>	$C_{15}H_{13}NO_3$ 256,1		99,9 %	razgradno onečiščenje

3.1.3. *Nepokretne faze korištene u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti*

Za razvoj metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti ispitane su tri kromatografske kolone (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD) Osim navedenih kromatografskih kolona, tijekom analize razgradnih uzoraka nepafenaka uporabom dvodimenzionalne tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti u drugoj dimenziji korištena je C18 kromatografska kolona ZORBAX BONUS RP (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Dimenzije kolona i vrsta punila navedenih kromatografskih kolona prikazani su **Tablici 5**.

**Tablica 5.** Dimenzije kolona i vrsta punila kromatografskih kolona korištenih u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti

Naziv	Nepokrenta faza	Dimenzije
<b>Waters Acquity BEH C18</b>	C18	100 x 2,1 mm, 1,7 µm
<b>Waters Acquity BEH C8</b>	C8	100 x 2,1 mm, 1,7 µm
<b>Waters Acquity BEH Phenyl</b>	Fenil	100 x 2,1 mm, 1,7 µm
<b>Agilent Zorbax Bonus RP</b>	C18	50 x 2,1 mm, 1,8 µm

3.1.4. *Nepokretne faze korištene u razvoju metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima*

Za razvoj metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima korištene su tri kromatografske kolone (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD). Dimenzije kolona i vrsta punila ispitanih kromatografskih kolona prikazani su **Tablici 6**.

**Tablica 6.** Dimenzije kolona i vrsta punila kromatografskih kolona korištenih u razvoju metode fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima

Naziv	Nepokretna faza	Dimenzije
<b>ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH</b>	C18	100 x 3,0 mm, 1,7 μm
<b>Waters Torus 2- PIC</b>	2-etilpiridin	100 x 2,1 mm, 1,7 μm
<b>Waters Torus DIOL</b>	diol visoke gustoće	100 x 2,1 mm, 1,7 μm

### 3.2. Instrumenti

Kako bi se opisala i karakterizirala razgradnja onečišćenja nepafenaka, u istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan s detektorom s nizom elektroda (UHPLC- DAD),
- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (UHPLC-QQQ),
- dvodimenzionalni tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF),
- kromatograf za fluidnu kromatografiju pri superkričnim uvjetima vezan s detektorom s nizom dioda (UPC<sup>2</sup>-PDA) i
- uređaj za osvjetljivanje umjetnim Sunčevim zračenjem

#### 3.2.1. *Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan s detektorom s nizom dioda (UHPLC-DAD)*

Razvoj analitičke metode za analizu svih uzoraka proveden je na sustavu tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda. Korišten je UHPLC kromatograf Waters (Miliford, Masachusets, SAD) I-Class koji se sastoji od vakuumske degazera, automatskog uzorkivača, binarne crpke i detektora s nizom dioda (**Slika 23.**). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Waters Empower 2.





**Slika 23.** Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti (Waters I-Class)

3.2.2. *Dvodimenzionalni tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF)*

Određivanje strukture razgradnih onečišćenja nepafenaka provedeno je na UHPLC sustavu koji je vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom. Korišten je UHPLC kromatograf Agilent 1290 (Santa Clara, Kalifornija, SAD) koji se sastoji od vakuumskog degazera, automatskog uzorkivača, binarne crpke i spektrometra masa s trostrukim kvadripolom Agilent 6490 (Santa Clara, Kalifornija, SAD) (**Slika 24.**). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za Triple Quad B.01.04 (B84).



**Slika 24.** Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti (Agilent 1290) vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (Agilent 6490 )

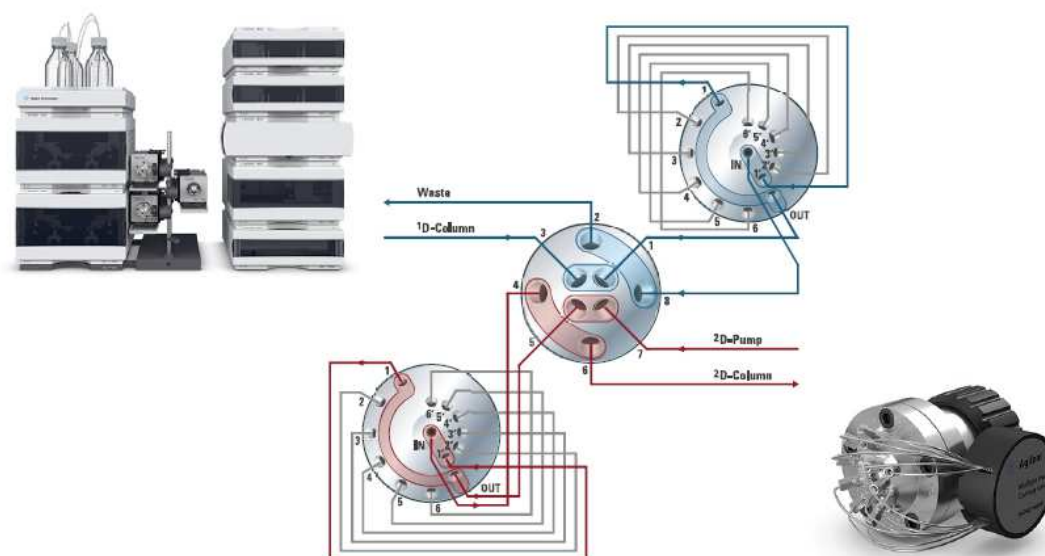
3.2.3. *Dvodimenzionalni tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF)*

Određivanje točne mase i fragmentacija razgradnih onečišćenja nepafenaka provedeno je na dvodimenzionalnom UHPLC sustavu. vezanom sa spektrometrom masa visoke razlučivosti. Korišten je sustav 2-D-UHPLC multiple heart cut Agilent 1290 (Santa Clara, Kalifornija, SAD) koji se sastoji od vakuumskog degazera, automatskog uzorkivača, binarne crpke, kvarterne crpke, dva ventila za pohranu uzorka i dva detektora: detektor s nizom dioda DAD 1290 (Santa Clara, Kalifornija, DAD) i spektrometar masa koji mjeri vrijeme preleta (TOF) Agilent 6550 (Santa Clara, Kalifornija, SAD) (**Slika 25.**). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnih programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za QTOF B.01.04 (B84) i Chemstation.



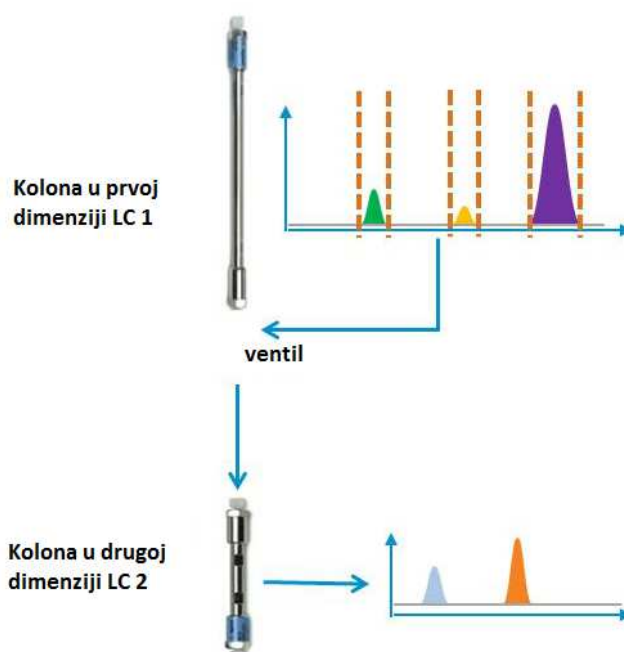
**Slika 25.** Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF)

Shematski prikaz 2D-UHPLC prikazan je na **Slici 26**.



**Slika 26.** Shematski prikaz dvodimenzionalnog tekućinskog kromatografa ultravisoke djelotvornosti

Tijek kromatografske separacije u dvije dimenzije je sljedeći: nakon injektiranja uzorka, dolazi do separacije u prvoj dimenziji, ciljani kromatografski pikovi se pohranjuju u ventilu, nakon čega se ciljani kromatografski pik injektira u drugu dimenziju u kojoj dolazi do dodatne separacije (**Slika 27.**).



**Slika 27.** Prikaz separacije u dvije dimezije

U prvoj dimenziji korištena je metoda razvijena za određivanje onečišćenja u nepafenaku, a za drugu dimeziju korišten je lako hlapivi pufer – 0,1 % mravlja kiselina u vodi i acetonitril.

#### 3.2.4. *Kromatograf za fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (UPC<sup>2</sup>-PDA)*

Razvoj metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima i određivanje onečišćenja nepafenaka provedeno je na sustavu fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima povezan s detektorom s nizom dioda (DAD). Korišten je kromatograf UPC<sup>2</sup> (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD) koji se sastoji od vakuumske degazera, automatskog uzorkivača, regulatora tlaka, binarne crpke i detektora s nizom dioda (**Slika 28.**). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je pomoću računalnog programa Empower 2 (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD).



**Slika 28.** Kromatograf za fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (UPC<sup>2</sup>) povezan s detektorom s nizom dioda (PDA)

#### 3.2.5. *Uređaj za osvjetljivanje simuliranim zračenjem*

Za razgradnju nepafenaka, krutine i otopine, Sunčevim zračenjem u rasponu valnih duljina 300 – 800 nm korišten je Suntest XLS+ uređaj (Atlas, Linsengericht, Njemačka, **Slika 29.**).

Izvor zračenja je ksenonska svjetiljka, a parametri koji se mogu ugađati su temperatura, intenzitet zračenja i vrijeme izlaganja .



**Slika 29.** Uređaj za osvjetljivanje simuliranim Sunčevim zračenjem Suntest XLS+

### 3.3. Metode rada

#### 3.3.1. Priprema otopina

Temeljna standardna otopina nepafenaka koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  pripravljena je otapanjem 25 mg standarda nepafenaka u 25 mL otapala. Za potpuno otapanje bilo je potrebno otopinu miješati na vorteks miješalici i koristiti ultrazvučnu kupelj. Ova otopina korištena je kao provjera u eksperimentima prisilne razgradnje.

Temeljne standardne otopine pojedinačnih onečišćenja masene koncentracije  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  pripravljene su vaganjem po 2 mg svakog od 7 onečišćenja na analitičkoj vagi (UMX2, MettlerToledo) i otapanjem u 10 mL otapala. Ponovno je za otapanje korištena vorteks miješalica i ultrazvučna kupelj.

Otopina smjese nepafenaka i onečišćenja pripravljena je otapanjem 25 mg nepafenaka, dodatkom po 1 mL alikvota prethodno pripremljenih temeljenih standardnih otopina onečišćenja te nadopunjavanjem otapalom do oznake. Tako pripravljena otopina sadržavala je 0,8 % svakog onečišćenja u odnosu na nepafenak.

Za metodu UHPLC otapalo je bilo smjesa acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v), a za metodu UPC<sup>2</sup>-PDA kao otapalo korišten je acetonitril.

Za ispitivanje linearnosti tijekom validacije metode pripravljena je temeljna standardna otopina smjese nepafenaka i onečišćenja u koncentracijama  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  . Otopina je

pripravljena otapanjem po 2 mg svakog onečišćenja i nepafenaka u tikvici od 20 mL i otapanjem u smjesi acetonitrila i ultračiste vode u omjeru 1:1 (v/v). Iz temeljne standardne otopine pripremljeno šest otopina različitih koncentracija analita ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  i  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) odgovarajućim razrjeđenjima temeljne standardne otopine smjese

Za procjenu iskorištenja metode pripremljene su četiri otopine nepafenaka vaganjem 25 mg standarda u tikvicu od 25 mL i otapanjem u odgovarajućem otapalu:

- prva odvaga otopljenja je u smjesi acetonitrila i ultračiste vode u omjeru (1:1, v/v)
- druga odvaga otopljenja je u otopini onečišćenja koncentracije  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  
koncentracija svakog pojedinog onečišćenja u odnosu na nepafenak iznosila je 0,01 %
- treća odvaga otopljenja je u otopini onečišćenja koncentracije  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  
koncentracija svakog pojedinog onečišćenja u odnosu na nepafenak iznosila je 0,10 %
- četvrta odvaga otopljenja je u otopini onečišćenja koncentracije  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  
koncentracija svakog pojedinog onečišćenja u odnosu na nepafenak iznosila je 0,25 %.

Za UHPLC analizu korišteni su sljedeći puferi:

- pufer pH-vrijednosti 3,0 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) pripremljen je na način da je odvagano 2,7218 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , otopljeno u ultračistoj vodi i nadopunjeno do oznake 2 L ultračistom (MilliQ) vodom. pH-vrijednost korigirana je dodatkom  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .
- pufer pH-vrijednosti 6,0 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) pripremljen je vaganjem 2,7218 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , otapanjem u ultračistoj vodi i nadopunjavanjem do oznake (2 L) ultračistom vodom. pH-vrijednost korigirana je dodatkom KOH.
- pufer pH-vrijednosti 9,0 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) pripremljen je vaganjem 2,3006 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , otapanjem u ultračistoj vodi i nadopunjavanjem do oznake (2 L) ultračistom vodom. pH-vrijednost korigirana je dodatkom  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
- pufer pH-vrijednosti 3,0 ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) pripremljen je na način da je odvagano 1.26012 g  $\text{HCOONH}_4$ , otopljeno u ultračistoj vodi i nadopunjeno do oznake (2 L) ultračistom (MilliQ) vodom. pH-vrijednost korigirana je potom dodatkom HCOOH

Puferi su korišteni za pripremu pokretne faze (otapalo A), dok je otapalo B acetonitril.

Sve otopine korištene za kromatografske analize prije upotrebe filtrirane su korištenjem  $0,45 \mu\text{m}$  PTFE filtera (Millipore, USA).

### 3.3.2. *Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana s detektorom s nizom dioda*

Razvoj metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda podrazumijevao je optimizaciju s ciljem postizanja što boljeg razlučivanja nepafenaka i onečišćenja. U tu svrhu ispitan je utjecaj sastava pokretne faze (puferi pH 3, 6 i 9, te različiti gradijenti) i temperature kolone (50 i 70 °C) na kromatografsko razlučivanje sastojaka ispitivane smjese. Eksperimentalni uvjeti svih eksperimenata optimizacije prikazani su kao prilog u **Tablicama P1 do P12**.

### 3.3.3. *Modeliranje kromatografske separacije*

Za modeliranje i određivanje zone robusnosti korišten je DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka) računalni program. Korištenjem programa moguće je modelirati kromatografsko razlučivanje i predvidjeti vrijeme eluiranja analita pri definiranim eksperimentalnim uvjetima (pH-vrijednost pokretne faze, trajanje gradijenta, temperatura kolone i sastav pokretne faze).

Za optimizaciju metode primjenom DryLab® programa korišteni su isti eksperimentalni uvjeti postavljeni za metodu UHPLC-DAD: temperature kolone 50 i 70 °C, a vrijeme trajanja analize iznosilo je 4 i 7 minuta. Protok pokretne faze iznosio je 0,6 mL min<sup>-1</sup>, a volumen zadržavanja 0,5 mL. Analizom rezultata DryLab metode dobiveni su optimalni parametri: temperatura kolone 50 °C i vrijeme trajanja 6,5 minuta, pri kojima je ponovljena UHPLC analiza. Zatim je provedena 2D-UHPLC-MS analiza, a rezultati su prikazani u poglavlju 4.3. Postavljeni parametri prikazani su u **Tablici 7**.

**Tablica 7.** Parametri kolone i instrumenta za UHPLC metodu

<b>DULJINA KOLONE (cm)</b>	<b>10</b>
<b>UNUTARNJI PROMJER (cm)</b>	0,21
<b>VELIČINA ČESTICA (µm)</b>	1,7
<b>BRZINA PROTOKA (mL min<sup>-1</sup>)</b>	0,6
<b>VOLUMEN INJEKTIRANJA (µL)</b>	1
<b>VOLUMEN ZADRŽAVANJA (mL)</b>	0,50
<b>VALNA DULJINA (nm)</b>	235

### 3.3.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrijom masa

Za karakterizaciju razgradnih onečišćenja korišten je tekućinski kromatograf (Agilent UHPLC 1290 Infinity) s binarnom pumpom i C18 kromatografskom kolonom (Waters Acquity BEH C18, 100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm), uz detektor s nizom dioda te dva spektrometra masa: spektrometar masa s trostrukim kvadripolom i spektrometar masa visoke razlučivosti. Za pokretnu fazu B korišten je acetonitril. Pokretna faza A bio je lako hlapivi pufer koji je pogodan za ionizaciju u spektrometru masa, u ovom radu korišten je 10 mmol L<sup>-1</sup> formijatni pufer pH 3. Postavljeni su uvjeti dobiveni modeliranjem kromatografskog razlučivanja korištenjem DryLab® računalnog programa: temperatura kolone 50 °C i vrijeme mjerenja 6,5 minute. Ukupno vrijeme analize iznosilo je 9 minuta. Protok je postavljen na 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Analizirane su otopine nepafanaka nakon prisilne razgradnje u kiselim, neutralnim i lužnatim uvjetima. Dodatno je analizirana standardna otopina nepafenaka (bez razgradnje) i slijepa proba koja je sadržavala samo otapalo (acetonitril i voda, 1:1 (v/v)). Snimljeni spektri uspoređeni su sa spektrom otapala. Pikovi koji se ne pojavljuju u otapalu su izdvojeni, a njihova masa i vrijeme zadržavanja je zabilježeno.

#### 3.3.4.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornost vezana s trostrukim kvadripolom

Za karakterizaciju razgradnih onečišćenja korišten je tekućinski kromatograf (Agilent UHPLC 1290 Infinity) s binarnom pumpom i C18 kromatografskom kolonom (Waters Acquity BEH C18, 100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm), uz detektor s nizom dioda i spektrometar masa s trostrukim kvadripolom (Agilent Technologies 6590 QQQ- MS). Analize su napravljene uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom modu, a kao plin nosilac korišten je dušik. Uvjeti na detektoru masa s trostrukim kvadripolom bili su sljedeći:

- napon fragmentora: 380 V
- napon na kapilari: 3000 V
- temperatura plina: 200 °C
- protok plina: 15 L min<sup>-1</sup>
- tlak raspršivača: 20 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica (eng. *sheat gas*): 400 °C

Na glavnim razgradnim onečišćenjima provedene su MS/MS analize. Mijenjana je energija sudara s ciljem dobivanja što više različitih fragmenta iz čega je bilo moguće iznijeti



zaključke o strukturi molekule. Ispitivane su sljedeće energije sudara: 0 eV, 10 eV, 15 eV, 20 eV, 30 eV i 40 eV.

#### 3.3.4.2. *Dvodimenzionalna tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa visoke razlučivosti*

Za 2D-UHPLC-MS analize korišten je tekućinski kromatograf (Agilent UHPLC 1290 Infinity) s binarnom pumpom i RP kromatografskom kolonom (ZORBAX Bonus-RP 2,1 × 50 mm, 1,8 μm) uz detektor s nizom dioda i spektrometrom masa visoke razlučivosti (Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOFLC- MS). U prvoj dimenziji kromatografski uvjeti bili su jednaki kao i prilikom uporabe UHPLC-QQQ. U drugoj dimenziji za pokretnu fazu A korištena je 0,1 % mravlja kiselina (v/v) koja je pogodna za ionizaciju u MS-u, a za pokretnu fazu B korištena je 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu.

Uvjeti na spektrometru masa visoke razlučivosti bili su sljedeći:

- napon fragmentatora: 380 V
- kapilarni napon: 3000 V
- temperatura plina: 200 °C
- protok plina: 15 L min<sup>-1</sup>
- tlak raspršivača: 20 psi
- temperatura plina za formiranje kapljica : 400 °C

Na glavnim razgradnim onečišćenjima provedene su MS/MS analize. Mijenjane su energije sudara s ciljem dobivanja što više različitih fragmenta iz čega su doneseni zaključci o strukturi molekule. Korištene su sljedeće energije sudara: 0 eV, 10 eV, 15 eV, 20 eV, 30 eV, 40 eV.

#### 3.3.5. *Validacija metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti*

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

##### *Specifičnost i selektivnost*

Specifičnost metode ispitana je analizom otopina nepafenaka nakon prisilne razgradnje i standardne otopine koja sadrži nepafenak (1 mg mL<sup>-1</sup>) i sva onečišćenja (koncentracija pojedinog onečišćenja 1 μg mL<sup>-1</sup>, odnosno 0,1 % u odnosu na nepafenak).

### *Linearnost*

Linearnost odziva instrumenta (površina kromatografskog pika) u ovisnosti o koncentraciji analita ispitana je u koncentracijskom području od  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  za nepafenak i onečišćenja.

Prilikom validacije metode linearnost je ispitana injektiranjem 6 otopina standarda nepafenaka i onečišćenja (2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka) u rasponu koncentracija od  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (0,01 % do 0,25 % u odnosu na koncentraciju nepafenaka). Svaka otopina je injektirana jednom.

### *Granice kvalifikacije i kvantifikacije*

Granice kvalifikacije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) određene su injektiranjem otopina poznatih koncentracija 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka prilikom testiranja preciznosti metode te provjerom odnosa signala i šuma. LOD i LOQ određeni su iz omjera signala i šuma (S/N), 3:1 za LOD i 10:1 za LOQ.

### *Točnost*

Točnost je blizina rezultata ispitivanja očekivanoj, unaprijed utvrđenoj vrijednosti. Točnost se definira i kao iskorištenje metode. Iskorištenje metode ispitano je pri koncentraciji nepafenaka od  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  i tri različite koncentracije onečišćenja: 0,1, 1,0 i  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Iskorištenje je određeno kao omjer određene koncentracije u odnosu na stvarnu i izraženo je u postocima. Ispitana je trostrukim injektiranjem otopine smjese standarda nepafenaka i poznatih onečišćenja pri 3 različite koncentracije: 0,01 % ( $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , LOQ), 0,10 % ( $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) i 0,25 % ( $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u odnosu na nominalnu koncentraciju otopine uzorka ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te izračunom iskorištenja

### *Preciznost*

Ponovljivost određivanja provjerena je injektiranjem 6 nezavisno pripremljenih otopina nepafenaka proizvedenim komercijalnim postupkom i standarda nepafenaka. Otopina uzorka nepafenaka nacijepljena je svim onečišćenjima pri koncentraciji 0,10 %, u odnosu na nominalnu koncentraciju ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Obnovljivost je ispitana analizom šest nezavisno pripremljenih standardnih otopina smjese nepafenaka ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i onečišćenja (koncentracija pojedinog onečišćenja  $0,10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,10 \%$  u odnosu na koncentraciju nepafenaka). Preciznost je iskazana u postocima kao relativno standardno odstupanje.

Srednja preciznost ispitana je korištenjem različitih serijskih brojeva kolona i instrumenata: istovjetni ali neovisno pripremljeni uzorci analizirani su uporabom dva UHPLC sustava tijekom dva dana, u istom laboratoriju (Odjel istraživanja i razvoja, TAPI, Pliva Hrvatska) uz rad dvaju analitičara.

#### *Robusnost*

Eksperimentalni uvjeti metode su promijenjeni te se provjeravao utjecaj uvedenih varijacija na kromatografsko razlučivanje između pikova 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka. Ispitan je utjecaj promjene protoka pokretne faze u rasponu od  $0,5$  do  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  te utjecaj promjene temperature kućišta kolone ( $45$  do  $55 \text{ } ^\circ\text{C}$ ).

#### *Stabilnost*

Stabilnost otopina standarda i uzorka nepafenaka proizvedenog komercijalnim postupkom ispitana je ostavljanjem pripremljenih otopina koncentracije  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  u začepljenim volumetrijskim tikvicama 6 sati na sobnoj temperaturi.

#### *3.3.6. Prisilna razgradnja nepafenaka*

Prisilna razgradnja nepafenaka ispitana je pri uvjetima opisanim u ICH Q1B priručniku (Option-1) [136] pri čemu je korištena temeljna standardna otopina nepafenaka ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Izvedeno je ukupno sedam eksperimenata s ciljem ispitivanja utjecaja temperature (otopina i čvrsti standard), vlažnosti i svjetla na stabilnost nepafenaka te podložnost oksidaciji, kiseloj i baznoj hidrolizi. Otopina nepafenaka pripremljena je otapanjem

- $25 \text{ mg}$  nepafenaka u  $25 \text{ mL}$  smjese acetonitrila i ultračiste vode ( $1:1, \text{ v/v}$ ), onečišćenja koja su bila prisutna nisu razmatrana u putevima razgradnje.

### *Hidroliza*

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

- Kod prve otopine je u tikvicu od 25 mL odvagano 25 mg nepafenaka, dodano je 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 0,2 mL prethodno pripravljene otopine HCl koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Tikvica je ostavljena 1 sat na sobnoj temperaturi za odvijanje reakcije. Nakon 1 sat dodano je 0,2 mL NaOH koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  i do oznake nadopunjeno s otopinom smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v).
- Kod druge otopine je u tikvicu od 25 mL odvagano je 25 mg nepafenaka, dodano 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 0,2 mL NaOH koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Tikvica je ostavljena na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon toga, dodano je 0,2 mL HCl koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  i tikvica je nadopunjena smjesom acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) do oznake.

### *Oksidacija*

- Oksidacija nepafenaka ispitana je dodatkom  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %). Otopine je pripravljena na način da je 25 mg nepafenaka odvagano u tikvicu od 25 mL te je dodano 5 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) i 0,2 mL 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ostavljeno je na sobnoj temperaturi 1 sat zbog odvijanja reakcije nakon čega je tikvica nadopunjena smjesom acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) do oznake.

### *Razgradnja pri povišenoj temperaturi*

Razgradnja nepafenaka pri povišenoj temperaturi ispitana je s otopinom nepafenaka i čvrstim standardom.

Čvrsti uzorak ostavljen je 24 h na  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  u sušioniku (Kambic, Semic, Slovenia). Nakon 24 sata u sušioniku, 25 mg nepafanaka odvagano je u tikvicu od 25 mL i nadopunjeno do oznake smjesom acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v).

Razgradnja nepafenaka u otopini pri povišenoj temperaturi ispitana je s otopinom nepafenaka pripremljenom otapanjem 10,0 mg nepafenaka u 5 mL otapala ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Otopina je stavljena 1 h na u termostatiranu vodenu kupelj pri  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po završetku eksperimenta otopina je razrijeđena na 10 mL otopinom vode i acetonitrila (1:1, v/v).

### *Fotolitička razgradnja*

Fotolitička razgradnja nepafenaka ispitana je izlaganjem temeljne standardne otopine nepafenaka ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) UV-A ( $200 \text{ W h m}^{-2}$ ) i vidljivom ( $1,2 \cdot 10^6$  luks sati) zračenju. Za provođenje eksperimenata korišten je uređaj Suntest XLS+ opremljen ksenonskom svjetiljkom kao izvorom umjetnog Sunčeva zračenja. Intenzitet svjetiljke održavan je na  $500 \text{ W m}^{-2}$ , a temperatura na  $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ .

### *Utjecaj vlažnosti na razgradnju nepafenaka*

Utjecaj vlažnosti na razgradnju nepafenaka ispitan je pri sljedećim uvjetima: relativna vlažnost 80 %,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  i vremenski period od 30 dana. Također, ispitana je stabilnost u dužim vremenskim periodima:

- 60 mjeseci pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  i relativnoj vlažnosti 60 %,
- 6 mjeseci pri  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  i relativnoj vlažnosti 60 % te
- 6 tjedana pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Sve pripremljene otopine analizirane su korištenjem razvijenih metoda UHPLC-QQQ i 2D-UHPLC-QTOF. U svim eksperimentima prisilne razgradnje temeljna standardna otopina nepafenaka ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) korištena je za provjeru.

### *3.3.7. Kinetike prisilne razgradnje nepafenaka*

U ovom radu određena je kinetika hidrolitičke i oksidativne razgradnje. U svim eksperimentima temeljna standardna otopina nepafenaka ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) korištena je za provjeru.

#### *Kinetika razgradnje u kiselim uvjetima*

U tikvicu od 25 mL odvagano je 25 mg nepafenaka, dodano 3 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) te je u obrocima od  $100 \text{ } \mu\text{L}$  dodavana prethodno pripremljena otopina HCl koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Uzorak je analiziran odmah nakon pripreme, dodano je ukupno 20 obroka  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl svakih 30 minuta.

#### *Kinetika razgradnje u lužnatim uvjetima*

U tikvicu od 25 mL odvagano je 25 mg nepafenaka, dodano 3 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v) nakon čega je u obrocima od  $100 \text{ } \mu\text{L}$  dodavana prethodno

pripremljena otopina NaOH koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Uzorak je analiziran odmah nakon pripreme. Dodano je ukupno 20 obroka  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH svakih 30 minuta.

#### *Kinetika oksidativne razgradnje*

U tikvicu od 25 mL odvagano je 25 mg nepafenaka, dodano je 3 mL smjese acetonitrila i ultračiste vode (1:1, v/v). Potom je u obrocima od 100  $\mu\text{L}$  dodavana prethodno pripremljena otopina 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uzorak je analiziran svakih 30 minuta. Uzorak je analiziran na svježu pripremu.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Razvoj metode UHPLC-DAD za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja

Trenutno važeći standardi i zakonske regulative zahtijevaju od farmaceutske industrije ne samo da proizvodi djelatne tvari visoke čistoće, nego i detaljno poznavanje onečišćenja prisutnih u djelatnoj tvari i gotovom lijeku. Da bi to bilo moguće potrebne su pouzdane analitičke metode.

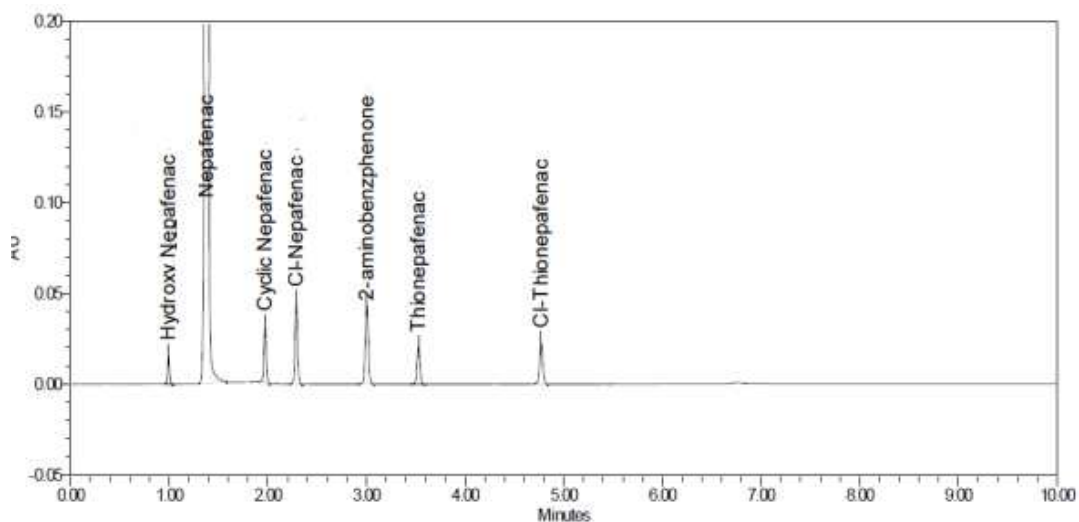
Stoga je glavni cilj disertacije bio razviti brzu metodu visoke osjetljivosti, sposobnu razdvojiti nepafenak, poznata onečišćenja (onečišćenje iz početnog materijala: 2-aminobenzofenon, intermedijarna onečišćenja: Cl-tionepafenak i tionepafenak, procesno onečišćenje: Cl-nepafenak) i razgradne produkte (hidroksi-nepafenak, ciklički-nepafenak i amfenak).

Razvoj metode uključivao je testiranje različitih nepokretnih faza, modifikatora pokretnih faza i različite omjere otapala u pokretnoj fazi. Također, ispitan je učinak temperature, koncentracije kalijeveg hidrogen fosfata, pH-vrijednosti pokretne faze, kao i različitih gradijentnih programa na kromatografsko razlučivanje. Za razvoj kromatografske metode korištene su standardne otopine nepafenaka i poznatih onečišćenja te otopine nakon prisilne razgradnje. Kao kriteriji prihvatljivosti prilikom razvoja metode uzeti su: kromatografsko razlučivanje veće od 2, granica kvantifikacije veća od 0,02 % i asimetričnost kromatografskog pika između 0,8 – 1,2.

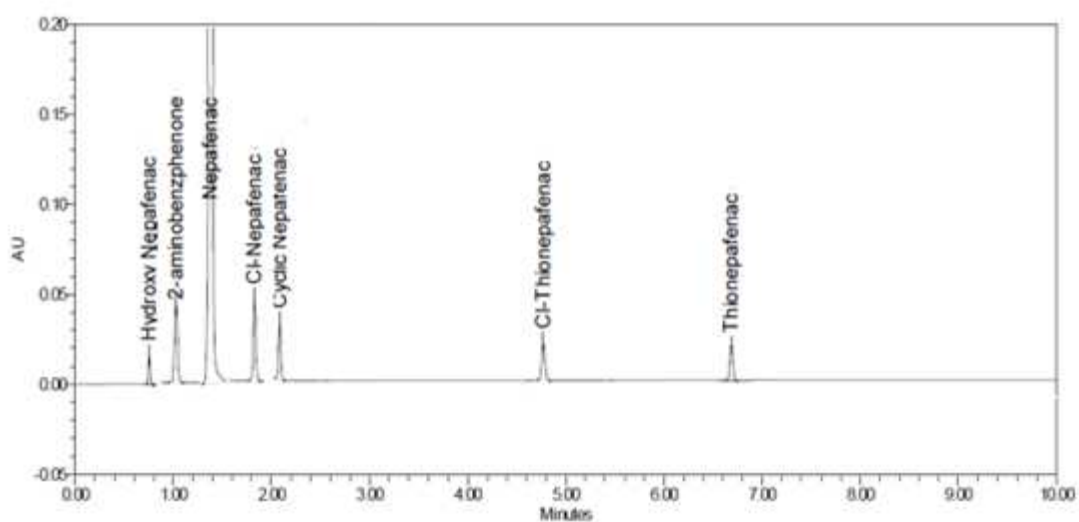
#### *Izbor nepokretne faze*

Testirano je nekoliko kromatografskih kolona s različitim punjenjem: reverzne faze C8 i C18 te fenilna nepokretna faza.

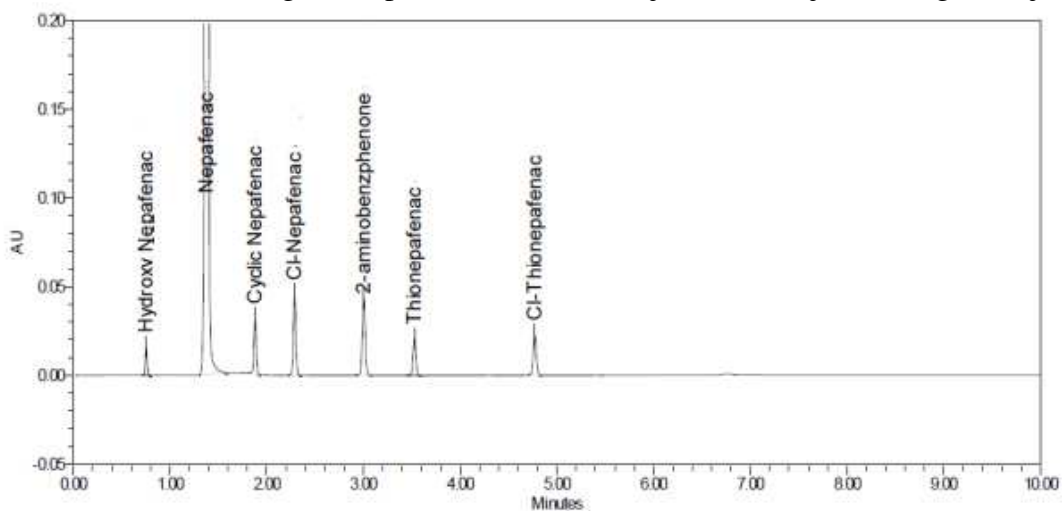
Prilikom testiranja C8 nepokretne faze kao pokretna faza korištena je 10 mM otopina fosfatnog pufera pH-vrijednosti 3, a kromatografsko razlučivanje hidroksi-nepafenaka i razgradnog produkta (DP-1) bilo je manje od 2, kao i razlučivanje između cikličkog nepafenaka i klor-nepafenaka (**Slika 30.**). S fenilnom nepokretnom fazom izgled glavnog kromatografskog pika (nepafenak) bio je neprihvatljiv jer je asimetričnost pika bila veća od 1,3 (**Slika 31.**). Što nije prihvatljivo obzirom na zahtjev za asimetričnost i i granicu razlučivanja. Najbolji rezultati postignuti su s C18 nepokretnom fazom na kojoj je postignuto najbolje kromatografsko razlučivanje i izgled kromatografskog pika (**Slika 32.**).



Slika 30. Kromatogram nepafenaka i onečišćenja na C8 kromatografskoj koloni



Slika 31. Kromatogram nepafenaka i onečišćenja na fenilnoj kromatografskoj koloni



Slika 32. Kromatogram nepafenaka i onečišćenja na C18 kromatografskoj koloni



Na temelju dobivenih rezultata sva daljnja istraživanja provedena su na kromatografskoj koloni Acquity BEH C18 (Waters, Miliford, Massachusetts, SAD) dimenzija  $100 \times 2,1$  mm i veličinom zrna punila  $1,7 \mu\text{m}$ .

#### *Utjecaj temperature*

Nakon odabira nepokretne faze, ispitan je utjecaj temperature na kromatografsko razlučivanje nepafenaka i procesnih i razgradnih onečišćenja. Ispitane su temperature od 20 i 70 °C. Pri višoj temperaturi dolazi do ranijeg eluiranja onečišćenja (procesnih i razgradnih) i nepafenaka, odnosno vremena zadržavanja su kraća. Pri nižoj temperaturi kromatografske kolone uočen je lošiji izgled pika odnosno povećava se asimetrija pika.

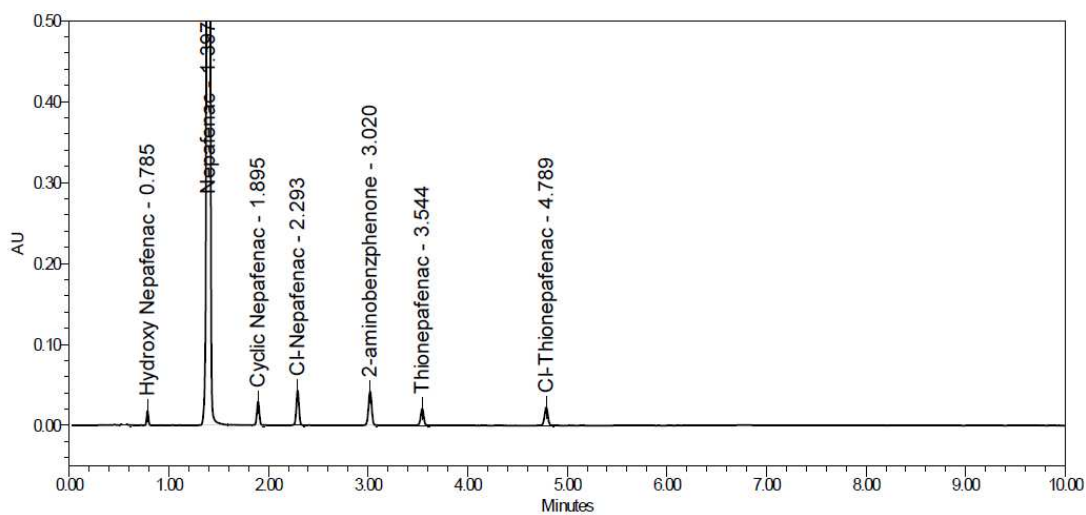
Dodatna ispitivanja utjecaja temperature (50 °C) na kromatografsko razlučivanje napravljena su prilikom razvoja metoda uporabom računalnog programa za razvoj analitičkih metoda DryLab®.

#### *Utjecaj koncentracije pufera*

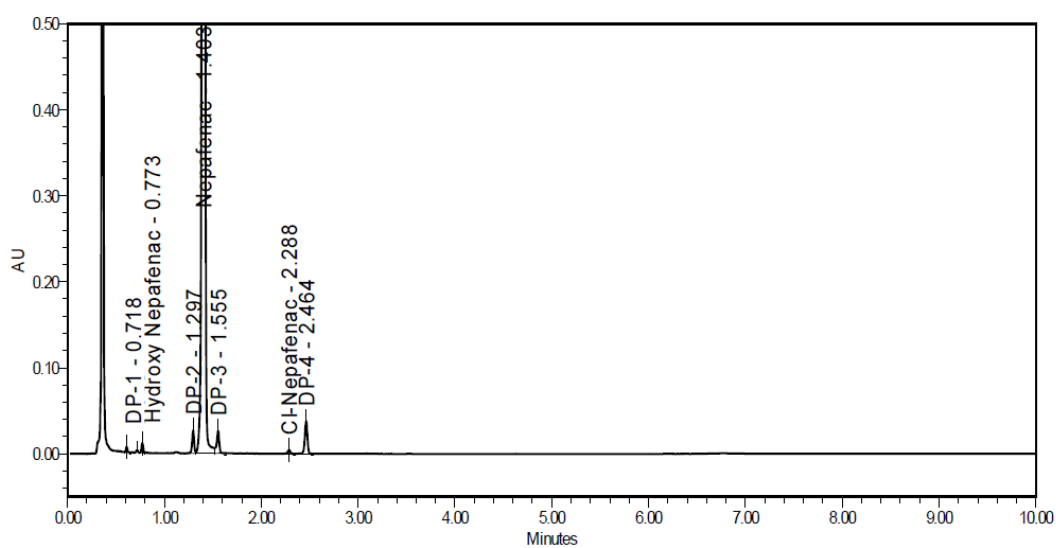
Ispitan je utjecaj koncentracije kalijevog dihidrogen fosfata na kromatografsko razlučivanje razgradnih i procesnih onečišćenja nepafenaka. Ispitane su koncentracije 10, 20 i 30 mM te nije uočen utjecaj koncentracije fosfatnog pufera pH vrijednosti 3 na kromatografsko razlučivanje.

#### *Utjecaj pH-vrijednosti pokretne faze*

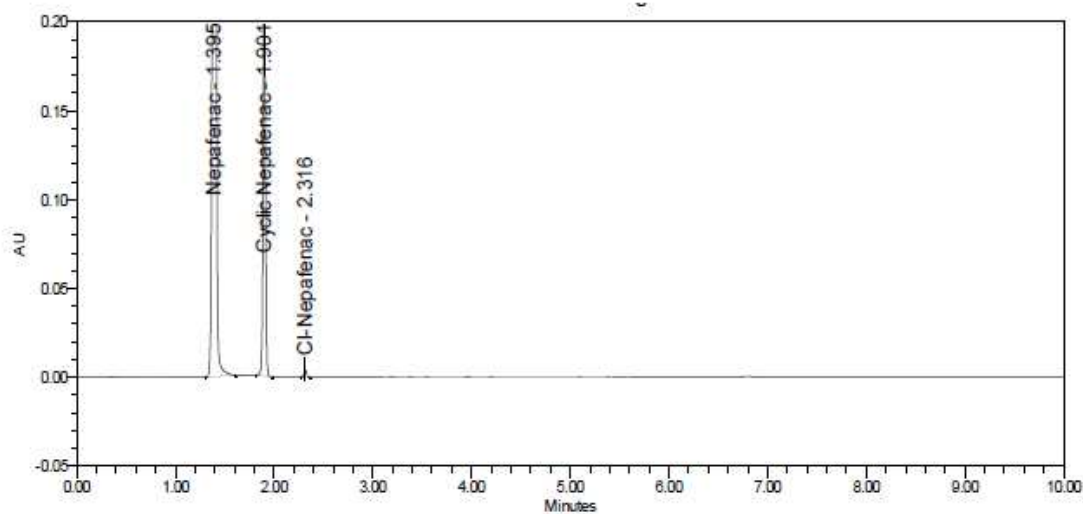
Utjecaj pH-vrijednosti pokretne faze na kromatografsko razlučivanje ispitan je na otopinama nepafenaka nakon razgradnje s vodikovim peroksidom, lužinom, kiselinom te otopinom nepafenaka u koju su dodana poznata procesna onečišćenja. Ispitane su elucije pri pH-vrijednosti pokretne faze 3, 6 i 9 te se na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako pH ne utječe na razdvajanje procesnih onečišćenja, asimetričnost pika i broj teoretskih odsječaka. No, pri pH 6 uočeno je slabije razdvajanje razgradnog produkta DP-1 od nepafenaka (**Slika P3**). Pri pH 6 i pH 9 uočeno je nepostojanje razdvajanja pika razgradnog produkta DP-1 i hidroksi-nepafenaka (**slike P3. i P4**). Kromatogrami dobiveni pri pH 3 prikazani su na **Slikama 33.-36.**, a ostali kromatogrami nalaze se u prilogu (**slike P1. – P8**).



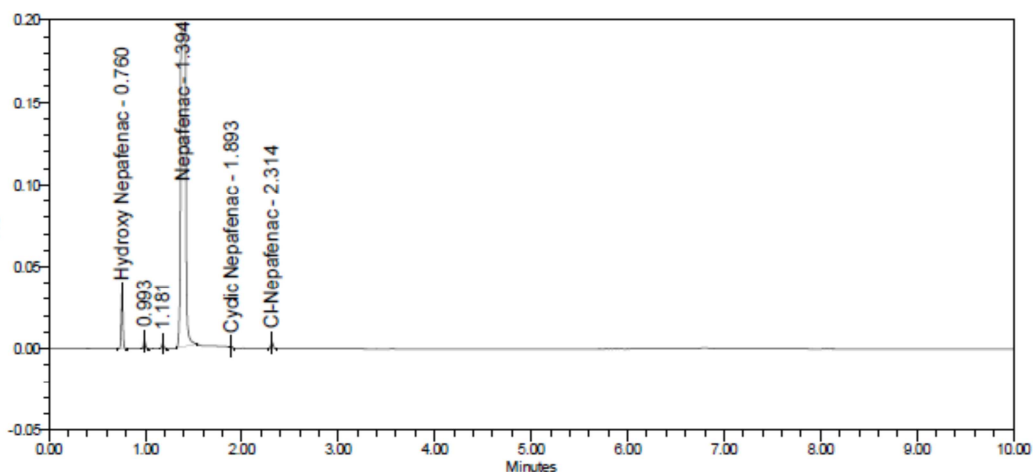
Slika 33. Kromatogram nepafenaka i onečišćenja pri pH vrijednosti pokretne faze 3



Slika 34. Kromatogram otopine nepafenaka nakon razgradnje vodikovim peroksidom, pri pH vrijednosti pokretne faze 3



Slika 35. Kromatogram otopine nepafenaka nakon razgradnje klorovodičnom kiselinom, pri pH vrijednosti pokretne faze 3



**Slika 36.** Kromatogram otopine nepafenaka nakon razgradnje natrijevom lužinom, pri pH vrijednosti pokretne faze 3

Na temelju dobivenih rezultata, odabrani su optimalni eksperimentalni uvjeti za kromatografsko određivanje nepafenaka i onečišćenja primjenom UHPLC-a povezanog s DAD detektorom koji su prikazani u **Tablici 8**.

**Tablica 8.** Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje onečišćenja u nepafenaku

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18, 100 × 2,1 mm, 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer, pH 3,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	6,50	40	60
	8,00	40	60
	8,01	70	30
	10,0	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	2 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

#### 4.1.1. Prikladnost sustava

Prikladnost sustava (eng. *system suitability*) potvrđuje se skupom parametara koji dokazuju da je kromatografski sustav valjan za određenu namjenu. Značajke ispitivanja i kriteriji prihvatljivosti temelje se na načelu da oprema, elektronika, analitičke operacije i uzorci čine cjelovit sustav. Test prikladnosti sustava koristi se kako bi se potvrdilo kromatografsko razlučivanje i učinkovitost kromatografske kolone. U tu svrhu određuju se parametri: razlučivanje ( $R_S$ ), faktor asimetričnosti kromatografskog pika (eng. *tailing*,  $T$ ), faktor zadržavanja ( $k'$ ), relativno vrijeme zadržavanja (eng. *relative retention time*,  $RRT$ ) i broj teoretskih odsječaka ( $N$ ). Za procjenu prikladnosti sustava korištena je otopina uzorka nepafenaka koncentracije  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  nacijepljena sa standardima poznatih onečišćenja koncentracije  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 9**.

**Tablica 9.** Parametri prikladnosti sustava za metodu UHPLC-DAD

Komponenta	$N$	$T$	$t_R$ (min)	$RRT$	$k'$	$R_S$
Hidroksi-nepafenak	9707	1,058	0,779	0,56	6,5	-
Nepafenak	16233	0,993	1,396	1,00	12,8	15,4
Ciklički-nepafenak	30017	0,990	1,902	1,36	17,8	11
Cl-nepafenak	391378	0,990	2,316	1,66	21,9	9,2
2-aminobenzofenon	67643	0,984	3,033	2,55	29,0	13,9
Tionepafenak	44612	0,981	3,563	2,17	34,3	9,5
Cl-tionepafenak	100517	0,989	4,814	3,45	46,7	21,8

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da su procesna onečišćenja dobro odvojena s minimalnim razlučivanjem ( $R_S$ ) od 9,2 u odnosu na prethodno eluirani kromatografskog pik, faktor simetrije pikavarira između 0,981 i 1,058, broj teoretskih odsječaka je veći od 9700, a faktor zadržavanja je veći od 6,5.

#### 4.2. Razvoj metode uporabom kvalitete ugrađene u dizajni (QbD)

Rezultati dobiveni UHPLC analizom korišteni su za postavljanje DryLab analize. Definirani su kritični parametri metode – pH pokretne faze, temperatura kolona i duljina trajanja gradijenta. U program su unešeni parametri instrumenta na kojem su napravljena mjerenja – poput mrtvog volumena, volumena kolone i volumena injektiranja. Dodatno su unešene dimenzije i karakteristike kolona na kojima su provedena mjerenja – poput duljine kolone, promjer kolone i veličina čestica. Nakon toga, retencijska vremena s kromatograma pri promjeni pH pokretne faze, temperatura kolona i duljina trajanja gradijenta.

Napravljeni su eksperimenti i dobiveni podaci upisani su u program. Dobiven je odgovarajući model u obliku kocke koja pokazuje ovisnost trajanja gradijenta, temperature kolone i pH vrijednosti pokretne faze o razlučivanju. Matematički model pokazao je optimalne teorijske uvjete za najbolje razdvajanje s obzirom na trajanje gradijenta ( $t_G$ ) i temperaturu kolone. Eksperimentalni uvjeti navedeni su u **Tablicama 10-12.**, a detaljni opisi uvjeta pri kojima su provedeni eksperimenti nalaze se u **Tablicama P1-P12.**

**Tablica 10.** Eksperimentalni uvjeti (temperatura i gradijent) pri pH 3

	<b>Eksperiment 1</b>	<b>Eksperiment 2</b>	<b>Eksperiment 3</b>	<b>Eksperiment 4</b>
$t_G$ (min)	3	9	3	9
$T$ (°C)	50	70	50	70

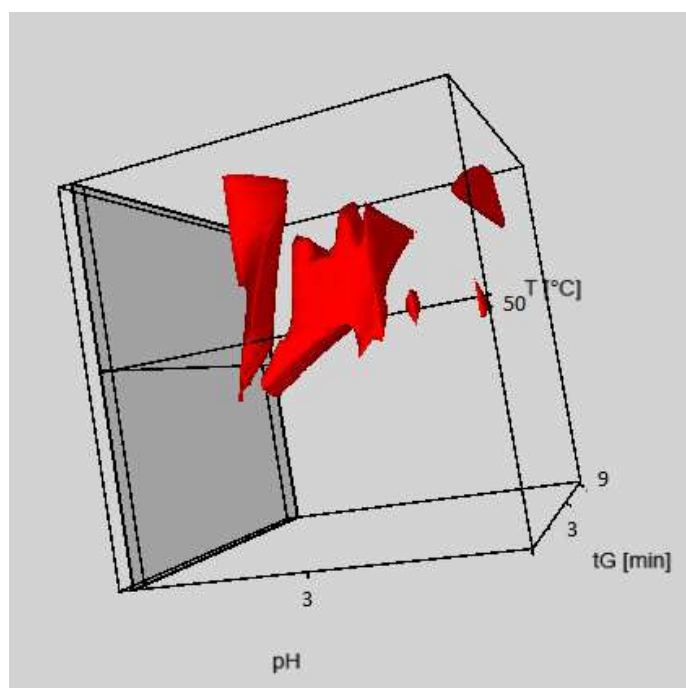
**Tablica 11.** Eksperimentalni uvjeti (temperatura i gradijent) pri pH 6

	<b>Eksperiment 5</b>	<b>Eksperiment 6</b>	<b>Eksperiment 7</b>	<b>Eksperiment 8</b>
$t_G$ (min)	3	9	3	9
$T$ (°C)	50	70	50	70

**Tablica 12.** Eksperimentalni uvjeti (temperatura i gradijent) pri pH 9

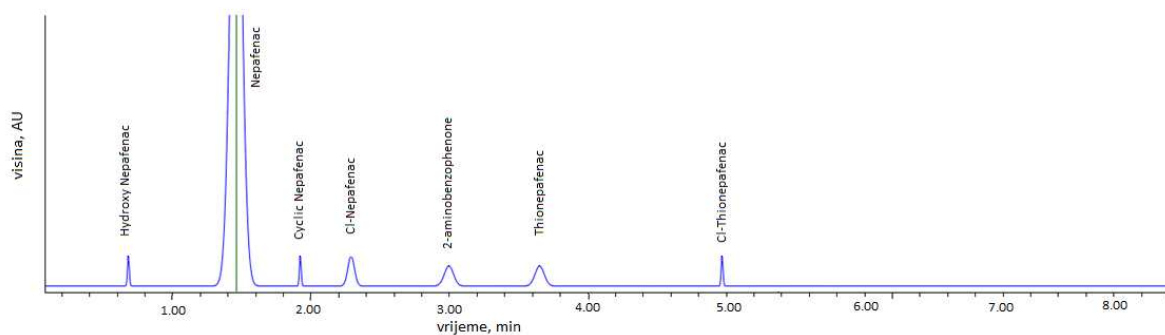
	<b>Eksperiment 9</b>	<b>Eksperiment 10</b>	<b>Eksperiment 11</b>	<b>Eksperiment 12</b>
$t_G$ (min)	3	9	3	9
$T$ (°C)	50	70	50	70

Dobiveni trodimenzionalni model (**Slika 37.**) prikazuje zonu robusnosti metode, što omogućuje definiranje teoretskog područja robusnosti metode (eng. *design space*), odnosno višedimenzionalno područja unutar kojega varijacije kritičnih procesnih parametara ne uzrokuju značajne promjene kritičnih značajki kvalitete. Nakon što je određen matematički model koji prikazuje ovisnost separacije onečišćenja od nepafenaka, dobivena je kocka (**Slika 37.**) koja vizualno prikazuje koja područja, odnosno eksperimentalni uvjeti, su najprikladniji za separaciju. Crvena boja prikazuje područja na kojima se ostvaruje najbolja separacija dok siva boje prikazuju područja gdje separacija nije prihvatljiva. Pri pH pokretne faze 3, dobivena je odgovarajuća ploha na kojoj crvena boja označava maksimalno razlučivanje, što ukazuje da je pri temperaturi kolone od 50 °C i vremenu gradijenta od 6,5 minuta postignuto maksimalno razdvajanje. Cilj ovakvog razvoja metode je odabrati točku u kojoj je ostvarena najbolja moguća separacija.

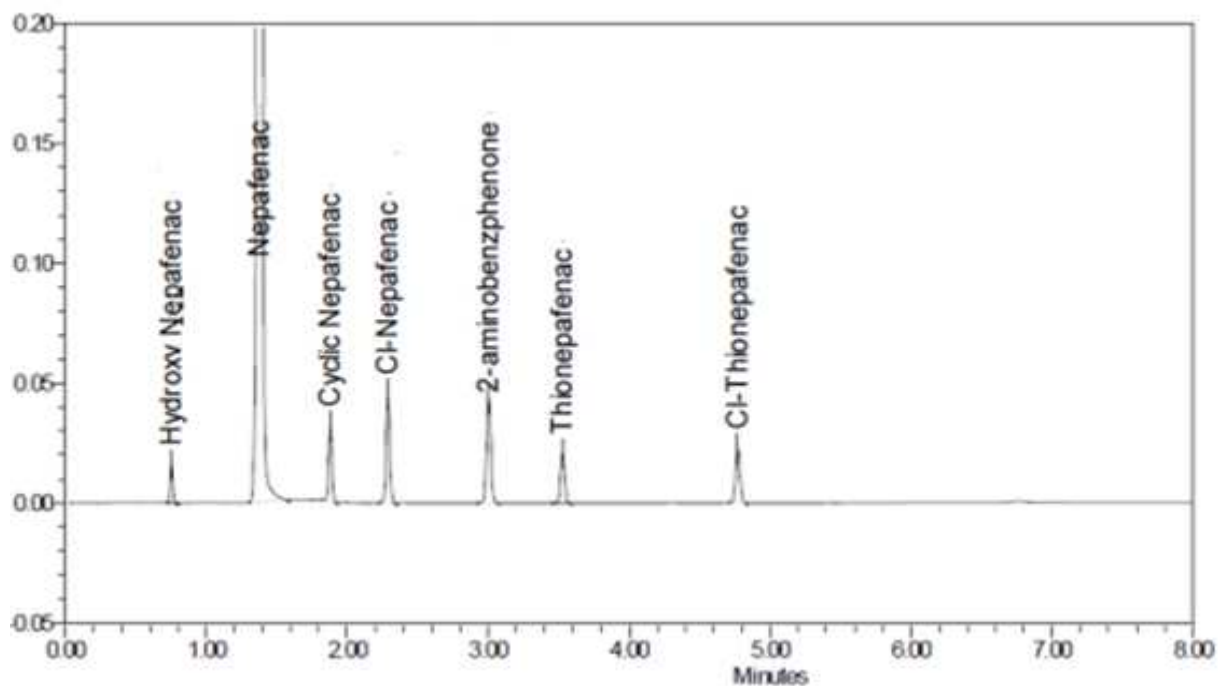


**Slika 37.** Grafički prikaz 3D modela dobivenog računalnim programom DryLab®

Kromatogram određen uz pomoć programa DryLab® i eksperimentalno dobiven kromatogram pri optimalnim uvjetima nalaze se na **Slikama 38. i 39.** Njihovom usporedbom može se uočiti izvrsno slaganje modeliranog kromatograma s eksperimentalno dobivenim kromatogramom. Najslabije slaganje predviđenog i eksperimentalno određenog vremena zadržavanja uočeno je za tionepafenak (razlika 7,4 %, **Tablica 13.**).



**Slika 38.** Kromatogram dobiven DryLab metodom pri  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t_G=6,5\text{ min}$



**Slika 39.** Kromatogram nepafenaka s onečišćenjima pri  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t_G=6,5\text{ min}$

Nakon odabira metode koja ima najveću moguću zonu robusnosti, metoda se testira na način da program napravi simulaciju promjene svih kritičnih i manje kritičnih parametara metode. U ovom radu, testirana je duljina trajanja gradijenta, temperatura kolone, pH pokretne faze te početni i završni sastav gradijenta (**Slika 40.**).

Method Conditions

T 50 +/- 1 [°C]

pH 3 +/- 0.1

Flow Rate 0.6 +/- 0.1 [mL/min]

No. of Levels (2 or 3) 3 No. of Factors 5

Start - %B	30	+/-	1.0	%B
tG	6.5	+/-	0.2	[min]
End - %B	60	+/-	1.0	%B

Dwell Volume 0.2 +/- 0.1 [mL]  Use Vd

Start Calculations

Stop Calculations

**Slika 40.** Parametri robusnosti postavljeni u programu DryLab®

U odnosu na klasično ispitivanje robusnosti, koje obično uključuje 8-12 kritičnih eksperimenata, program je simulirao 729 eksperimenata i sortirao najkritičnije paramtere.

U svrhu testiranja samog modela, 8 najkritičnijih parametara opisanih u **Tablici 13.** testirano je eksperimentalno, a dobiveni rezultati, iskazani kao razlučivanje, uspoređeni su s rezultatima modeliranja. Iz rezultata prikazanih u **Tablici 13.** vidljivo je potpuno slaganje eksperimentalnim i modelom proračunatih vrijednosti razlučivanja što ukazuje da razvijena metoda pokazuje maksimalno moguće iskorištenje i da je prikladna za određivanje onečišćenja u nepafenaku.

**Tablica 13.** Usporedba testiranih parametara robusnosti s modelom

Uvjeti	Razlučivanje eksperiment	Razlučivanje model
pH=2.9, $t_G=6.3$ min, $T_k=51$ °C, % B: 31-59, $F=0.7$ mL/min	3,4	3,3
pH=3.1, $t_G=6.7$ min, $T_k=49$ °C, % B:29-59, $F=0.5$ mL/min	3,5	3,3
pH=3.1, $t_G=6.5$ min, $T_k=51$ °C, % B: 30-61, $F=0.6$ mL/min	3,6	3,4
pH=3.0, $t_G=6.3$ min, $T_k=50$ °C, % B: 29-61, $F=0.7$ mL/min	3,8	3,7
pH=3.0, $t_G=6.3$ min, $T_k=49$ °C, % B: 30-61, $F=0.7$ mL/min	3,2	3,8
pH=3.1, $t_G=6.3$ min, $T_k=51$ °C, % B: 31-60, $F=0.6$ mL/min	2,9	2,8
pH=3.0, $t_G=6.3$ min, $T_k=50$ °C, % B: 31-60, $F=0.7$ mL/min	2,8	2,7
pH=2.9, $t_G=6.7$ min, $T_k=51$ °C, % B: 29-59 $F=0.7$ mL/min	2,7	2,5
pH=3.1, $t_G=6.3$ min, $T_k=50$ °C, % B: 31-59, $F=0.7$ mL/min	2,6	2,7



#### 4.3. Validacija metode UHPLC-DAD za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja

Razvijene metode UHPLC-DAD i UPC<sup>2</sup>-PDA za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja validirane su u skladu s ICH smjernicama [137]. Određene su sljedeće izvedbene značajke: specifičnost, prikladnost sustava, točnost, preciznost, iskorištenje, granice kvantifikacije i kvalifikacije, robusnost i stabilnost otopine.

##### 4.3.1. *Specifičnost*

Specifičnost je sposobnost metode da razlikuje analit od ostalih komponenti uzorka ili matriksa uzorka bez interferencija ostalih komponenti sličnog ponašanja [138], i indikativno je svojstvo za više tvari. Za razvijenu UHPLC-DAD metodu, specifičnost je dokazana detekcijom 6 separiranih kromatografskih pikova onečišćenja nepafenaka (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, Cl-nepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak). Studija prisilne razgradnje također govori u prilog selektivnosti (**Slika 32.**), prilikom koje je utvrđeno da je ovom metodom postignuta zadovoljavajuća separacija između nepafenaka i razgradnih produkata.

Također, provjerena je spektralna čistoća pika prilikom studije prisilne razgradnje koristeći PDA detektor (Waters). Očitane su vrijednosti čistoće kuta (eng. *purity angle*) i poklapanja kuta (eng. *match angle*) i uspoređene su s odgovarajućim kriterijima (eng. *purity treshold*, *match treshold*). Vrijednost *purity angle* i *purity treshold* uzoraka prisilne razgradnje direktno govore o homogenosti samog pika, dok *match angle* i *match treshold* služe za potvrdu identifikacije (**Tablica 13.**). Ukoliko je vrijednost *purity angle* manja od vrijednosti *purity tresholda*, pik se smatra spektralno čist [139]. Ukoliko je vrijednost *match angle* veća od vrijednosti *match tresholda*, identifikacija je potvrđena. Rezultati spektralne čistoće pikova nepafenaka i detektiranih poznatih onečišćenja u uzorcima nakon prisilne razgradnje (hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka) prikazni su u **Tablicama 14-16.**

**Tablica 14.** Spektralna čistoća pika nepafenaka u uzrocima nakon prisilne razgradnje

<b>Uvjeti razgradnje</b>	<b><i>Purity Angle</i></b>	<b><i>Match Angle</i></b>	<b><i>Purity Treshold</i></b>	<b><i>Match Treshold</i></b>
Nepafenak (bez razgradnje)	0,113	0,233	0,049	0,174
Kisela razgradnja	0,121	0,239	0,056	0,183
Lužnata razgradnja	0,119	0,228	0,055	0,176
Oksidativna razgradnja	0,118	0,228	0,055	0,173
Termalna razgradnja - API	0,112	0,231	0,052	0,174
Termalna razgradnja- otopina	0,115	0,236	0,054	0,169
Povišena vlažnost	0,119	0,232	0,048	0,177
25 °C/60 % RH/60 mjeseci	0,115	0,236	0,050	0,172
40 °C/60 % RH/6 mjeseci	0,118	0,231	0,049	0,175

**Tablica 15.** Spektralna čistoća pika hidroksi-nepafenaka u uzrocima nakon prisilne razgradnje

<b>Uvjeti razgradnje</b>	<b><i>Purity Angle</i></b>	<b><i>Match Angle</i></b>	<b><i>Purity Treshold</i></b>	<b><i>Match Treshold</i></b>
Nepafenak (bez razgradnje)	0,055	0,112	0,027	0,082
Lužnata razgradnja	0,056	0,112	0,029	0,084
Oksidativna razgradnja	0,061	0,228	0,026	0,087
Termalna razgradnja - otopina	0,050	0,232	0,028	0,086

**Tablica 16.** Spektralna čistoća pika cikličkog nepafenaka u uzrocima nakon prisilne razgradnje

<b>Uvjeti razgradnje</b>	<b><i>Purity Angle</i></b>	<b><i>Match Angle</i></b>	<b><i>Purity Treshold</i></b>	<b><i>Match Treshold</i></b>
Nepafenak (bez razgradnje)	0,080	0,156	0,040	0,112
Kisela razgradnja	0,075	0,152	0,038	0,113
Termalna razgradnja - otopina	0,078	0,163	0,041	0,110

#### 4.3.2. Linearnost

Linearnost je svojstvo analitičkog postupka da se dobivaju rezultati koji su izravno proporcionalni sadržaju (koncentraciji) analita unutar radnog područja. Linearnost je potvrđena faktorom determinacije ( $R^2$ ) koji je  $\geq 0,999$  za sve analite (**Tablica 17.**). Ovisnost signala o koncentraciji prikazana je grafički te su određene jednadžbe pravca (nagib i odsječak) i koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) za nepafenak i onečišćenja. RSD (%) nagiba pravca i odsječka na *ordinati* manji su od 5,0 % za sve komponente.

**Tablica 17.** Parametri umjernih krivulja nepafenaka i poznatih onečišćenja za metodu UHPLC-DAD

Analit	<i>n</i>	Odsječak ( <i>a</i> )	Nagib pravca ( <i>b</i> )	$R^2$	<i>RSS</i>	<i>RRF</i>
Nepafenak	5	574,3	17,1	1,000	0,001	-
2-aminobenzofenon	5	594,5	15,1	0,999	0,026	1,04
Cl-tionepafenak	5	534,8	16,1	0,999	0,031	0,93
Tionepafenak	5	550,7	10,3	0,999	0,023	0,96
Cl-nepafenak	5	518,2	23,1	0,999	0,041	0,90
Hidroksi-nepafenak	5	552,5	22,1	0,999	0,041	0,96
Ciklički nepafenak	5	522,7	19,5	0,999	0,015	0,91

*n* – broj priprema

*RSS* – suma kvadrata odstupanja (eng. *residual sum of squares*)

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

#### 4.3.3. Granice kvantifikacije i kvalifikacije

Granica kvalifikacije (eng. *limit of detection*, LOD) je najmanja količina analita koja se može dokazati (ali ne i kvantitativno odrediti) u utvrđenim uvjetima analitičkog postupka, dok je granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ) najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prihvatljivom točnošću i pouzdanošću. Postavljeni kriterij odnosa signala i šuma za granicu kvantifikacije je 10, a za granicu kvalifikacije 3. Granice kvalifikacije za nepafenak i poznata onečišćenja su jednake i iznose  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Također, granice kvantifikacije za nepafenak i poznata onečišćenja su jednake i iznose  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.3.4. Točnost i iskorištenje

Točnost je blizina rezultata ispitivanja očekivanoj, unaprijed utvrđenoj vrijednosti. Točnost se definira i kao iskorištenje metode. Potvrđena je točnost kvantifikacije nepafenaka i svih 6 poznatih onečišćenja nepafenaka (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak). Dobivena su iskorištenja u rasponu od 96,09 % do 103,40 % za koncentracije u područjima od 0,01 % do 0,25 %. Rezultati su prikazani u **Tablici 18.**

**Tablica 18.** Rezultati ispitivanja točnosti i iskorištenja za metodu UHPLC-DAD

<i>Analit</i>	<i>Koncentracija</i>	<i>Iskorištenje (%) ± RSD (%)</i>
2-aminobenzofenon	0,01 % (LOQ)	99,66±1,12
	0,10 %	103,40±1,01
	0,25 %	99,30±0,19
Cl-tionepafenak	0,01 % (LOQ)	100,99±1,86
	0,10 %	96,09±1,91
	0,25 %	101,75±0,44
Tionepafenak	0,01 % (LOQ)	102,20±1,16
	0,10 %	98,32±1,12
	0,25 %	98,42±0,21
Cl-nepafenak	0,01 % (LOQ)	97,50±0,91
	0,10 %	102,22±1,08
	0,25 %	97,28±0,09
Hidroksi-nepafenak	0,01 % (LOQ)	96,66±1,21
	0,10 %	100,25±0,80
	0,25 %	100,87±0,52
Ciklički nepafenak	0,01 % (LOQ)	98,15±1,12
	0,10 %	102,20±0,18
	0,25 %	100,17±0,57

#### 4.3.5. Preciznost

Preciznost je raspršenost pojedinih mjerenja oko srednje vrijednosti dobivenih ponavljanim ispitivanjima. Preciznosti iskazujemo kao ponovljivost, srednju preciznost i obnovljivost. Izračunate RSD vrijedosti (%) za ponovljena mjerenja površine pikova 2-aminobenzofenona, Cl-tionepafenaka, tionepafenaka, Cl-nepafenaka, hidroksi-nepafenaka i cikličkog nepafenaka su manje od 5,0 %, dok je za pik nepafenaka RSD manji od 2,0 %.

Rezultati za srednju preciznost, iskazani kao RSD (%), su unutar 5,0 % za sve pikove poznatih onečišćenja i nepafenak (**Tablica 19.**).

Preciznost je dodatno provjerena injektiranjem 6 nezavisno pripremljenih otopina pri koncentraciji granice kvantifikacije za sve pikove poznatih onečišćenja (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, Cl-nepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak). Vrijednosti RSD za ponovljena mjerenja površina pikova su manje od 10,0 % za sve komponente.

**Tablica 19.** Rezultati ispitivanja preciznosti za metodu UHPLC-DAD

<b>Komponenta</b>	<b><i>Preciznost</i></b> <b>(RSD, %)</b>	<b><i>Srednja preciznost</i></b> <b>(RSD, %)</b>
Nepafenak	2,2	1,0
2-aminobenzophenone	1,7	2,0
Cl-tionepafenak	1,5	1,6
Tionepafenak	3,2	2,4
Cl-nepafenak	3,5	2,8
Hidroksi-nepafenak	2,1	1,9
Ciklički nepafenak	2,7	1,8

#### 4.3.6. Robusnost

Robusnost metode je sposobnosti metode da ostane prikladna za namijenjenu upotrebu nakon uvođenja sitnih, namjernih varijacija. Unesene varijacije opisane u poglavlju 4.2. nisu značajno utjecale na razlučivanje između pikova. Razlučivanje između susjednih pikova veće je od 4,0 za sve ispitane varijacije čime je potvrđena robusnost metode.

#### 4.3.7. Stabilnost

Stabilnost je prosudba dopuštenog vremena između skupljanja uzorka i analize

Tijekom stajanja u otopini uzorka nepafenaka došlo je do razgradnje i formiranja cikličkog nepafenaka. Razrijeđene otopine uzorka također se razgrađuju te, uz ciklički nepafenak, nastaje i razgradni produkt DP-1. Zbog navedenog, otopine nepafenaka potrebno je pripremiti i injektirati svježe prije same analize.

#### 4.4. Prisilna razgradnja nepafenaka

Prisilna razgradnja provodi se kako bi se utvrdila stabilnost lijeka te identificirali glavni produkti razgradnje. Nepafenak je podvrgnut svim testovima prisilne razgradnje opisanim u ICH vodiču: hidrolitička razgradnja u kiselim uvjetima s  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl, hidrolitička razgradnja u lužnatim uvjetima s  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH, oksidativna razgradnja s 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , fotolitička razgradnja, te je ispitan utjecaj vlažnosti i temperature na stabilnost nepafenaka.

Cl-nepafenak detektiran je u svim uzorcima nakon prisilne razgradnje s obzirom da je to procesno onečišćenje prisutno u početnoj otopini nepafenaka s udjelom od 15 %.

Značajnija ragradnja nepafenaka uočena je tijekom eksperimenta hidrolitičke razgradnje u kiselim uvjetima te je uočen nastanak cikličkog nepafenaka, dok je tijekom hidrolitičke razgradnje u lužnatim uvjetima nastao hidroksi-nepafenak.

Oksidativna razgradnja rezultirala je nastankom tri glavna razgradna produkta: DP-2 (RRT=0,92), DP-3 (RRT=1,11) i DP-4 (RRT=1,21). Također, detektirani su i hidroksi-nepafenak i DP-1 (RRT=0,65) (**Slika 32.**).

Provedena ispitivanja pokazala su da nepafenak nije podložan fotolitičkoj razgradnji. Također, povećana vlažnost ne uzrokuje razgradnju nepafenaka ni u dugotrajnim testovima.

Rezultati prisilne razgradnje nepafenaka prikazani su **Tablici 20.** kao i bilanca mase (% sadržaja API-ja + % onečišćenja + % razgradnih produkata). Udio onečišćenja u svim uzorcima prisilne razgradnje izračunat je korištenjem metode vanjske kalibracije.

**Tablica 20.** Rezultati studije prisilne razgradnje

Uvjet razgradnje	Razgradni produkti ( $t_R$ )	Udio onečišćenja (%) u odnosu na nepafenak	Sadržaj (%)
Nepafenak	-	0,15	99,8
Kisela razgradnja	Ciklički nepafenak (2,32 min)	4,51	95,2
Lužnata razgradnja	Hidroksi-nepafenak (0,77 min)	1,14	98,6
Oksidativna razgradnja	Hidroksi-nepafenak (0,77 min)	0,34	96,0
	DP-1 (0,687 min)	0,05	
	DP-2 (1,140 min)	0,60	
	DP-3 (1,289 min)	2,50	
	DP-4 (1,541 min)	0,38	
Termička razgradnja - API			
Nepafenak krutina	-		99,5
Nepafenak u otopini	Hidroksi-nepafenak (2,32 min)	0,15	99,6
	Ciklički nepafenak (0,77 min)	0,07	
	DP-1 (0,69 min)	0,15	
Fotolitička razgradnja	-		99,5
Povišena vlažnost	-		99,7
<b>Dugoročna stabilnost:</b>			
25°C /60 % RH / 60 mjeseci	-		99,5
40°/75 % RH/6 mjeseci	-		99,8
50 °C / 6 tjedana	-		99,9

#### 4.5. Kinetika razgradnje nepafenaka

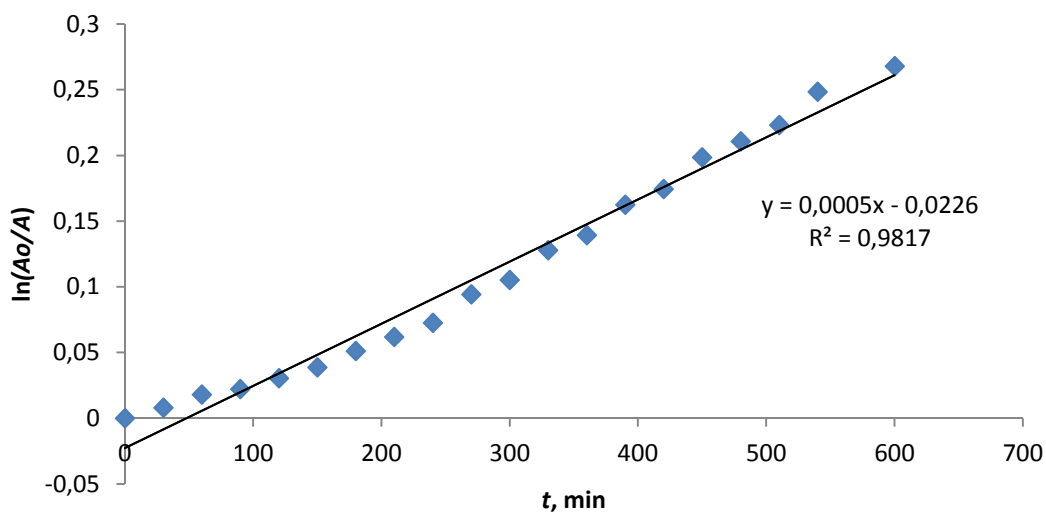
Određena je kinetika razgradnje nepafenaka u kiselim i baznim uvjetima te kinetika oksidativne razgradnje. Dobiveni rezultati prikazani su grafički kao ovisnost  $\ln(A_0/A)$  o vremenu što je prikazano na **Slikama 41.-43.**

Rezultati su pokazali da razgradnja nepafenaka prati kinetiku reakcije prvog reda opisanu formulom (16), koja pretpostavlja smanjenje koncentracije ispitivanog spoja s vremenom:

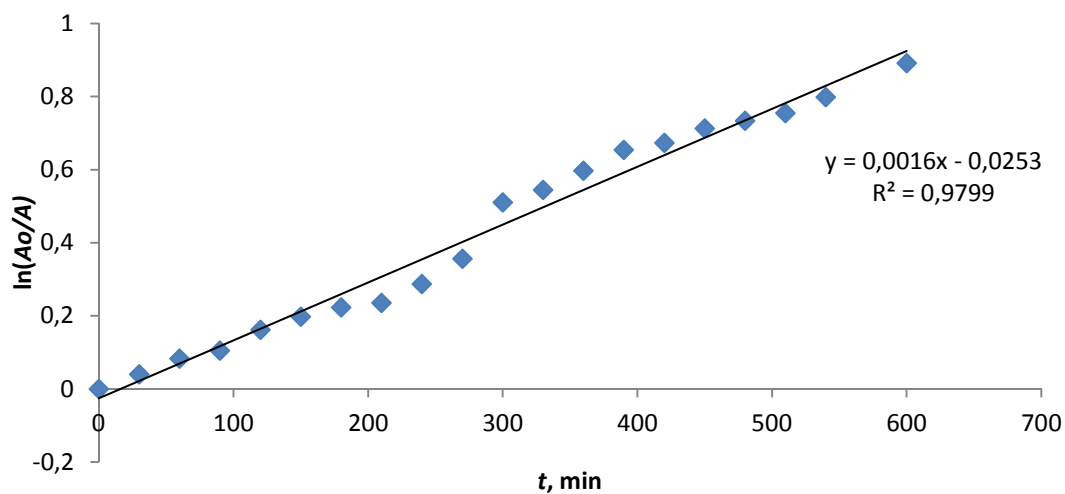
$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (16)$$

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

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (17)$$

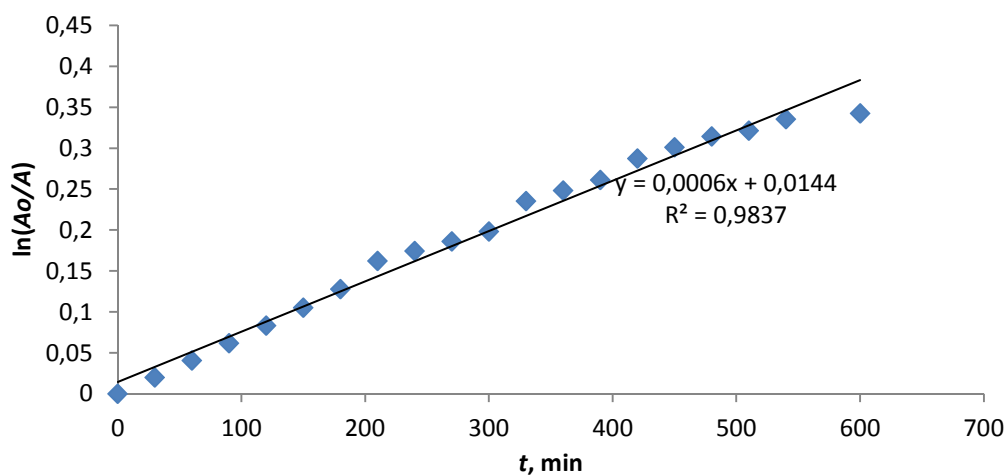


**Slika 41.** Kinetika razgradnje nepafenaka oksidacijom



**Slika 42.** Kinetika razgradnje nepafenaka u kiselim uvjetima





**Slika 43.** Kinetika razgradnje nepafenaka u lužnatim uvjetima

**Tablica 21.** Konstante brzine razgradnje i vremena poluraspada nepafenaka

Uvjeti razgradnje	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
Oksidativna razgradnja	0,0005	1386,3
Kisela razgradnja	0,0016	433,2
Lužnata razgradnja	0,0006	1155,2

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je razgradnje najbrža u kiselim uvjetima što za posljedicu ima kraće vrijeme poluraspada nepafenaka. Brzina razgradnje u lužnatim uvjetima i uvjetima oksidacije je slična.

#### 4.6. Identifikacija razgradnih produkata primjenom metode UHPLC-QQQ

Kako se vidi u **Tablici 20.**, uz poznata procesna onečišćenja (ciklički nepafenak i hidroksi-nepafenak) kao produkti razgradnje detektirana su i četiri nova spoja. Identifikacija nepoznatih razgradnih produkata formiranih tijekom hidrolitičke razgradnje (lužnate i kisele), oksidacijske razgradnje i termičke razgradnje napravljena je uporabom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spregnutom spektrometrijom masa (trostruki kvadripol, QQQ). Metoda je prethodno podešena te je umjesto kalijevog dihidrogen fosfata uporabljen amonijev formijat uz pH pokretne faze 3,0. Produkti razgradnje identificirani su MS/MS analizama uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom modu.

Detektirani su sljedeći razgradni produkti:

DP-1,  $m/z$  256  $[M+H]^+$ ,

DP-2,  $m/z$  285  $[M+H]^+$ ,

DP-3  $m/z$  253  $[M+H]^+$  i

DP-4  $m/z$  521  $[M+H]^+$ .

U **Tablici 21.** navedena su vremena zadržavanja, uvjeti MS/MS analize koji su dali optimalan odziv  $[M+H]^+$  iona i fragmentnih iona nepafenaka i razgradnih produkata nepafenaka te glavni fragmenti nepoznatih razgradnih produkata. MS i MS/MS spektri razgradnih produkata nalaze se u prilogu na **Slikama P9.–P12.**, a putevi fragmentacije razgradnih produkata prikazani su na **Slikama P13.–P16.**

**Tablica 21.** Vremena zadržavanja nepoznatih produkata razgradnje i optimalni uvjeti na MS/MS-u.

	Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ , min)	$[M+H]^+$	Napon fragmentora (V)	Energija sraza (eV)	Fragmentni ioni ( $m/z$ )
<b>DP-1</b>	0,65	256	380	30	211, 105, 196
<b>DP-2</b>	1,46	285	380	0	268, 240, 224
<b>DP-3</b>	1,72	253	380	0	236, 208, 180
<b>DP-4</b>	2,78	521	380	40	443, 415, 365

Na temelju rezultata MS/MS analize predložene su strukturne formule detektiranih nepoznatih produkata razgradnje koje su prikazane u **Tablici 22.**

Razgradni produkt DP-1 identificiran je kao amfenak, poznati metabolit nepafenaka [6]. DP-2 je primarni produkt razgradnje formiran tijekom oksidacijske razgradnje zbog povećane količine peroksida u uzorku. Tercijarni amini reagiraju i dolazi do čiste N-oksidacije uslijed reakcije s peroksidom transferom kisika [140]. S druge strane, primarni i sekundarni amini podliježu N-oksidacijama, ali ne nastaju primarni produkti uslijed paralelnih reakcija. Primarni amini i amidna grupa nepafenaka reagiraju na isti način s vodikovim peroksidom. Iz literature [141, 142] je poznato da reakcije peroksida s primarnim i sekundarnim aminima rezultiraju hidrazinskom vezom, iako je za potpunu konverziju potreban katalizator. Stoga, uslijed reakcije s vodikovim peroksidom, nepafenak se primarno razgrađuje na DP-2. Oksidacije aromatskog prstena u prisutnosti peroksida poznata je iz literature, također u prisutnosti različitih katalizatora, poput paladija [143] ili bakrovog oksida [144]. Razgradni produkt DP-2 dalje se oksidira do razgradnog produkta DP-3 s daljnjom razgradnjom peroksidom. Na isti način nepafenak reagira s razgradnim produktom DP-2 pri čemu nastaje DP-4, kisik iz

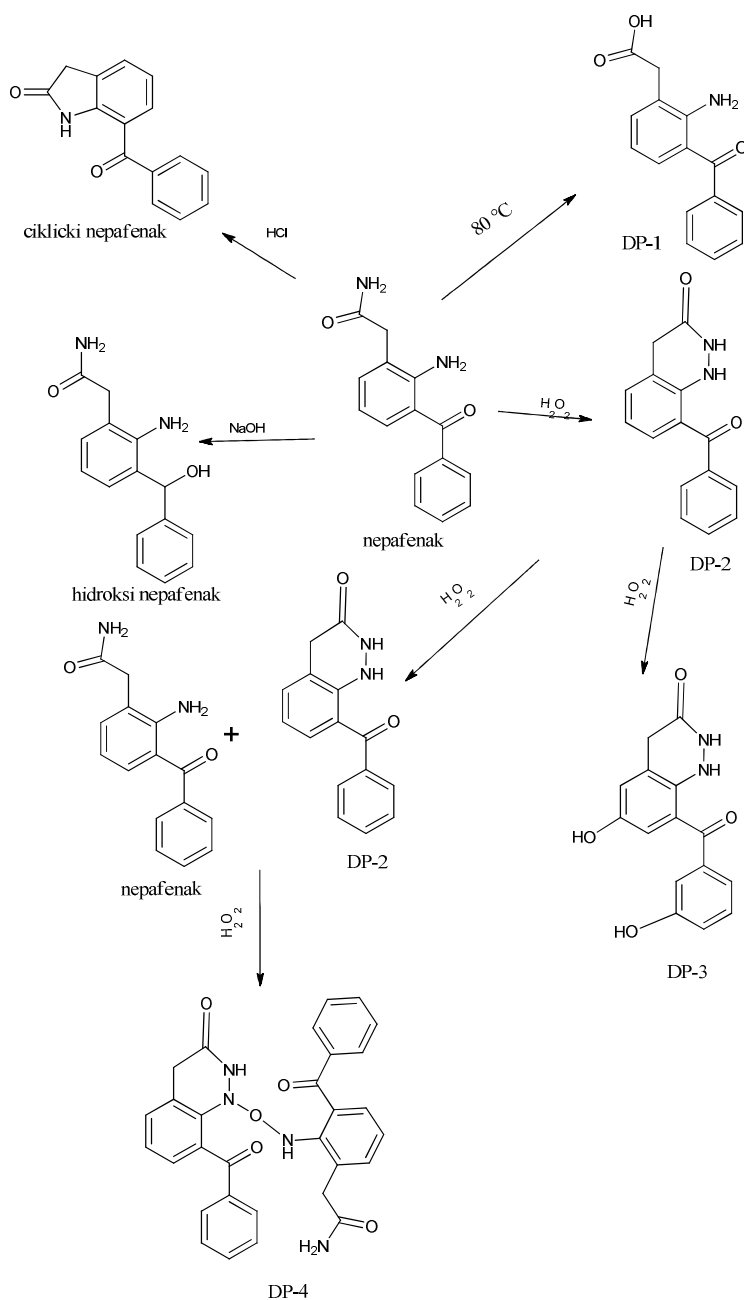
vodikovog peroksida prelazi na primarni amin nepafenaka i formira N-oksid koji trenutačno reagira s DP-2 tvoreći aminohidroksil amin vezu (-N-O-N-) [140].

Tijekom razgradnje u kiselim uvjetima nastaje samo ciklički nepafenak dok se prilikom razgradnje u lužnatim uvjetima nepafenak razgradi na hidroksi-nepafenak. Tijekom termičke razgradnje u otopini nepafenak se razgradi na hidroksi-nepafenak, ciklički nepafenak i DP-1 (amfenak).

**Tablica 22.** Kemijske strukture nepoznatih produkata razgradnje nepafenaka

Produkt razgradnje	Strukturna formula	Molekulska formula, Mr
DP-1 (amfenak)		$C_{15}H_{13}NO_3$ 255,3
DP-2		$C_{15}H_{12}N_2O_2$ 252,1
DP-3		$C_{15}H_{12}N_2O_4$ 284,1
DP-4		$C_{30}H_{24}N_4O_5$ 520,2

Najveći stupanj razgradnje primijećen je pri razgradnji u kiselim uvjetima. Predloženi put razgradnje nepafenaka pri kiseljoj, baznoj, oksidativnoj i termičkoj razgradnji prikazan je na **Slici 44.**



**Slika 44.** Putevi razgradnje nepafenaka

Pretraživanjem literature utvrđeno je da spojevi DP-1 do DP-4 do sada nisu opisani kao produkti razgradnje nepafenaka. Ciklički nepafenak do sada je opisan kao razgradni produkt u radu Lipiec-Abramskaala i suradnika [14]. Drugo razgradno onečišćenje koje su otkrili je natrijeva sol 2-amino-3-benzoilbenzenoicne kiseline koja nije detektirana kao jedno od većih onečišćenja tijekom ovog istraživanja.

#### 4.7. Identifikacija razgradnih produkata primjenom metode 2D-UHPLC-QTOF

Obzirom da je za identifikaciju razgradnih produkata nepafenaka korištena modificirana metoda u kojoj je bilo potrebno zamijeniti kalijev hidrogen fosfat s lako hlapivim formijatnim puferom, nije bilo moguće pouzdano tvrditi da je riječ o onečišćenjima na istom vremenu zadržavanja.

Za dodatnu potvrdu identificiranih razgradnih produkata korištena je 2D-UHPLC povezana sa spregnutom spektrometrijom masa visoke razlučivosti (kvadripol i analizator masa koji mjeri vrijeme preleta, QTOF). Za razliku od spektrometra masa s trostrukim kvadripolom (QQQ), spektrometar masa visoke razlučivosti (QTOF) može dati preciznu masu koja olakšava identifikaciju onečišćenja.

#### 4.8. Optimizacija metode 2D-UHPLC-QTOF za drugu dimenziju

Metoda za drugu dimenziju optimirana je na način da su ispitani 0,1 % mravlja kiselina i 0,1 % amonijev hidroksid kao eluensi u vodi i acetonitrilu. Injektirana je otopina nepafenaka u koncentraciji od  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dodatno su testirane sljedeće kolone u drugoj dimenziji: Zorbax Bonus RP-18 i Zorbax Eclipse Plus Phenyl Hexyl,(Agilent). Određen je broj teoretskih odsječaka i asimetričnost pika, a dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 23**.

**Tablica 23.** Broj teoretskih odsječaka ( $N$ ) i asimetrija kromatografskog pika ( $T$ ) nepafenaka

<b>Pokretna faza</b>	<b>Kolona</b>	<b><math>N</math></b>	<b><math>T</math></b>
0,1 % mravlja kiselina	Zorbax Bonus RP-18	9378	1,003
0,1 % mravlja kiselina	Zorbax Eclipse Plus Phenyl Hexyl	8520	0,820
0,1 % mravlja kiselina	Acquity CSH Fluoro Phenyl,	8319	0,75
0,1 % amonijev hidroksid	Zorbax Bonus RP-18	7520	1,352
0,1 % amonijev hidroksid	Zorbax Eclipse Plus Phenyl Hexyl	7390	1,436
0,1 % amonijev hidroksid	Acquity CSH Fluoro Phenyl	7582	1,652

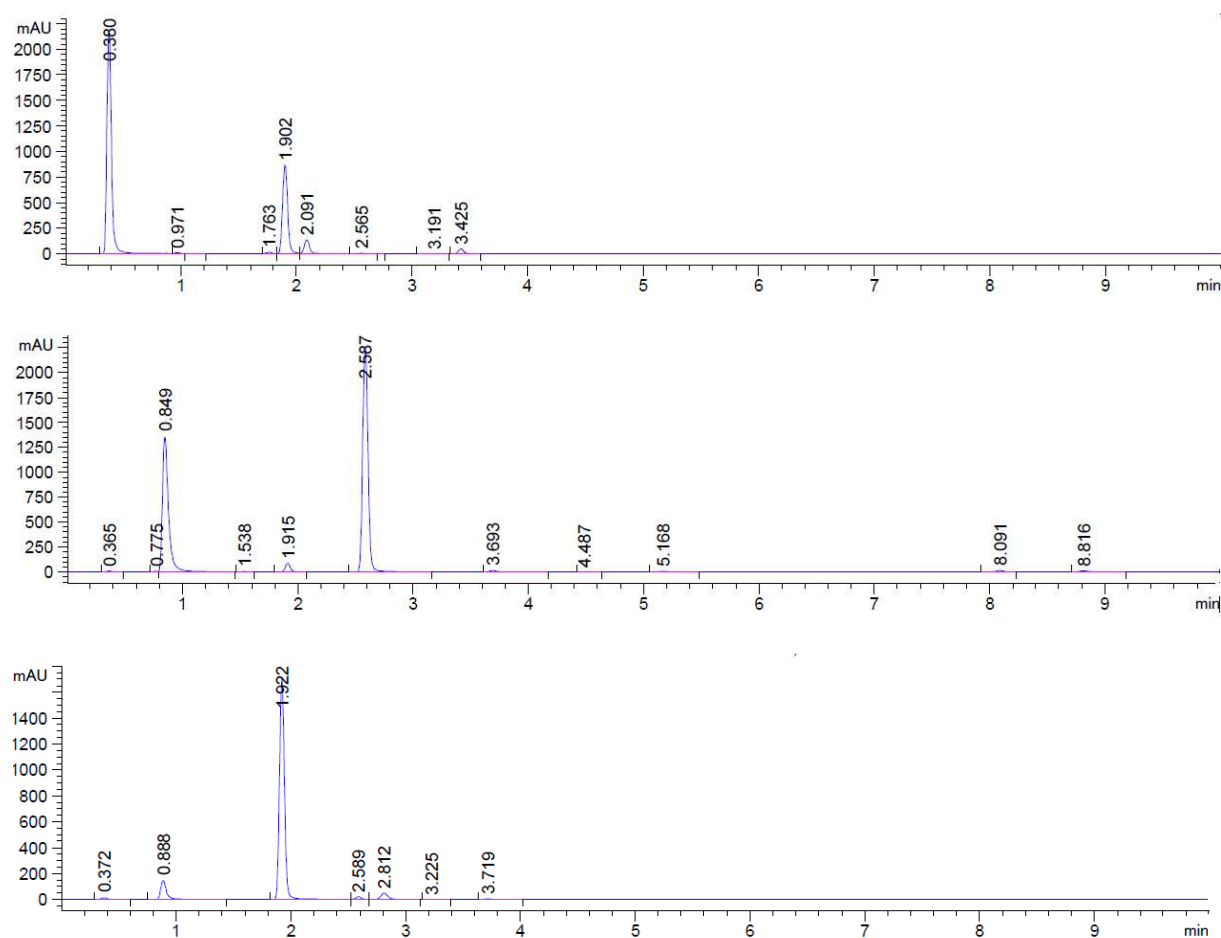
Za kolonu u drugoj dimenziji izabrana je Zorbax Bonus RP-18 ( $50 \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,8 \mu\text{m}$ ) s obzirom da je s tom kromatografskom kolonom postignut najveći broj teoretskih odsječaka i najbolja asimetričnost pika nepafenaka. Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlje kiseline u vodi i acetonitrilu. Parametri metode korišteni u drugoj dimenziji prikazani su u **Tablici 24**.

**Tablica 24.** Parametri metode za drugu dimenziju

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>Zorbax Bonus RP-18, 50 × 2,1 mm, 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	0,1 % mravlja kiselina u vodi		
<b>Eluens B</b>	0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	50	50
	3,00	10	90
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	1,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,4 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	QTOF – ESI +		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

#### 4.8.1. Određivanje spektralne čistoće pika nepafenaka uporabom metode 2D-UHPLC-QTOF

Za analizu metodom 2D-UHPLC-QTOF uzorci su razgrađeni na isti način na koji su razgrađeni prilikom validacije metode. Uzorak nepafenaka razgrađen je s vodikovim peroksidom, klorovodičnom kiselinom i natrijevom lužinom. Uzorci su inicijalno injektirani u prvu dimenziju pri čemu su dobiveni rezultati slični rezultatima dobivenim metodom UHPLC-DAD (**Slika 45.**).

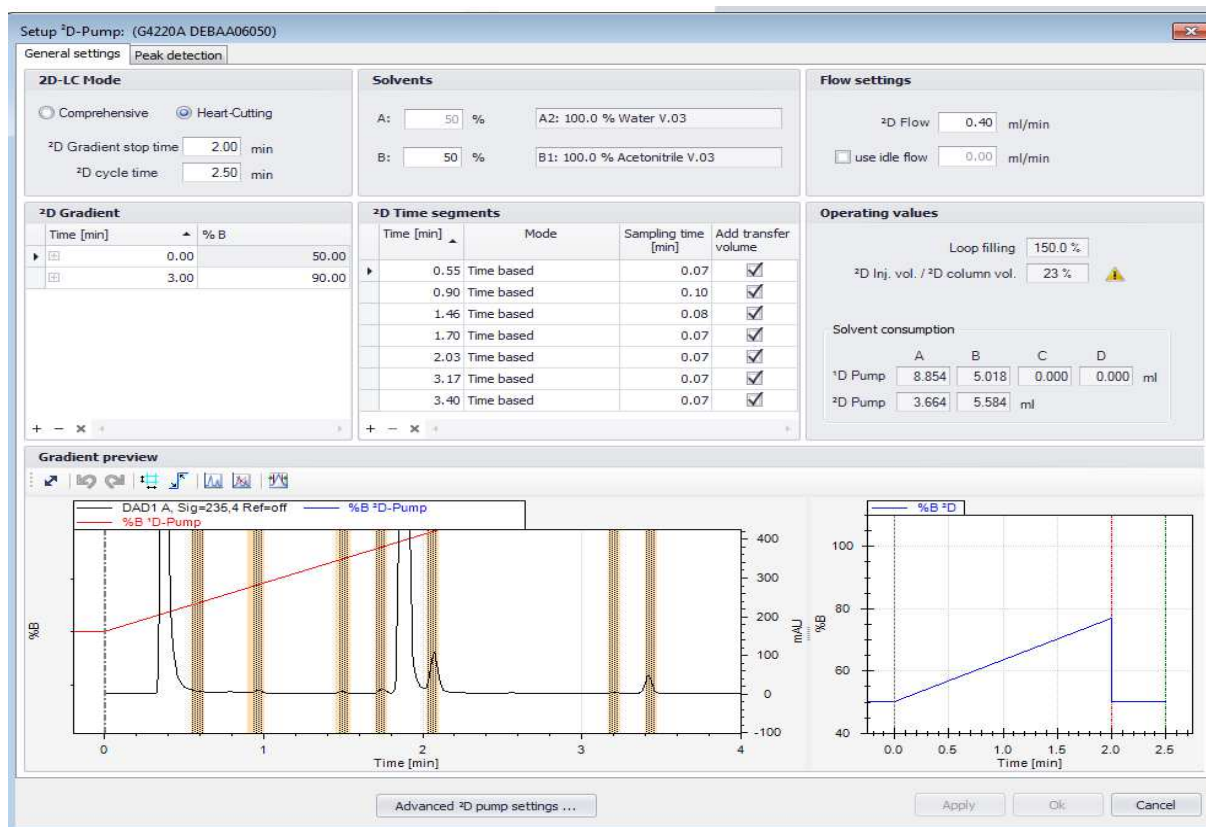


**Slika 45.** Kromatogrami uzraka nakon prisilne razgradnje peroksidom, kiselinom i lužinom nepafenaka dobiveni metodom 2D-UHPLC-QTOF u prvoj dimenziji

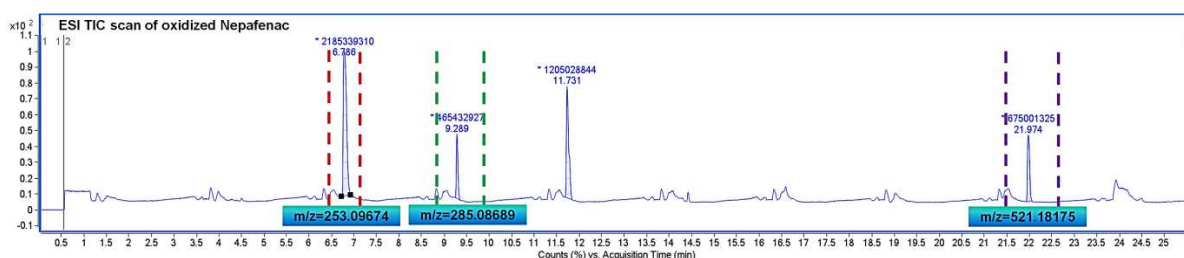
Nakon inicijalnog injektiranja, odabrani su ciljani razgradni produkti i injektirani u drugu dimenziju. Grafički prikaz odabranih pikova za uzorak nakon razgradnje oksidacijom nalazi se na **Slici 46.** Uzorak razgrađen oksidacijom je izabran jer su prilikom razgradnje nastala sva onečišćenja koja nastaju i ostalim razgradnjama, dodatno je odabran jer dolazi do nastajanja



DP-2 i DP-3 koji eluiraju blizu pika nepafenaka i time je testirana i čistoća pika uporabom spektrometrije masa visoke razlučivosti. Nakon što su pikovi dodatno separirani u drugoj dimenziji, određena im je masa spektrometrom masa visoke razlučivosti (**Slika 47.**).



**Slika 46.** Grafički prikaz pikova odabranih za analizu u drugoj dimenziji, uzorak razgrađen oksidacijom



**Slika 47.** Spektri masa razgradnih onečišćenja u drugoj dimenziji

Na ovaj način određene su točne mase DP-1, DP-2, DP-3 i DP-4. Dobiveni rezultati odgovaraju teorijskim masama, uz pogrešku manju od 2 ppm. U **Tablici 25.** navedene su mase injektirane frakcije, vremena zadržavanja i točna masa razgradnih produkata.

**Tablica 25.** Vremena zadržavanja razgradnih produkata i optimalni uvjeti na spektrometru masa

Frakcija	Produkt razgradnje	$t_R$ (min)	$[M+H]^+$	Formula	Fragmentni ioni ( $m/z$ )
3	DP-1	3,7	255.08854	$C_{15}H_{13}NO_3$	268, 240, 224
4	DP-2	6,82	285.07821	$C_{15}H_{12}N_2O_2$	268, 240, 224
5	DP-3	9,28	284.07823	$C_{15}H_{12}N_2O_4$	236, 208, 180
6	DP-4	19,7	520.17642	$C_{30}H_{24}N_4O_5$	443, 415, 365

#### 4.8.2. *Određivanje spektralne čistoće pika nepafenaka uporabom metode 2D-UHPLC-QTOF*

Analiza spektralne čistoće pika (eng. *peak purity analysis*) pomaže prilikom razvoja stabilitetno-indikativne kromatografske metode. Spektar uniformnosti molekule koristi se kada su prisutne koeluirajuće komponente. Homogenost pika potvrđuje se prikupljanjem informacija dobivenih DAD detektorom prilikom analize otopine nepafenaka proizvedenog komercijalnim postupkom i otopine uzorka prisilne razgradnje. Potrebno je slijediti upute proizvođača detektora zbog postavljanja relevantnih parametara prilikom određivanja spektralne čistoće pika pri čemu treba poštivati granice linearnosti samog detektora jer UV detekcija postaje nelinearna pri visokim vrijednostima apsorbancije. Odabire se optimalan referentni spektar, te se procjenjuje sposobnost računalnog programa da automatski korigira spektar zbog stalne promjene otapala kod gradijentnih metoda. Odredi se spektralna čistoća pika referentnog standarda, te potom i spektralna čistoća uzorka čija vrijednost mora biti manja od vrijednosti spektralne čistoće pika standarda da bi imali potvrdu da nije došlo do koeluiranja, točnije da je pik spektralno čist.

Određivanje spektralne čistoće nije apsolutni dokaz čistoće pika i ne postojanja koeluiranja s ciljanim pikom. Ograničenosti ove analize uočavaju se u situacijama kad su koeluirajuće tvari spektralno slične, kada se ispituju koncentracije manje od granica kvalifikacije, kada

ispitivana tvar ne sadrži kromofore ili kada otapanje nije potpuno.

U svrhu provjere čistoće pika korištena je dvodimenzionalna tekućinska kromatografija. Pik nepafenaka podijeljen je u 14 frakcija, svaka frakcija injektirana je u drugu dimenziju, pri čemu dolazi do dodatnog razdvajanja potencijalnih onečišćenja. Uspoređene su čistoće kromatografskih pikova u drugoj dimenziji i dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 26**.

**Tablica 26.** Spektralna čistoća pika nepafenaka

<b>Frakcija</b>	<b><i>Purity Angle</i></b>	<b><i>Match Angle</i></b>	<b><i>Purity Treshold</i></b>	<b><i>Match Treshold</i></b>	<b>Egazktna masa</b>
Nepafenak	0,113	0,233	0,049	0,174	253,06794
Frakcija-1	0,121	0,239	0,056	0,183	253,06794
Frakcija-2	0,121	0,239	0,056	0,183	253,06794
Frakcija-3	0,118	0,228	0,055	0,173	253,06794
Frakcija-4	0,112	0,231	0,052	0,174	253,06794
Frakcija-5	0,115	0,236	0,054	0,169	253,06794
Frakcija-6	0,119	0,232	0,048	0,177	253,06794
Frakcija-7	0,115	0,236	0,050	0,172	253,06794
Frakcija-8	0,112	0,231	0,052	0,174	253,06794
Frakcija-9	0,115	0,236	0,054	0,169	253,06794
Frakcija-10	0,119	0,232	0,048	0,177	253,06794
Frakcija-11	0,115	0,236	0,050	0,172	253,06794
Frakcija-12	0,115	0,236	0,054	0,169	253,06794
Frakcija-13	0,119	0,232	0,048	0,177	253,06794
Frakcija-14	0,115	0,236	0,050	0,172	253,06794

Dodatna potvrda čistoće pika nepafenaka dobivena je analizom spektra masa snimljenim spektrometrom masa visoke razlučivosti. Preklopljeni su spektri masa svih frakcija, iz čega je vidljivo da je pik isti.

4.9. Razvoj metode fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima (UPC<sup>2</sup>-PDA) za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja

Cilj je bio razviti ortogonalnu metodu za određivanje nepafenaka i onečišćenja kao dodatnu kontrolu pri razdvajanju onečišćenja. Razvijena je nova metoda uporabom kromatografije pri superkričnim uvjetima različita od UHPLC metode. Razvoj metode je uključivao testiranje tri različite nepokretne faze, ispitani su modifikatori pokretnih faza, različiti gradijenti programi, temperatura kolona i tlak na detektoru (eng. *back pressure*). Za razvoj kromatografske metode korištene su standardne otopine nepafenaka i poznatih onečišćenja te otopine nakon prisilne razgradnje. Prilikom razvoja metode postavljeni su sljedeći kriteriji: kromatografsko razlučivanje veće od 2, granica kvantifikacije veća od 0,02 % i asimetričnost kromatografskog pika između 0,8 – 1,2.

*Izbor nepokretne faze*

Testirano je nekoliko kromatografskih kolona s različitim punjenjem: C-18 (ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH), 2-etilpiridin (Waters Torus 2-PIC) i diol visoke gustoće (Waters Torus DIOL). Kao modifikator u inicijalnom testiranju kolona korišten je metanol s gradijentom prikazanim u **Tablici 27.**, temperaturom kolone 40 °C i protokom pokretne faze 2,0 mL min<sup>-1</sup>. Injektirana je otopina nepafenaka s poznatim onečišćenjima (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, Cl-nepafenak, hidroksi-nepafenak, ciklički nepafenak).

**Tablica 27.** Inicijalni gradijent za testiranje različitih kolona

Gradijent	Vrijeme (min)	% eluens A (CO <sub>2</sub> )	% eluens B (metanol)
	0,00	90	10
6,00	20	80	
6,01	90	10	

Testiranjem kolone s 2-etilpiridinom kao nepokretnom fazom, uočeno je koeluiranje 2-aminobenzofenona i hidroksi-nepafenaka, kao i neodgovarajuća asimetrija glavnog pika (asimetrija glavnog pika >2,1).

Kolona s diolom visoke gustoće kao nepokretnom fazom nije pokazivala mogućnost zadržavanja nepafenaka na koloni što je rezultiralo eluiranjem nepafenaka u mrtvom volumenu zajedno s onečišćenjima ciklički nepafenak i hidroksi-nepafenak.

Kolona s C18 punjenjem pokazala je kromatografsko razlučivanje  $>2$ , kao i asimetričnost nepafenaka 0,95. Usporedba razlučivanja, asimetrije kromatografskih pika i vremena zadržavanja testiranih kolona nalazi u **Tablici 28**.

**Tablici 28.** Usporedba nepokretnih faza

Nepokretna faza	$R_S$	$T$	$t_R$ (min)
2-etilpiridin	$<0.5$	2,102	2,150
diol visoke gustoće	$<0.5$	0,982	0,350
C18	$>2$	0,991	1,852

Na temelju dobivenih rezultata sva daljnja istraživanja provedena su s C18 kromatografskom kolonom ACQUITY UPC<sup>2</sup> BEH (Waters) dimenzija  $100 \times 2,1$  mm i veličinom zrna punila  $1,7 \mu\text{m}$ .

#### *Utjecaj modifikatora*

Ispitan je utjecaj različitih modifikatora pokretne faze: metanola, etanola, izo-propanola i acetonitrila (nepokretna faza B). Svi ispitani modifikatori pokazali su kromatografsko razlučivanje veće od 2. Međutim, uporaba manje polarnih otapala pokazala je duže zadržavanje onečišćenja na koloni što je rezultiralo vremenima zadržavanja dužim od 15 min kao i nižim brojem teoretskih odsječaka, dok je uporabom metanola kao modifikatora postignuto vrijeme zadržavanja od 7 min.

#### *Utjecaj temperature kolone*

Utjecaj temperature kolone na kromatografsko razlučivanje nepafenaka i njegovih onečišćenja ispitan je pri  $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $45,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uočeno je da je pri višoj temperaturi ( $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zadržavanje svih komponentni duže. Temperatura kolone od  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , pokazala je najkraće zadržavanje svih komponentni ali je uočen visoki tlak. Stoga je, kao optimalna temperatura kolone izabrana temperatura od  $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$  jer je tlak kolone bio u granicama preporučenim od strane proizvođača kolona, a kromatografsko razlučivanje i asimetričnost pika bili su zadovoljavajući.

### Utjecaj protoka

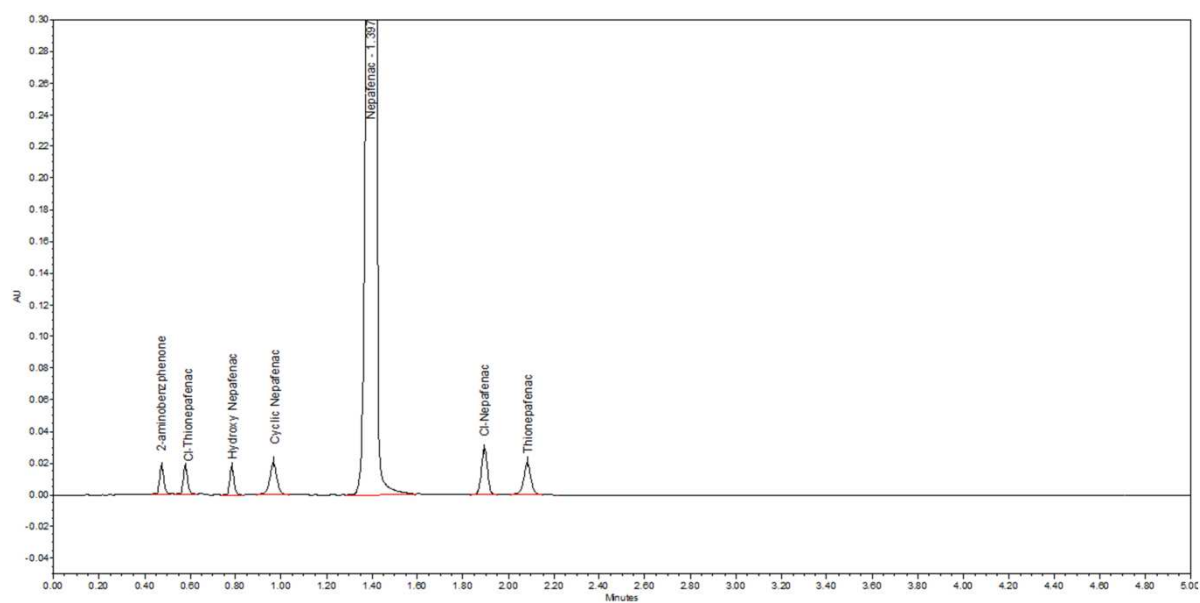
Ispitani su protoci pokretne faze od 2,0, 3,0 i 5,0 mL min<sup>-1</sup>. Pri višim protocima uočena su kraća vremena zadržavanja na koloni kao i poboljšan izgled pika. Optimalan izgled pika i razdvajanje dobiveno je s protocima od 3,0 i 5,0 mL min<sup>-1</sup>, ali pri protoku od 5,0 mL min<sup>-1</sup> tlak na koloni bio je iznad dozvoljenih granica propisanih od strane proizvođača kolone te je kao optimalni izabran protok od 3,0 mL min<sup>-1</sup>.

### Utjecaj tlaka na detektoru

Ispitani su tlakovi na detektoru od 1500, 1800 i 2000 psi. Uočeno je da povećanjem tlaka na detektoru dolazi do skraćivanja vremena zadržavanja analita na koloni kao i poboljšanja izgleda pikova. Stoga je izabran tlak na detektoru od 2000 psi. Na temelju dobivenih rezultata, odabrani su optimalni eksperimentalni uvjeti za kromatografsko određivanje nepafenaka i onečišćenja primjenom metode fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima s detektorom s nizom dioda koji su prikazani u **Tablici 29**. Kromatografsko razlučivanje nepafenaka i njegovih poznatih onečišćenja optimiranom metodom UPC<sup>2</sup>-PDA prikazan je na **Slici 48**.

**Tablica 29.** Optimalni kromatografski uvjeti za određivanje onečišćenja u nepafenaku metodom UPC<sup>2</sup>-PDA

Kolona i pakiranje	WATERS Acquity BEH C18, 100 × 2,1 mm, 1,7 μm		
Eluens A	Ukapljeni ugljični dioksid		
Eluens B	Metanol		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	85	15
	1,00	70	30
	4,00	70	30
	4,01	85	15
	5,00	85	15
Vrijeme stabilizacije	1,00min		
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	3,0 mL min <sup>-1</sup>		
Detektor	DAD, 235 nm		
Temperatura kolone	37,5 °C		
Tlak na detektoru	2000 psi		



**Slika 48.** Kromatogram nefafenaka i onečišćenja snimljen metodom UPC<sup>2</sup>-PDA

#### 4.10. Validacija metode UPC<sup>2</sup>-PDA za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja

Razvijena metoda UPC<sup>2</sup>-PDA za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja validirana je u skladu s ICH smjernicama [137]. Određene su sljedeće izvedbene značajke: specifičnost, prikladnost sustava, točnost, preciznost, iskorištenje, granice kvantifikacije i kvalifikacije, robusnost i stabilnost otopine. Validacija je provedena na isti način kako je opisano u poglavlju 2.3. Validacija metode UHPLC-DAD za kvantitativno određivanje nepafenaka i onečišćenja.

Specifičnost je dokazana detekcijom 6 separiranih pikova onečišćenja nepafenaka (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, Cl-nepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak (**Slika 15.**).

Linearnost je potvrđena faktorom determinacije koji je  $\geq 0,999$  za sve analite (**Tablica 30.**). Vrijednosti RSD (%) nagiba pravca i odsječka na ordinati manje su od 5,0 % za sve komponente.

**Tablica 30.** Parametri umjernih pravaca nepafenaka i poznatih onečišćenja

<b>Analit</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>Odsječak (a)</i></b>	<b><i>Nagib (b)</i></b>	<b><i>R</i><sup>2</sup></b>	<b><i>RSS</i></b>	<b><i>RRF</i></b>
2-aminobenzofenon	5	172,3	6,1	1,000	0,015	-
Cl-tionepafenak	5	192,5	5,3	0,999	0,007	1,02
Hidroksi-nepafenak	5	184,9	4,1	0,999	0,005	0,95
Ciklički-nepafenak	5	139,9	1,3	0,999	0,012	0,89
Nepafenak	5	162,2	3,1	0,999	0,011	0,92
Cl-nepafenak	5	172,6	2,3	0,999	0,003	0,93
Tionepafenak	5	178,2	5,7	0,999	0,001	0,99

*n* – broj ponavljanja

*RSS* – suma kvadrata odstupanja

*RRF* – relativni odziv



Granice kvalifikacije za nepafenak i poznata onečišćenja su jednake i iznose 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Također, granice kvantifikacije za nepafenak i poznata onečišćenja su jednake i iznose 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Iskorištenja se kreću u rasponu od 88,40 % do 102,20 % čime je potvrđena točnost kvantifikacije nepafenaka i svih 6 poznatih onečišćenja nepafenaka (2-aminobenzofenon, Cl-tionepafenak, tionepafenak, hidroksi-nepafenak i ciklički nepafenak). Rezultati su prikazani u **Tablici 31**.

**Tablica 31.** Rezultati ispitivanja točnosti i iskorištenja za metodu UPC<sup>2</sup>-PDA

<i>Analit</i>	<i>Koncentracija</i>	<i>Iskorištenje (%) <math>\pm</math> RSD (%)</i>
2-aminobenzofenon	0,01 % (LOQ)	97,12 $\pm$ 0,51
	0,10 %	88,40 $\pm$ 0,73
	0,25 %	92,30 $\pm$ 2,48
Cl-tionepafenak	0,01 % (LOQ)	95,62 $\pm$ 2,89
	0,10 %	97,24 $\pm$ 2,21
	0,25 %	98,75 $\pm$ 1,27
Tionepafenak	0,01 % (LOQ)	89,50 $\pm$ 1,80
	0,10 %	97,12 $\pm$ 0,89
	0,25 %	97,49 $\pm$ 0,52
Cl-nepafenak	0,01 % (LOQ)	92,49 $\pm$ 2,21
	0,10 %	94,36 $\pm$ 2,12
	0,25 %	99,58 $\pm$ 3,10
Hidroksi-nepafenak	0,01 % (LOQ)	93,15 $\pm$ 4,31
	0,10 %	98,21 $\pm$ 1,67
	0,25 %	95,98 $\pm$ 1,57
Ciklički nepafenak	0,01 % (LOQ)	98,15 $\pm$ 1,11
	0,10 %	102,20 $\pm$ 0,22
	0,25 %	100,17 $\pm$ 0,64

Rezultati ispitivanja preciznosti prikazani su u **Tablici 32**. Vrijednosti RSD za ponovljena mjerenja površina kromatografskih pikova manje su od 10,0 % za sve analite.

**Tablica 32.** Rezultati ispitivanja preciznosti

<b>Komponenta</b>	<b>Preciznost (RSD, %)</b>	<b>Srednja preciznost (RSD, %)</b>
Nepafenak	7,2	3,9
2-aminobenzophenone	4,7	3,4
Cl-tionepafenak	5,5	2,7
Tionepafenak	6,2	2,8
Cl-nepafenak	7,5	3,1
Hidroksi-nepafenak	7,1	3,2
Ciklički nepafenak	3,7	2,9

U svrhu ispitivanja robusnosti metode ispitan je utjecaj promjene protoka pokretne faze u rasponu od 2,8 mL min<sup>-1</sup> do 3,2 mL min<sup>-1</sup>, te utjecaj promjene temperature kućišta kolone (35 do 45 °C). U oba slučaja, unesene varijacije nisu značajno utjecale na razlučivanje između kromatografskih pikova. Razlučivanje između susjednih pikova veće je od 2,0 čime je potvrđena robusnost metode.

Rezultati eksperimenta stabilnosti pokazali su da je u otopini uzorka nepafenaka došlo do razgradnje i formiranja cikličkog nepafenaka. Razrijeđene otopine uzorka također se razgrađuju te, uz ciklički nepafenak, nastaje i razgradni produkt DP-1. Zbog navedenog, otopine nepafenaka potrebno je pripremiti i injektirati svježe prije same analize.

Razvoj ortogonalnih metoda izrazito je važan u farmaceutskoj industriji jer daje dodatnu dimenziju selektivnosti koja je izrazito važna u razvoju metoda. Prilikom ranog razvoja metoda kada sva onečišćenja nisu dostupna koristi se pristup ortogonalnih metoda te se njima kontroliraju razvijene metode. Do sada su, kao ortogonalne metode uobičajeno korištene tankoslojna kromatografija ili tekućinske kromatografije normalne faze. Razvojem novih analitičkih tehnika, metode fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima sve više se koriste kao ortogonalne metode [145]. Koristeći superkričnu tekućinu ugljikovog dioksida kao primarni eluens niske viskoznosti razvijena je ortogonalna metoda za određivanje nepafenaka pri superkričnim uvjetima.

Kromatografija pri superkričnim uvjetima se smatra dobrom i za razdavanje polarnih [146], i nepolarnih komponentni [147]. Razvijena metoda minimalizira potrošnju eluensa jer koristi ugljični dioksid u odnosu na acetonitril i time generira manje otpadnih otapala i smanjuje cijenu analize u odnosu na razvijenu UHPLC-DAD metodu.

U **Tablici 33**, dani su parametri razvijenih metoda, područje primjene za obje metode je isto (0,01 %-0,25 %), razlučivanje su veći od 2, granice kvantifikacije su 0,01 % za obje metode te se smatra da obje metode mogu biti primjenjive za rutinsku analizu djelatne tvari nepafenak. Metoda UHPLC je ipak nešto osjetljivija ako usporedimo odnos signala i šuma pri koncentraciji od 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Trajanje analize metodom UPC<sup>2</sup>-PDA je dvostruko kraće u odnosu na metodu UHPLC-DAD, što u slučajevima kada se radi o velikom broju analiza može značiti značajnu uštedu vremena te brže dobivanje zahtijevanih informacija.

**Tablica 33.** Usporedba UHPLC-DAD i UPC<sup>2</sup>-PDA metode

<b>Parametar</b>	<b>UHPLC-DAD</b>	<b>UPC<sup>2</sup>-PDA</b>
Nepokretna faza	C18	C18
Eluens A	fosfatni pufer, pH 3,0	ukapljeni ugljični dioksid
Eluens B	acetonitril	metanol
Vrijeme analize	10 min	5 min
Protok pokretne faze	0,6 mL min <sup>-1</sup>	3,0 mL min <sup>-1</sup>
Otapalo	acetonitril:voda = 1:1 (v/v)	acetonitril
Temperatura kolone	50,0 °C	37,5 °C
Koncentracija uzorka	1 mg mL <sup>-1</sup>	1 mg mL <sup>-1</sup>
Razlučivanje	>4	>3
Granica kvantifikacije	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( S/N 52.5)	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( S/N 13.1)
Granica kvalifikacije	0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( S/N 14.1)	0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ( S/N 4.7)
Područje primjene	0,1 - 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,1 - 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$

## 5. ZAKLJUČCI

- Razvijena je metoda za razdvajanje intermedijera, procesnih i degradacijskih onečišćenja nepafenaka. Optimalno razdvajanje dobiveno je s BEH C18 kolonom dimenzija čestica 1,7  $\mu\text{m}$ , gradijentnim eluiranjem uz protok od 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ , pri čemu se pokretna faza sastojala od fosfatnog pufer pH vrijednosti 3,0 i acetonitrila.
- Metoda tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti je brža i osjetljivija od metoda opisanih u literaturi koje su metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.
- Metoda tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti je validirana u skladu s ICH smjernicama, područje primjene metode je 0,1 - 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pri čemu je dokazana granica kvantifikacije od 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a granica kvalifikacije od 0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Razvijena metoda UHPLC-DAD dodatno je provjerena uporabom Drylab® programa pri čemu je dokazano da se nalazi u zoni robusnosti te da minimalne promjene parametara metode na utječu na separaciju. Dobiveni model je potvrđen provođenjem osam eksperimenata koji su davali minimalnu separaciju. Rezultati dobiveni eksperimentom slažu se s rezultatima predviđanja računalnog programa DryLab®.
- Provedene su studije razgradnje nepafenaka u kiselim i lužnatim uvjetima, oksidativna razgradnja, te je ispitan utjecaj vlažnosti i temperature na stabilnost nepafenaka. Glavna degradacijska onečišćenja identificirana su uporabom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spregnutom spektrometrijom masa. Temeljem dobivenih rezultata pretpostavljeni su putevi razgradnje nepafenaka.
- Selektivnost metode i čistoća glavnog pika nepafenaka određena je primjenom detektora s nizom dioda i dvodimenzionalne tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (2D-UHPLC) povezana sa spregnutom spektrometrijom masa visoke razlučivosti (QTOF).
- Određena je konstanta brzine razgradnje i vrijeme poluraspada nepafenaka.
- Kao ortogonalna metoda, razvijena je metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj tvari nepafenak i primjenom fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima. Optimalni uvjeti razdvajanja postignuti su gradijentnim eluiranjem s kolonom BEH

C18, pri protoku od  $3 \text{ mL min}^{-1}$ , pri čemu je pokretna faza bila ukapljeni ugljični dioksid uz dodatak metanola kao modifikatora.

- Metoda fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima je validirana i uspoređena s metodom tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti. Validacijom je potvrđeno da su obje metode pogodne za određivanje onečišćenja u djelatnoj tvari nepafenak pri čemu je metoda tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti ipak nešto osjetljivija što je vidljivo iz omjera signala i šuma pri granici kvalifikacije.

## 6. LITERATURA

1. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000818/WC500027155.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000818/WC500027155.pdf) (pristup 29.8.2018)
2. D. A. Gamache, G. Graff, M. T. Brady, J. M. Spellman, Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: I. assessment of anti-inflammatory efficacy, *Inflammation* 70 (2000) 357–370.
3. S. J. Kim, A. J. Flach, L. M. Jampol, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in ophthalmology, *Surv. Ophthalmol.* 55 (2010) 108–133.
4. S. M. Hariprasad, D. Callanan, S. Gainery, Y. G. He, K. Warren, Cystoid and diabetic macular edema treated with nepafenac 0.1%, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 23 (2007) 585–590.
5. S. S. Lane, S. S. Modi, R. P. Lehmann, E. J. Holland, Nepafenac ophthalmic suspension 0.1% for the prevention and treatment of ocular inflammation associated with cataract surgery, *J. Cataract. Refract. Surg.* 33 (2007) 53–58.
6. M. A. Kapin, J. M. Yanni, M. T. Brady, T. J. McDonough, J. G. Flanagan, M. H. Rawji, D. C. Dahlin, M. E. Sanders, D. A. Gamache, Inflammation-mediated retinal edema in the rabbit is inhibited by topical nepafenac, *Inflammation* 27 (2003) 281–291.
7. T. L. Ke, G. Graff, J. M. Spellman, J. M. Yanni, Nepafenac, a unique nonsteroidal prodrug with potential utility in the treatment of trauma-induced ocular inflammation: II. *In vitro* bioactivation and permeation of external ocular barriers, *Inflammation* 24 (2000) 371–384.
8. T. Walters, M. Raizman, P. Ernest, J. Gayton, R. Lehmann, *In vivo* pharmacokinetics and *in vitro* pharmacodynamics of nepafenac, amfenac, ketorolac, and bromfenac, *J. Cataract. Refract. Surg.* 33 (2007) 1539–1545.
9. R. J. Kulmacz, G. Graff, Characterization of COX-1 and -2 inhibition by nepafenac and its metabolite, amfenac, *Acta Ophthalmol Scand* 85 (83) (2007)
10. A. J. Flach, Cyclo-oxygenase inhibitors in ophthalmology, *Surv. Ophthalmol.* 36 (1992) 259–284.
11. E. M. Smyth, G. A. Fitz Gerald, The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes & related compounds, u B. Katzung (ur.), *Basic and clinical pharmacology*. 10. izd., McGraw Hill, New York, 2007, str. 293–308.

12. J. Yadav, M. N. Doshi, H. P. Panchori, S. S. Bhalerao, Simple and rapid spectrophotometric method for the determination of nepafenac in pharmaceuticals, *J. Pharm. Res.* 5 (2012) 4292–4294.
13. A. Gavalda Escude, 2-{2-amino-3-[hydroxy(phenyl)methyl]phenyl} acetamide, Pat. No. WO 2010/115906 A1, October 14, 2010.
14. E. Lipiec-Abramska, Ł. Jedynek, A. Formela, J. Roszczyński, M. Cybulski, M. Puchalska, J. Zagrodzka, Development and validation of high performance liquid chromatography with a spectrophotometric detection method for the chemical purity and assay of Nepafenac, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 91 (2014) 1–6.
15. ICH Harmonised tripartite guideline, Impurities in new drug substances Q3A (R2), 2006.
16. ICH Harmonised tripartite guideline, Impurities guideline for residual solvents Q3C (R6), 2016.
17. M. Kaštelan-Macan, M. Medić-Šarić, S. Turina, Plošna kromatografija. Farmaceutusko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2006, str. 7–33.
18. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete. Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217–235.
19. M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja. Mentor d.o.o., Zagreb, 2014, str. 97–99.
20. [www.pharmaguideline.com/2013/12/relative-response-factor-and-its-calculation-in-hplc-analysis.html](http://www.pharmaguideline.com/2013/12/relative-response-factor-and-its-calculation-in-hplc-analysis.html) (pristup 14.06.2018)
21. M. A. Baldwin, F. W. McLafferty, Liquid chromatography mass spectrometry interface. I. The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer, *Org Mass Spectrom.* 7 (1973) 1111–1353.
22. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengnute tehnike tekućinski kromatograf spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina* 45 (2009) 218–232.
23. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*. 2. izdanje, John Wiley & Sons, Inc., Danvers, SAD, 1997.
24. J. J. van Deemter, E. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion & resistance to mass transfer or cause of non ideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1965) 271–289.
25. B. Srivastava, B. K. Sharma, U. S. Baghel, Yashwant, N. Sethi, Ultra performance liquid chromatography (UPLC): A chromatography technique, *Int. J. Pharma. Qual. Assur.* 2 (2010) 19–25.

26. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, Osnove analitičke kemije. Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 645–674.
27. Y. Kazakevich, R. Lobrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007, str. 3.
28. S. K. Bhardway, K. Dwivedi, D. D. Agarwal, A review: HPLC method development and validation, *Int. J. Anal. Bioanal. Chem* 5 (2015) 7–81.
29. K. Toppner, D. Hansen, E. Herbig, HPLC analysis, The role of ultrapure water, *GIT Lab. J. Eur.* 17 (2014) 16–18.
30. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to modern liquid chromatography, John Wiley & Sons, New Jersey, 1979.
31. B. Car-Pavlic, Razvoj UHPLC metode za određivanje onečišćenja u kapsulama pregabalina prema načelu kvalitete ugrađene u dizajn, diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016.
32. M. Aleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam, A. Hafeez, Ultra performance liquid chromatography (UPLC) - A review, *Austin J. Anal. Pharm. Chem.* 2 (2015) 1056–1060.
33. D. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836–1848.
34. K. K. Unger, D. Kumar, M. Grun, G. Buchel, S. Ludtke, T. H. Adam, Synthesis of spherical porous silicas in the micron and submicron size range: Challenges and opportunities for miniaturized high-resolution chromatographic and electrokinetic separations, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 47–55.
35. A. D. Jerkovich, J. S. Mellors, J. W. Jorgenson, The use of micrometer-sized particles in ultrahigh pressure liquid chromatography, *LCGC N. Am.* 21 (2003) 600–610.
36. N. Wu, J. A. Lippert, M. L. Lee, Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography, *J Chromatogr A.* 911 (2001) 1–12.
37. J.J. Salisbury, Fused-core particles: A practical alternative to sub- 2 micron particles, *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 883–886.
38. T. Greibrokk, T. Andersen, High-temperature liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 743–755.
39. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spoendlin, Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 microm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production



- working under current good manufacturing practice, *J. Chromatogr. A* 103 (2004) 127–133.
40. N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, Monolithic columns - A new type of chromatographic support for liquid chromatography, *Anal. Chem.* 73 (2001) 420–429.
  41. N. Wu, J. Dempsey, P. M. Yehl, A. Dovletoglu, D. Ellison, J. Wyvratt, Practical aspects of fast HPLC separations for pharmaceutical process development using monolithic columns, *J. Anal. Chem.* 523 (2004) 149-156.
  42. D. Jain, P. K. Basniwal, Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 86 (2013) 11–35.
  43. R. M. Patel, Stability indicated HPLC method development – A review, *Int. Reseach J. Pharm.* 2 (2011) 79–87.
  44. I. Baranowska, S. Magiera, J. Baranowski, Clinical applications of fast liquid chromatography: a review on the analysis of cardiovascular drugs and their metabolites, *J. Chromatogr. B* 927 (2013) 54–79.
  45. R. N. Xu, L. Fan, M. J. Rieser, T. A. El-Shourbagy, Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 342–355.
  46. E. Van Gyseghem, S. Van Hemelryck, M. Daszykowski, F. Questier, D. Massart, Y. Vander Heyden, Determining orthogonal chromatographic systems prior to the development of methods to characterise impurities in drug substances, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 77–93.
  47. M. Dumarey, R. Put, E. Van Gyseghem, Y. Vander Heyden, Dissimilar or orthogonal reversed-phase chromatographic systems: a comparison of selection techniques, *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 223–234.
  48. X. Wang, W. Li, H. T. Rasmussen, Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 58–62.
  49. E. Van Gyseghem, M. Jimidar, R. Sneyers, M. De Smet, E. Verhoeven, Y. Vander Heyden, Stationary phases in the screening of drug/impurity profiles and in their separation method development: Identification of columns with different and similar selectivities, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 751–760.
  50. K. Zhang, J. Wang, M. Tsang, L. Wigman, N. Chetwyn, Two-dimensional HPLC in pharmaceutical analysis, *Am. Pharm. Rev.* 16 (2013) 39–44.

51. L. Mondello, A. C. Lewis, K. D. Bartle, *Multidimensional chromatography*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2002.
52. J. C. Giddings, Concepts and comparisons in multidimensional separation, *J. High Resolut. Chromatogr.* 10 (1987) 319–323.
53. S. R. Groskreutz, M. M. Swenson, L. B. Secor, D. R. Stoll, Selective comprehensive multi-dimensional separation for resolution enhancement in high performance liquid chromatography. Part I: Principles and instrumentation, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 31–40.
54. P. J. Marriott, P. Schoenmakers, Z.-Y. Wu, Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography – An update, *LC GC Eur.* 25 (2012) 266–275.
55. K. Yamashita, M. Motohashi, T. Yashiki, Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of ionic drugs in biological fluids with short-wavelength ultraviolet detection using column switching combined with ion-pair chromatography: Application to basic compounds, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 487 (1989) 357–363.
56. K. Yamashita, M. Motohashi, T. Yashiki, Column-switching techniques for high-performance liquid chromatography of ibuprofen and mefenamic acid in human serum with short-wavelength ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 570 (1991) 329–338.
57. M. E. León-González, N. Rosales-Conrado, L. V. Pérez-Arribas, V. Guillén-Casla, Two-dimensional liquid chromatography for direct chiral separations: A review, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 59–83.
58. K. Lanbeck- Vallén, J. Carlqvist, T. Nordgren, Determination of ampicillin in biological fluids by coupled-column liquid chromatography and post-column derivatization, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 567 (1991) 121–128.
59. I. W. Wainer, R. M. Stiffin, Direct resolution of the stereoisomers of leucovorin and 5-methyltetrahydrofolate using a bovine serum albumin high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase coupled to an achiral phenyl column, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 424 (1988) 158–162.
60. J. G. Shackman, B. L. Kleintop, Peak purity assessment in a triple-active fixed-dose combination drug product related substances method using a commercial two-dimensional liquid chromatography system: *Liquid chromatography*, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2688–2695.

61. Y. Oda, N. Asakawa, T. Kajima, Y. Yoshida, T. Sato, On-line determination and resolution of verapamil enantiomers by high-performance liquid chromatography with column switching, *J. Chromatogr. A* 541 (1991) 411–418.
62. Y.-Q. Chu, I. W. Wainer, Determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in serum using coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 497 (1989) 191–200.
63. C. L. Barhate, E. L. Regalado, N. D. Contrella, J. Lee, J. Jo, A. A. Makarov, D. W. Armstrong, C. J. Welch, Ultrafast chiral chromatography as the second dimension in two-dimensional liquid chromatography experiments, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3545–3553.
64. D. Li, C. Jakob, O. Schmitz, Practical considerations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems (LCxLC) with reversed-phases in both dimensions, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 153–167.
65. Y.-Q. Chu, I. W. Wainer, Determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in serum using coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 497 (1989) 191–200.
66. I. François, K. Sandra, P. Sandra, Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations - A review, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 14–31.
67. X. Li, F. Wang, B. Xu, X. Yu, Y. Yang, L. Zhang, H. Li, Determination of the free and total concentrations of vancomycin by two-dimensional liquid chromatography and its application in elderly patients, *J. Chromatogr. B* 969 (2014) 181–189.
68. B.-M. Eriksson, B.-A. Persson, M. Wikström, Determination of urinary vanillyl mandelic acid by direct injection and coupled-column chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 527 (1990) 11–19.
69. U. R. Tjaden, D. S. Stegehuis, B. J. Reeuwijk, H. Lingeman, J. van der Greef, Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in kidney tissue homogenates using valve-switching techniques, *Analyst* 113 (1988) 171–174.
70. T. Miyabayashi, T. Okuda, M. Motohashi, K. Izawa, T. Yashiki, Quantitation of a new potent angiotensin II receptor antagonist, TCV-116, and its metabolites in human serum and urine, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 677 (1996) 123–132.
71. C. Yao, W. Yang, W. Wu, J. Da, J. Hou, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Jin, M. Yang, B. Jiang, X. Liu, D. Guo, Simultaneous quantitation of five Panax notoginseng saponins by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography: Method development and application to the quality control of eight Notoginseng containing Chinese patent medicines, *J. Chromatogr. A* 1402 (2015) 71–81.

72. E. Naegele, Detection of impurities by heart cutting using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC solution, Agil. Note, 2012.
73. J. Venkatramani, J. Girotti, L. Wigman, N. Chetwyn, Assessing stability-indicating methods for coelution by two-dimensional liquid chromatography with mass spectrometric detection: liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3214–3225.
74. M. Enquist, J. Hermansson, Comparison between two methods for the determination of the total and free (R)- and (S)-disopyramide in plasma using an  $\alpha_1$ -acid glycoprotein column, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 494 (1989) 143–156.
75. J. Iredale, I. W. Wainer, Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 573 (1992) 253–258.
76. A. L. Huidobro, P. Pruijm, P. Schoenmakers, C. Barbas, Ultra rapid liquid chromatography as second dimension in a comprehensive two-dimensional method for the screening of pharmaceutical samples in stability and stress studies, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 182–190.
77. M. Iguiniz, F. Rouvière, E. Corbel, N. Roques, S. Heinisch, Comprehensive two dimensional liquid chromatography as analytical strategy for pharmaceutical analysis, *J. Chromatogr. A* 9 (2018) 195–204.
78. K. Zhang, M. Tsang, N. P. Chetwyn, Analysis of pharmaceutical impurities using multi-heartcutting 2D LC coupled with UV-charged aerosol MS detection, *J. Sep. Sci.* 36 (2013), 2986–2992.
79. J. Siji, Heart-cut 2D-LC/MS approach for pharmaceutical impurity identification using an Agilent 6540 Q-TOF LC/MS System, Agil. Note, 2013
80. J. Pól, T. Hyötyläinen, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 391(2008) 21–31.
81. T. A. Berger, Separation of polar solutes by packed column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 785 (1997) 3–33.
82. Theory of HPLC, Supercritical Fluid Chromatography, Chromacademy, Crawford Scientific, 2008, str. 1–32.
83. E. Klesper, A. H. Corwin, D. A. Turner, High pressure gas chromatography above critical temperatures, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 700–701.
84. M. Novotny, S. R. Springston, P. A. Peadar, J. C. Fjeldsted, M. L. Lee, Capillary supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 53(1981)407A–414A.

85. P. A. Peadar, J. C. Fjeldsted, M. L. Lee, S. R. Springston, M. Novotny, Instrumental aspects of capillary supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 54 (1982) 1090–1093.
86. S. R. Springston, M. Novotny, Kinetic optimization of capillary supercritical fluid chromatography using carbon dioxide as the mobile phase, *Chromatographia* 14 (1981) 679–684.
87. P. A. Peadar, M. L. Lee, Theoretical treatment of resolving power in open tubular column supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 259 (1983) 1–16.
88. W. P. Jackson, K. E. Markides, M. L. Lee, Supercritical fluid injection of high-molecular-weight polycyclic-aromatic-compounds in capillary supercritical fluid chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.* 9 (1986) 213–217.
89. A. Huetz, E. Klesper, Efficiency in supercritical fluid chromatography as a function of linear velocity, pressure/density, temperature and diffusion coefficient employing *n*-pentane as the eluent, *J. Chromatogr. A* 607 (1992) 79–89.
90. H. H. Lauer, D. McManigill, R. D. Board, Mobile-phase transport properties of liquefied gases in near critical and supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 55 (1983) 1370–1375.
91. L. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillarme Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 $\mu$ m particles: A tutorial, *Anal. Chim. Acta*, 824 (2014) 18–35.
92. P. R. Eckard, L. T. Taylor, G. C. Slack, Method development for the separation of phospholipids by subcritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 241–247.
93. R. W. Stringham, B. R. Krueger, J. Marshall, Use of elevated flow rates in preparative subcritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 112–116.
94. H. Fischer, O. Gyllenhaal, J. Vessman, K. Albert, Reaction of aliphatic amines in supercritical carbon dioxide by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and implications for supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.* 75 (2003) 622–626.
95. L. S. Dainetree, A. Koridowski, P. York, Separation processes for organic molecules using SFC technologies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 351–372.
96. M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibanez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae, *Food Chem.* 98 (2006) 136–148.
97. L. T. Taylor, Supercritical fluid chromatography for 21st century, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2009) 566–573.

98. T.Bamba,J. W.Lee, Metabolic profiling of lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*1250(2012)212–219.
99. Ch.Jiang,Q.Ren,P.Wu, Study on retention factor and resolution of tocopherols by supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A*1005(2003)155–164.
100. K.Taguchi,E.Fukusaki,T.Bamba, Simultaneous analysis for water- and fat-soluble vitamins by a novel single chromatography technique unifying supercritical fluid chromatography and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*1362(2014) 270–277.
101. M.Hanson, Selectivity changes towards steroids in packed column supercritical fluid chromatography (SFC) induced by temperature and pressure variations, *J. Chromatogr. A*39 (1994) 431–437.
102. L.Nováková,P.Chocholouš,P.Solich, Ultra-fast separation of steroids using subcritical fluid chromatography on sub-2-micron particles, *Talanta*121(2014) 178–186.
103. A.Périat,A.Grand-Guillaume Perrenoud,D.Guillarme, Evaluation of various chromatographic approaches for the retention of hydrophilic compounds and MS compatibility, *J. Sep. Sci.*36(2013) 3141–3151.
104. R. McClain, M. Przybyciel, R. E. Majors, A systematic study of achiral stationary phases using analytes selected with a molecular diversity model, *J. Chromatogr. A*1218(2011) 894–906.
105. L. T.Taylor, Packed column supercritical fluid chromatography of hydrophilic analytes via water-rich modifiers, *J. Chromatogr. A*1250(2012) 196–204.
106. V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Nováková, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 56–71.
107. Z.Wang,O.Liu,B.Donovan, The path forward for SFC in the drug development environment – An industrial perspective, *Am. Pharm. Rev.*12(2009) 94–99.
108. T. A. Berger, Minimizing ultraviolet noise due to mis-matches between detector flow cell and post column mobile phase temperature in supercritical fluid chromatography: Effect of cell design, *J. Chromatogr. A*1364(2014) 249–260.
109. T. A.Berger,B. K.Berger, Minimizing UV noise in supercritical fluid chromatography. I. Improving back pressure regulator, *J. Chromatogr. A*1218(2011) 2320–2326.
110. A. J.Alexander,L.Zhang,T. F.Hooker,F. P.Tomasella, Comparison of supercritical fluid chromatography and reverse phase liquid chromatography for the impurity profiling of the antiretroviral drugs lamivudine/BMS-98001/efavirenz in a combination tablet, *J. Pharm. Biomed. Anal.*78–79(2013) 243–251.

111. A. J. Alexander, T. F. Hooker, F. P. Tomasella, Evaluation of mobile phase gradient supercritical fluid chromatography for impurity profiling of pharmaceutical compounds, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70(2012) 77–86.
112. L. Nováková, P. Chocholouš, P. Solich, Ultra-fast separation of steroids using subcritical fluid chromatography on sub-2-micron particles, *Talanta* 121 (2014) 178–186.
113. A. Dispas, P. Lebrun, E. Ziemons, R. Marini, E. Rozet, P. Hubert, Evaluation of the quantitative performances of supercritical fluid chromatography: From method development to validation, *J. Chromatogr. A* 1353(2014) 78–88.
114. Z. Wang, H. Zhang, O. Liu, B. Donovan, Development of an orthogonal method for mometasone furoate impurity analysis using supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218(2011) 2311–2319.
115. J. V. Iribarne, B. A. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.* 64 (1974) 2287–2294.
116. C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, Electrospray interface or liquid chromatographs and mass spectrometers, *Anal. Chem.* 57 (1985) 675–679.
117. R. P. W. Scott, C. G. Scott, M. Munroe, J. Hess, Interface for on-line liquid chromatography-mass spectroscopy analysis, *J. Chromatogr. A* 99 (1974) 395–405.
118. M. D'Hondt, B. Gevaert, E. Wynendaele, B. De Spiegeleer, Implementation of a single quad MS detector in routine QC analysis of peptide drugs, *J. Pharm. Anal.* 2016 Feb; 6(1): 24–31.
119. P. Novak, T. Jednačák, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama. TIVA Tiskara, Varaždin, 2014, str. 78–89.*
120. E. de Hoffmann, V. Stroonant, *Mass spectrometry, principles and applications. John Wiley & Sons. Inc., Chichester, 2007.*
121. G. Siuzdak, *An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology. 2. izdanje, MCC Press, San Diego, 2005.*
122. M. Kristina Parr, B. Wüst, J. Teubel, J. F. Joseph, Splitless hyphenation of SFC with MS by APCI, APPI, and ESI exemplified by steroids as model compounds, *J. Chromatogr. B*, 109 (2018) 67–78.
123. N. Galić, *Elektroraspršenje – ionizacija u masenoj spektrometriji, Kem. Ind.* 53 (2004) 117–123.

124. J. Faktor, M. Dvorakova, J. Maryas, P. Bouchal, Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies, *Klin. Onkol.* 25 (2012) 2S70–2S77.
125. Pat S, Adams F, Innfante HG, Lemiere F. *LC-GC* 2001;12:24.
126. ICH Harmonised tripartite guideline, Pharmaceutical development Q8 (R2), 2009.
127. N. Racz, R. Kormany, J. Feket, I. Molnar, Establishing column batch repeatability according to Quality by Design (QbD) principles using modeling software, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 108 (2015) 1–10.
128. R. Kormany, I. Molnar, H.J. Rieger, Exploring better column selectivity choices in ultra-high performance liquid chromatography using Quality by Design principles, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 80 (2013) 79–88.
129. R. Kormany, H. J. Rieger, I. Molnar, Application of quality by design principles to a pharmaceutical sample using UHPLC method development with modeling technologies, *LCGC* 31 (2013) 20–27.
130. R. M. Krisko, K. McLaughlinb, M. J. Koenigbauer, C. E. Lunte, Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development, *J. Chromatogr. A.* 1122 (2006) 186–93.
131. I. Molnár, Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: Development of DryLab software, *J. Chromatogr. A.* 965 (2002) 175–194.
132. C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic interactions in liquidchromatography with nonpolar stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 125 (1976) 129–156.
133. J. Terzić, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, Aspekti primene DryLab® softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda, *Arh. farm.* 64 (2014) 205–219.
134. P. Nikitas, A. Papa-Louisi, Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *J Chromatogr A.* 1216 (2009) 1737–1755.
135. A. H. Schmidt, I. Molnár, Using an innovative Quality-by-Design approach for development of a stability indicating UPLC method for ebastine in the API and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 78–79 (2013) 65–74.
136. ICH Harmonised tripartite guideline, Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B, 2006.
137. ICH Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures Q2(R1), 2005.



138. J. Vessman, R. I. Stefan, J. F. van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D. Thorburn Burns, A. Fajgelj, H. Müller, Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001), *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1381–1386.
139. <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat053020tpr1.pdf> (pristup 29.08.2018)
140. R. D. Bach, M.-D. Su, H. B. Schlegel, Oxidation of amines and sulfides with hydrogen peroxide and alkyl hydrogen peroxide. The nature of the oxygen-transfer step, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 5379–5391.
141. K. Ramakumar, J. A. Tunge, Synthesis of *N*-aryl-1-aminoindoles via intermolecular redox amination, *Chem. Commun.* 50 (2014) 13056–13058.
142. D. Chavez, L. Hill, M. Hiskey, S. Kinkead, Preparation and explosive properties of azo- and azoxy-furazans, *J. Energy Mater.* 18 (2000) 219–236.
143. F. A. Harraz, S. E. El-Hout, H. M. Killa, I. A. Ibrahim, Catalytic hydrogenation of crotonaldehyde and oxidation of benzene over active and recyclable palladium nanoparticles stabilized by polyethylene glycol, *J. Mol. Catal. A: Chem.* 370 (2013) 182–188.
144. A. G. Kong, H. W. Wang, X. Yang, Y. W. Hou, Y. K. Shan, A facile direct route to synthesize large-pore mesoporous silica incorporating high CuO loading with special catalytic property, *Microporous Mesoporous Mater.* 118 (2009) 348–353.
145. L. M. de la Puente, S.-Y. P. Lopez, J. Burnett, Supercritical fluid chromatography in research laboratories: Design, development and implementation of an efficient generic screening for exploiting this technique in the achiral environment, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8551–8560.
146. A. Périat, A. Grand-Guillaume Perrenoud, D. Guillaume Evaluation of various chromatographic approaches for the retention of hydrophilic compounds and MS compatibility, *J. Sep. Sci.* 36 (2013), 3141–3151.
147. C. Brunelli, Y. Zhao, M.-H. Brown, P. Sandra, Development of a supercritical fluid chromatography high-resolution separation method suitable for pharmaceuticals using cyanopropyl silica, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 263–272.

## 7. PRILOZI

**Tablica P1.** Parametri prvog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer pH 3,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	4,00	40	60
	6,00	40	60
	6,01	70	30
	9,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

**Tablica P2.** Parametri drugog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer pH 3,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	4,00	40	60
	6,00	40	60
	6,01	70	30
	9,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	70 °C		

**Tablica P3.** Parametri trećeg eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer pH 3,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	7,00	40	60
	9,00	40	60
	9,01	70	30
	12,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

**Tablica P4.** Parametri četvrtog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer pH 3,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	7,00	40	60
	9,00	40	60
	9,01	70	30
	12,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	70 °C		

**Tablica P5.** Parametri petog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer pH 6,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	4,00	40	60
	6,00	40	60
	6,01	70	30
	9,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

**Tablica P6.** Parametri šestog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer pH 6,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	4,00	40	60
	6,00	40	60
	6,01	70	30
	9,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	70 °C		

**Tablica P7.** Parametri sedmog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 x 2,1 mm; 1,7 <math>\mu</math>m</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer pH 6,0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	7,00	40	60
	9,00	40	60
	9,01	70	30
	12,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu$ L		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

**Tablica P8.** Parametri osmog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 x 2,1 mm; 1,7 <math>\mu</math>m</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer, pH 6.0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	7,00	40	60
	9,00	40	60
	9,01	70	30
	12,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu$ L		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	70 °C		

**Tablica P9.** Parametri devetog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer, pH 9.0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	4,00	40	60
	6,00	40	60
	6,01	70	30
	9,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

**Tablica P10.** Parametri desetog eksperimenta za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer, pH 9.0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	4,00	40	60
	6,00	40	60
	6,01	70	30
	9,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	70 °C		

**Tablica P11.** Parametri jedanaestog eksperimenta za UHPLC

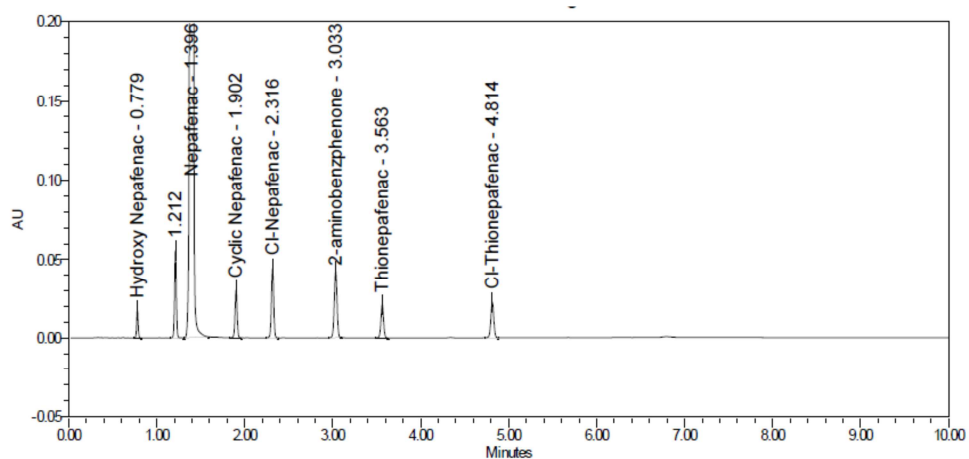
<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100× 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer, pH 9.0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	7,00	40	60
	9,00	40	60
	9,01	70	30
	12,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

**Tablica P12.** Parametri dvanaestog eksperimenta za UHPLC

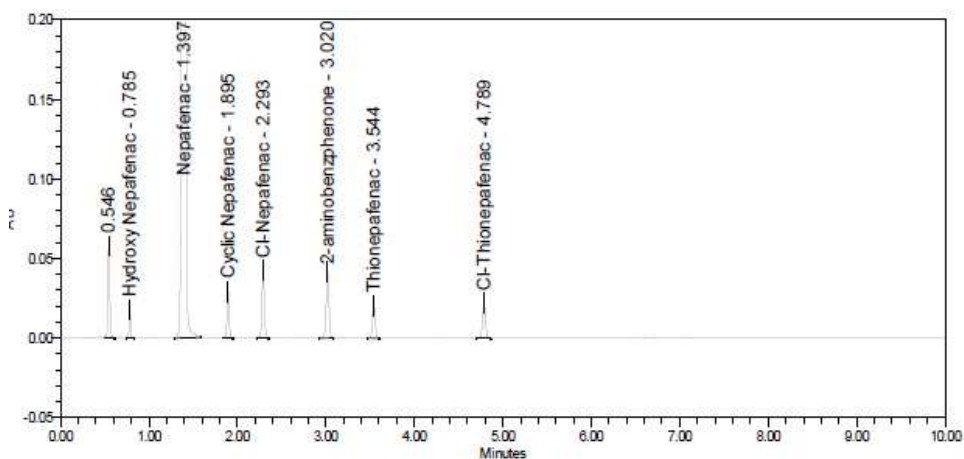
<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity BEH C18; 100 × 2,1 mm; 1,7 μm</b>		
<b>Eluens A</b>	fosfatni pufer, pH 9.0		
<b>Eluens B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	70	30
	7,00	40	60
	9,00	40	60
	9,01	70	30
	12,00	70	30
<b>Vrijeme stabilizacije</b>	3,00 min		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 μL		
<b>Protok</b>	0,6 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Detektor</b>	DAD, 235 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	70 °C		

**Tablica. P13** Usporedba modelom proračunatih i eksperimentalnih podataka pri  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t_G=6,5\text{ min}$

Komponenta	$t_R$ (eksperiment)	$t_R$ (model)	odstupanje(%)
Hidroksi-nepafenak	0,779	0,82	5,2
Nepafenak	1,396	1,42	1,7
Ciklički-nepafenak	1,902	1,99	4,6
Cl-nepafenak	2,316	2,43	4,9
2-aminobenzofenon	3,033	3,08	1,5
Tionepafenak	3,563	3,83	7,4
Cl-tionepafenak	4,814	4,20	2,2

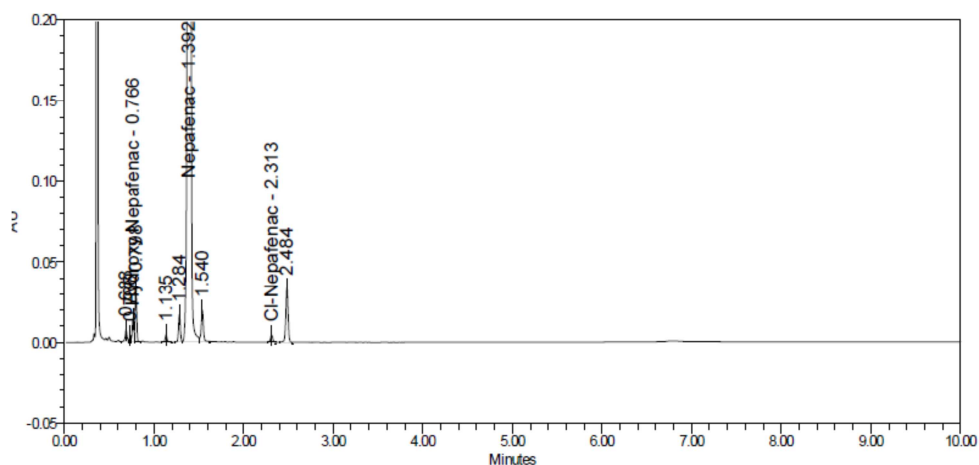


**Slika P1.** Kromatogram nepafenaka s onečišćenjima pri pH 6

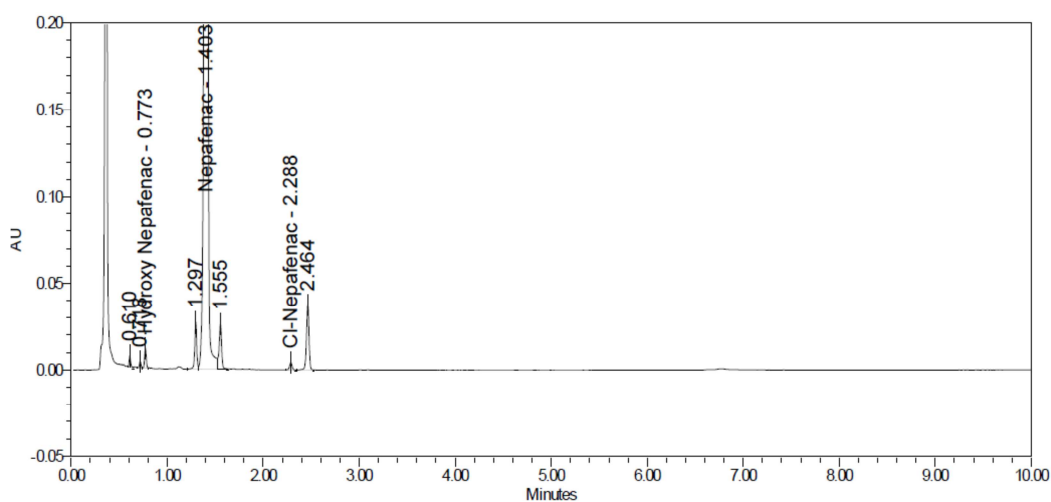


**Slika P2.** Kromatogram nepafenaka s onečišćenjima pri pH 9

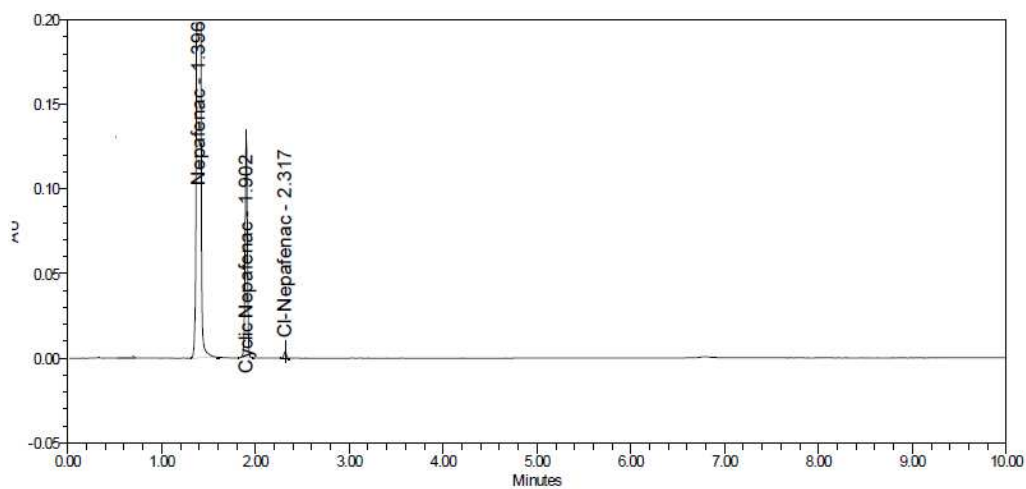




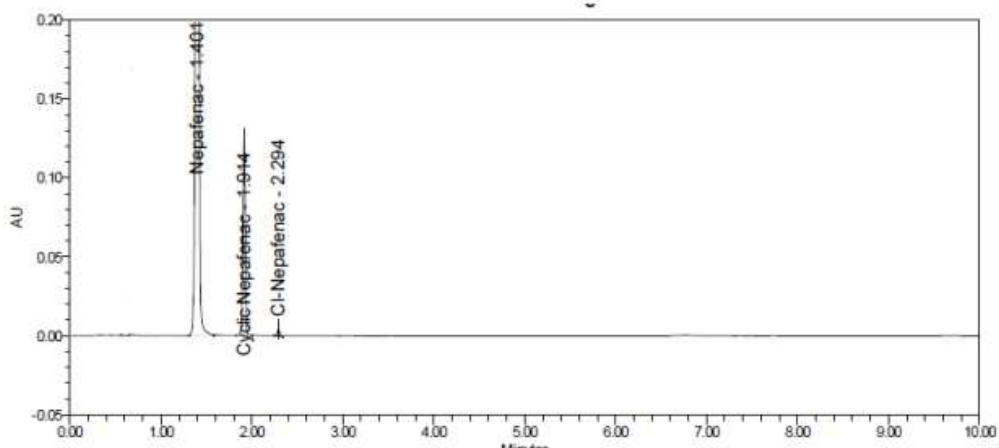
**Slika P3.** Kromatogram nepafenaka razgrađenog vodikovim peroksidom pri pH 6



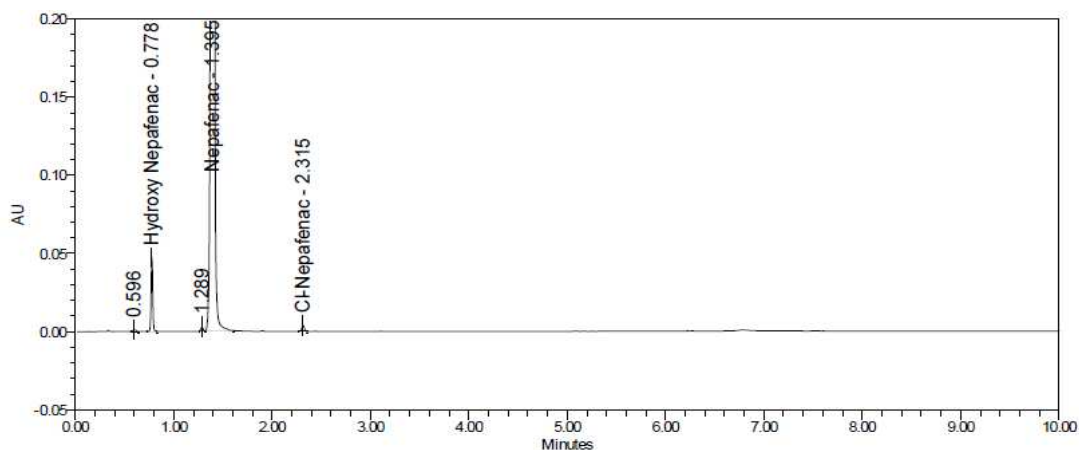
**Slika P4.** Kromatogram nepafenaka razgrađenog vodikovim peroksidom pri pH 9



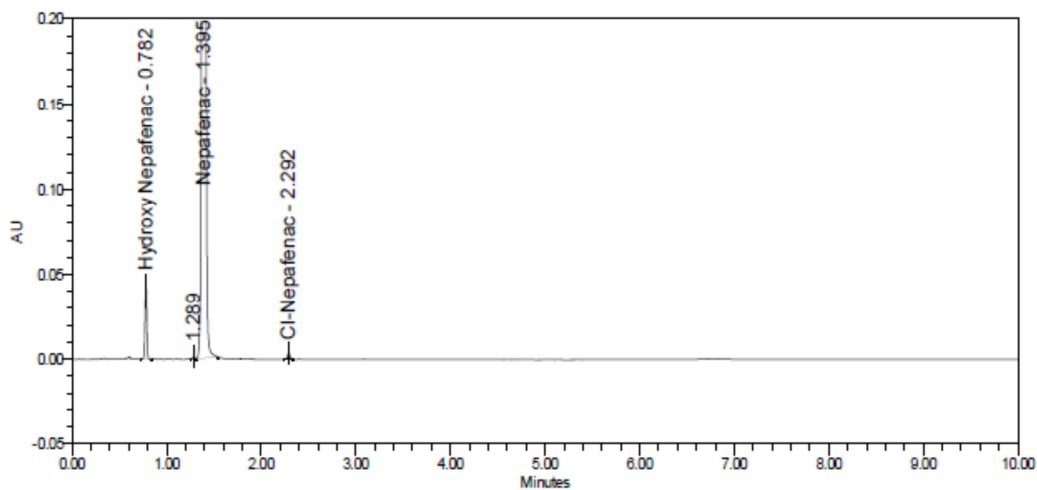
**Slika P5.** Kromatogram nepafenaka razgrađenog klorovodičnom kiselinom na pH 6



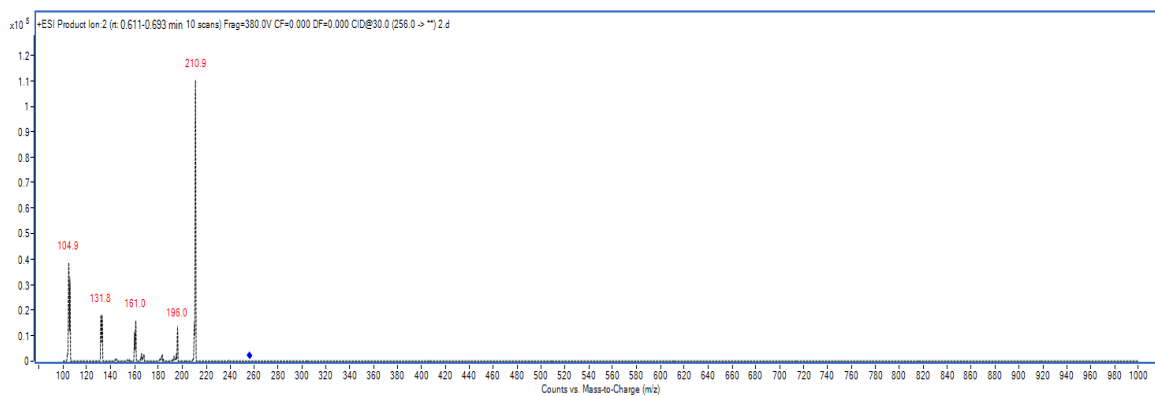
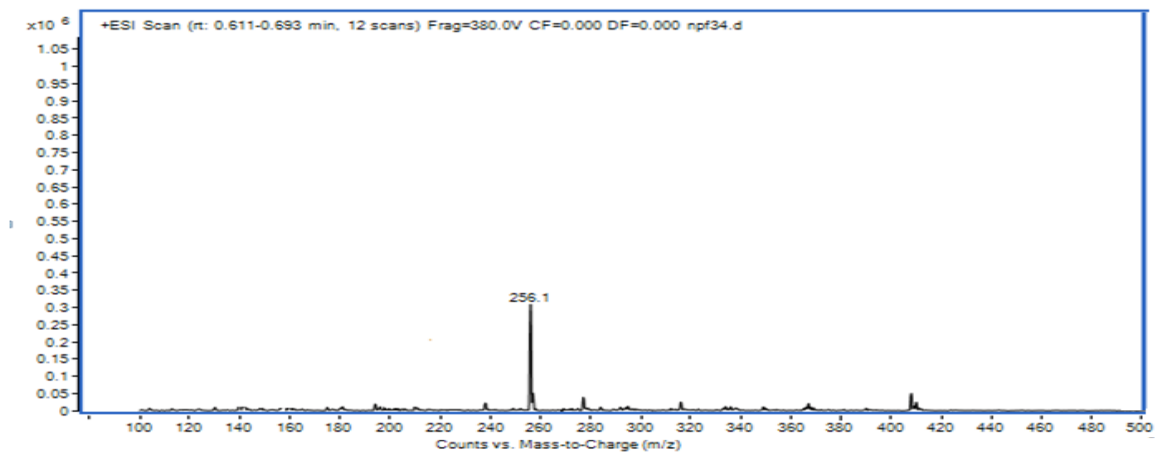
**Slika P6.** Kromatogram nepafenaka razgrađenog klorovodičnom kiselinom pri pH 9



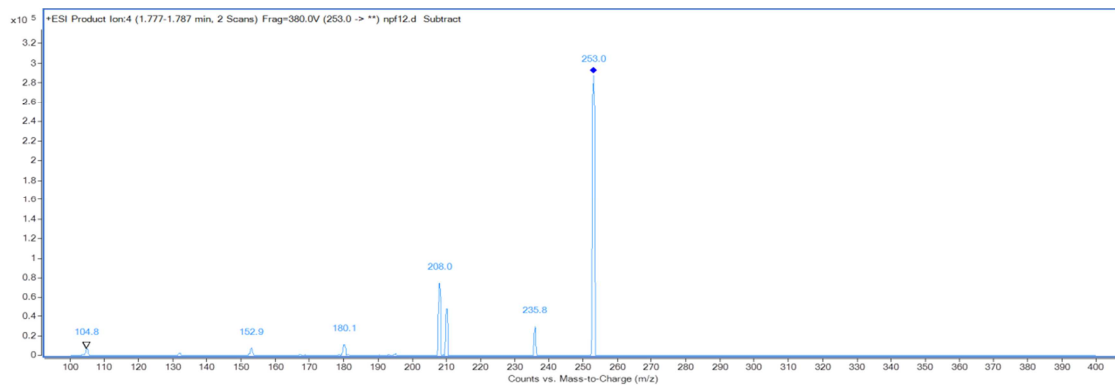
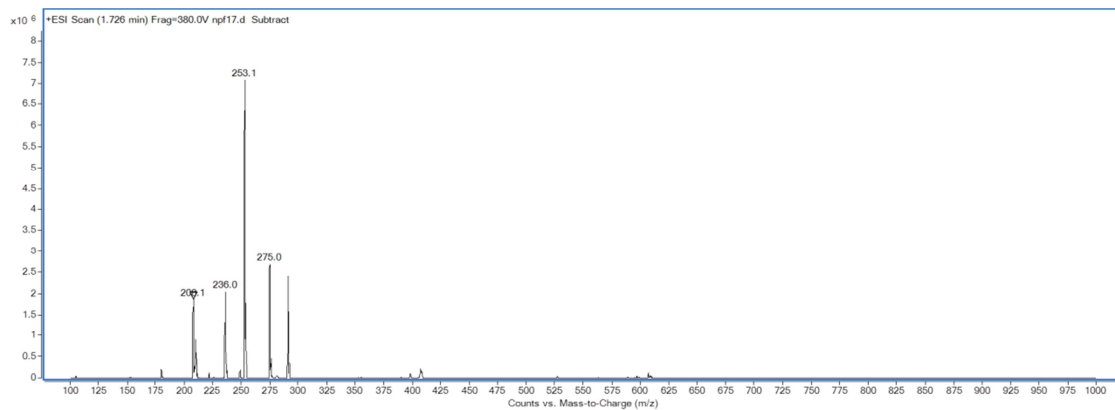
**Slika P7.** Kromatogram nepafenaka razgrađenog natrijevom lužinom pri pH 6



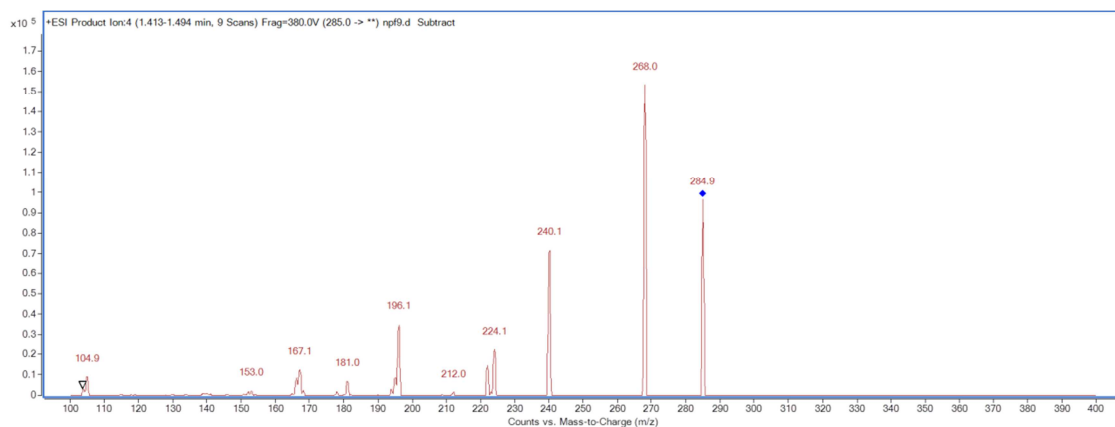
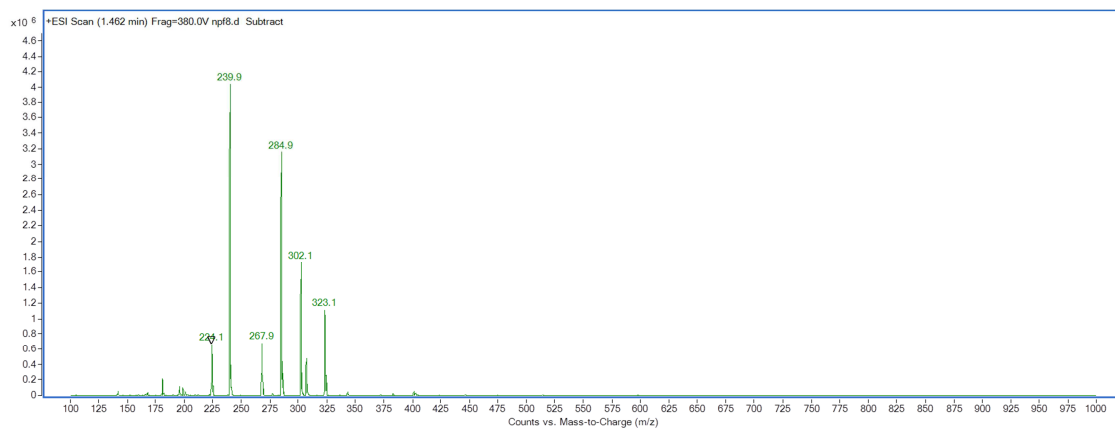
**Slika P8.** Kromatogram nepafenaka razgrađenog natrijevom lužinom pri pH 9



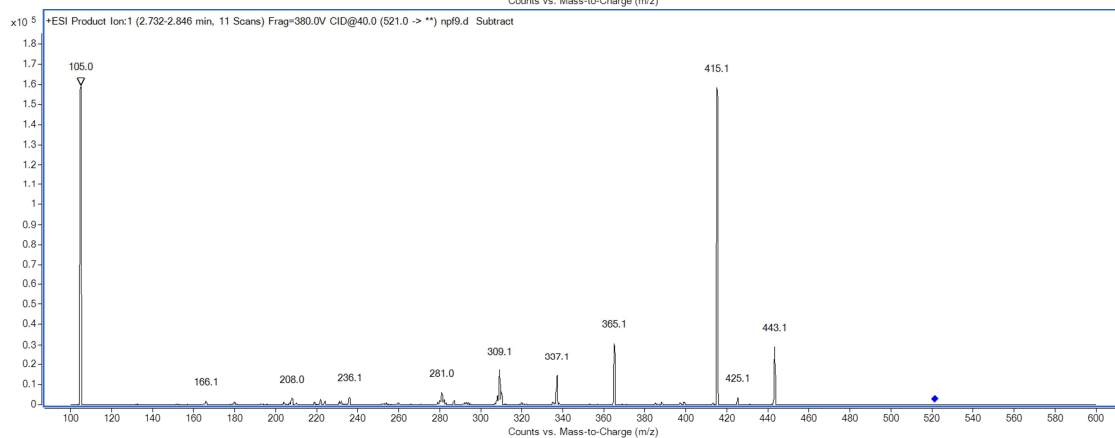
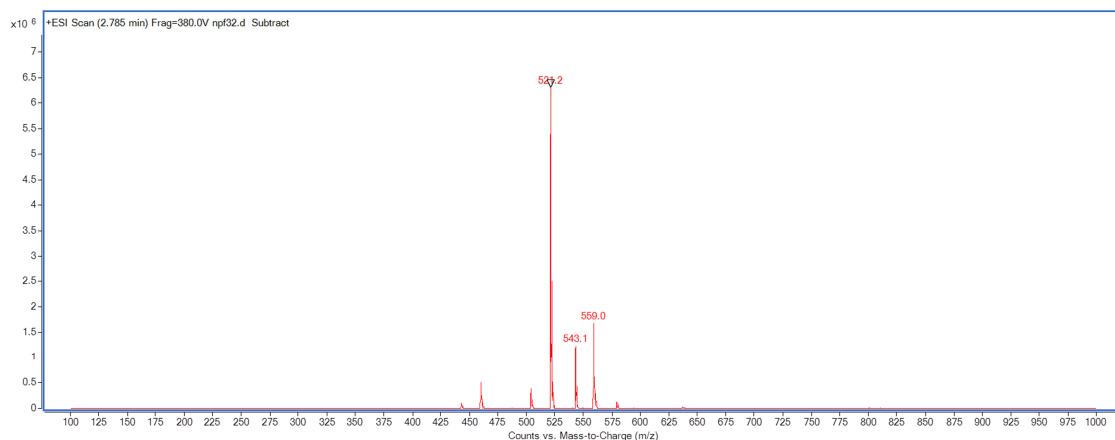
**Slika P9.** MS i MS/MS spektar DP-1 ( $m/z$  256)



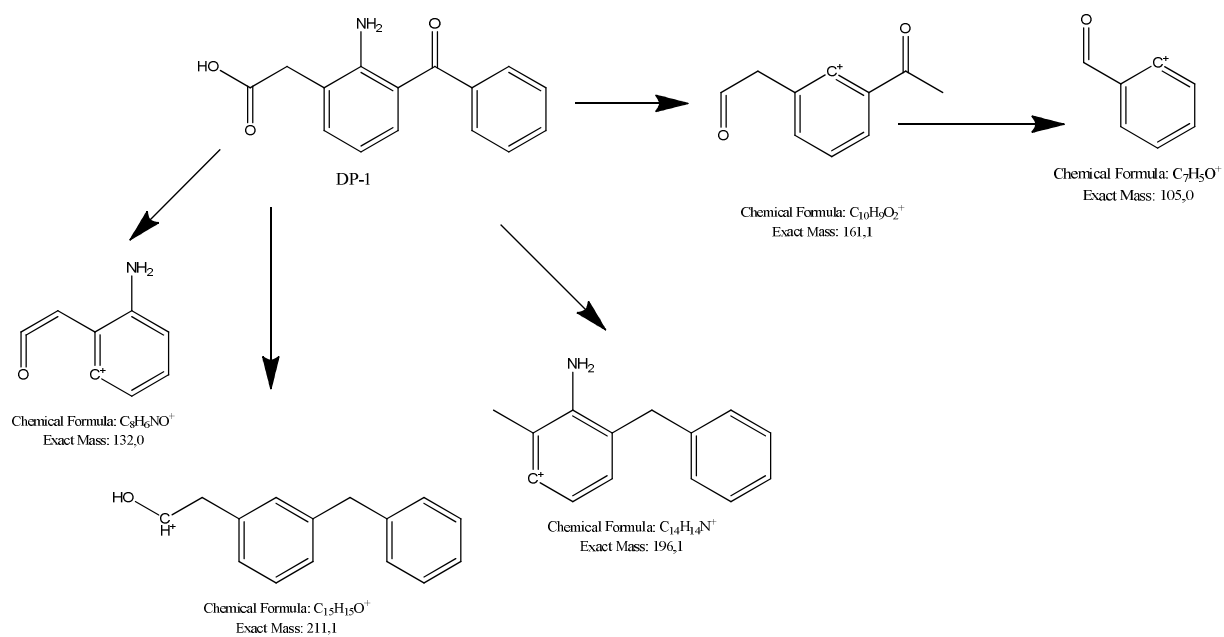
**Slika P10.** MS i MS/MS spektar DP -2 ( $m/z$  253)



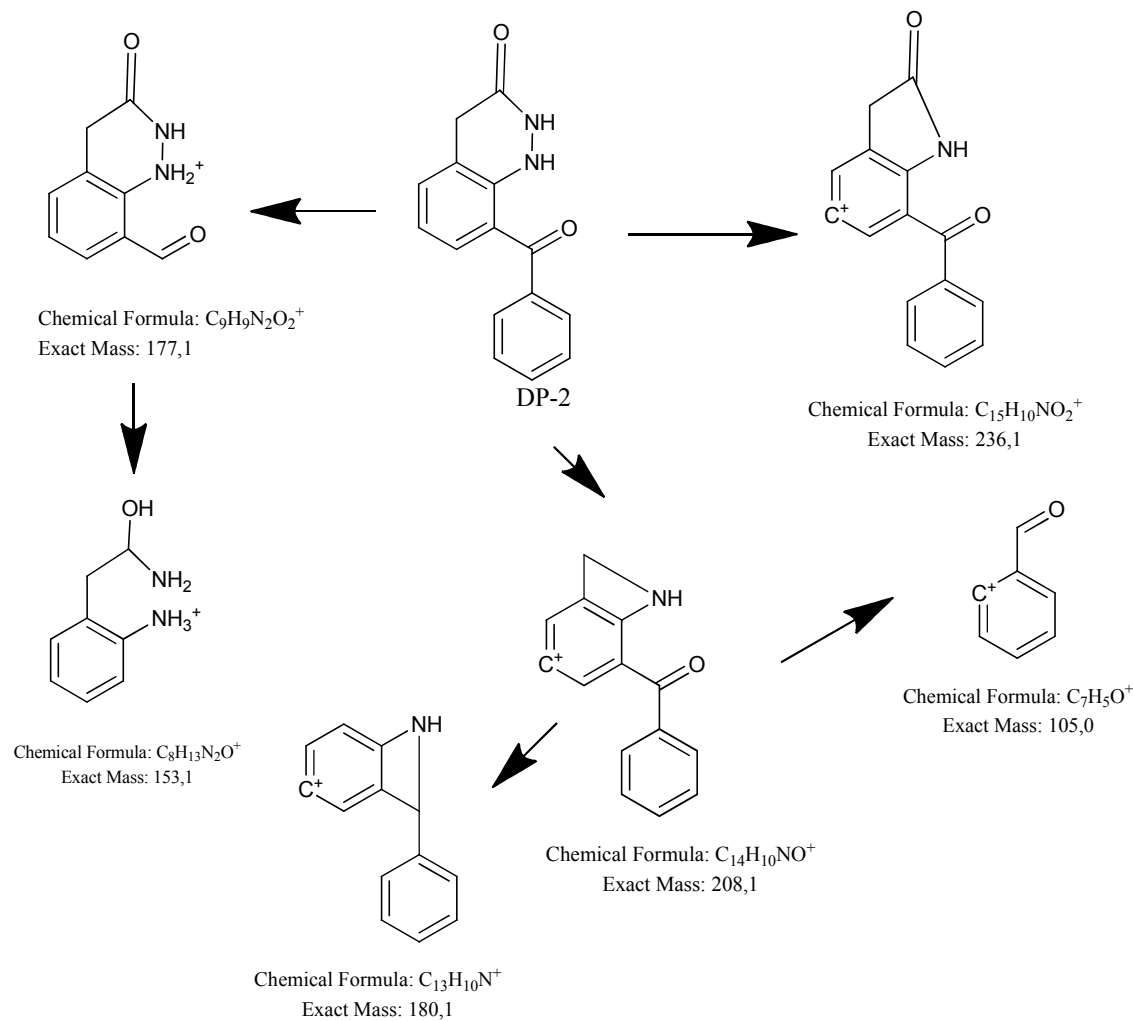
**Slika P11. MS i MS/MS spektar DP-3 ( $m/z$  285)**



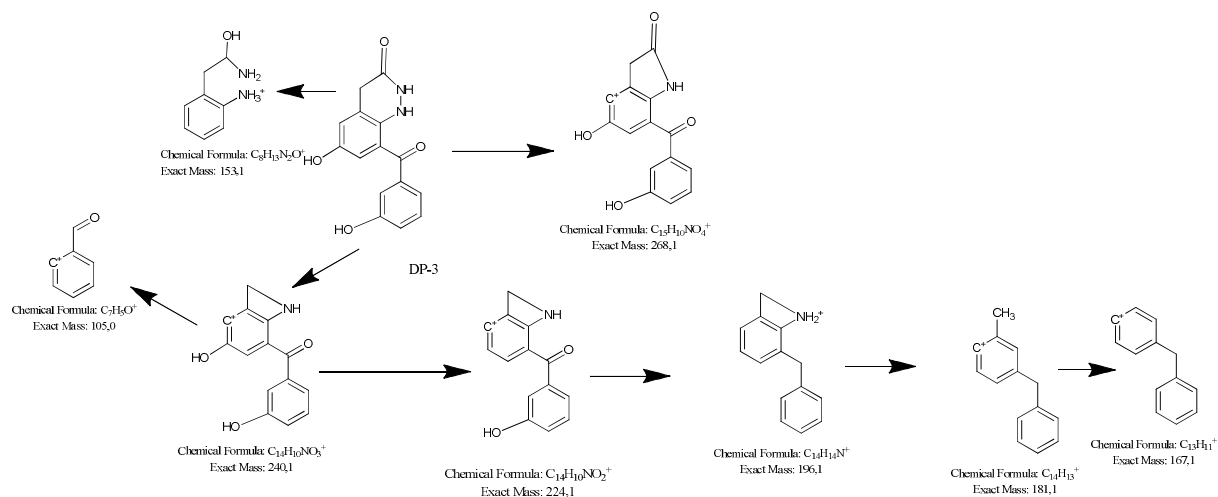
**Slika P12. MS i MS/MS spektar DP-4 ( $m/z$  521)**



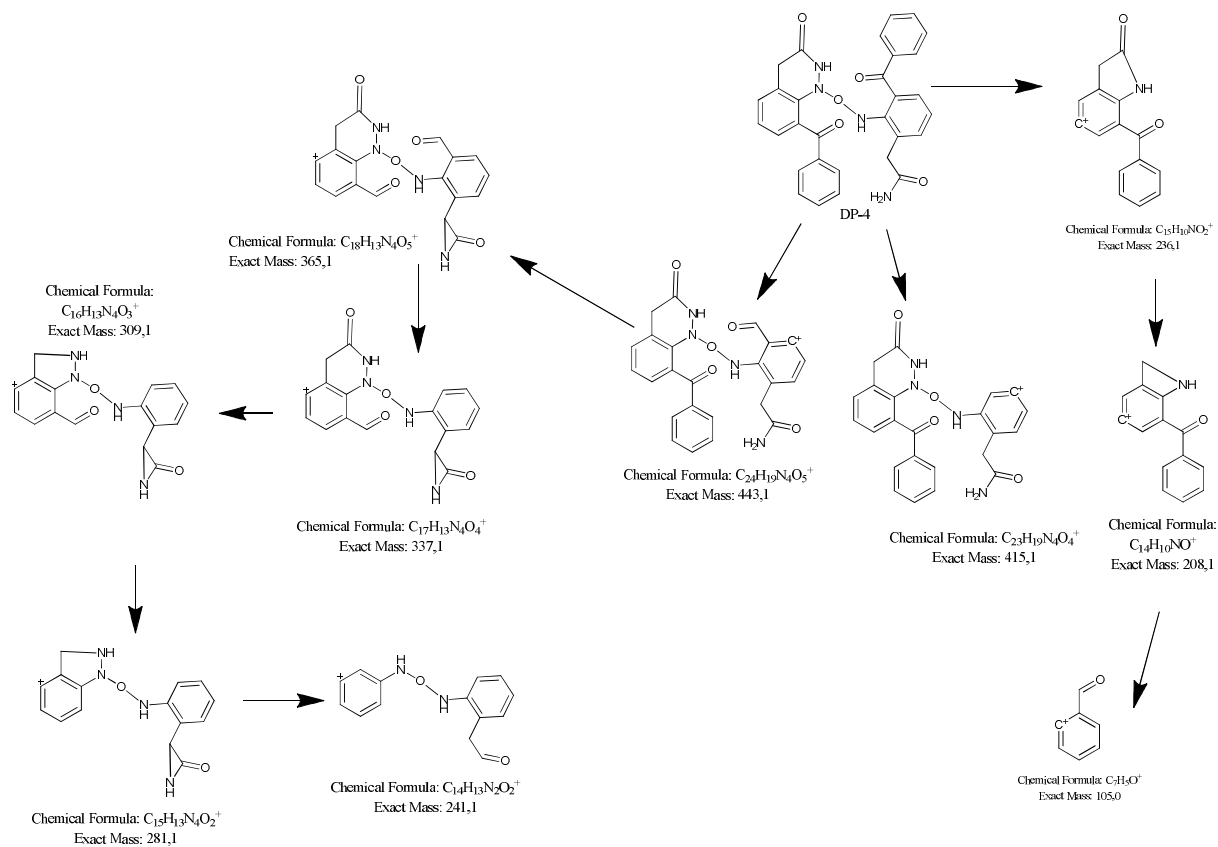
**Slika P13.** Predloženi put fragmentacije za DP-1



**Slika P14.** Predloženi put fragmentacije za DP-2



Slika P15. Predloženi put fragmentacije za DP-3



Slika P16. Predloženi put fragmentacije za DP-4

## ŽIVOTOPIS

Mislav Runje, [REDACTED] Osnovnu i srednju školu završio je u Zagrebu, a 1999. upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2004. stekao je zvanje diplomiranog kemijskog inženjera izradivši diplomski rad naziva „Viskoelastična i mehanička svojstva termoplastičnog poliuretana, polipropilena i njihovih mješavina“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Emi Govorčin Bajsić. Godine 2005. zapošljava se u Pliva - Istraživanje i razvoj u laboratoriju za tekućinsku kromatografiju, gdje od 2007. radi u odjelu API Analitika. 2009. godine upisuje Poslijediplomski studij Inženjerska kemija pod vodstvom prof.dr.sc. Sandre Babić. Rezultate svojih dosadašnjih istraživanja prikazao je u četiri znanstvena rada objavljena u časopisima citiranim u bazi *Current Contents* (CC). Aktivno je sudjelovao na pet međunarodnih znanstvenih skupova s posterskim priopćenjima. Govori engleski i njemački jezik te posjeduje vozačku dozvolu B kategorije.

## POPIS ZNANSTVENIH RADOVA OBJAVLJENIH U BAZI *Current Contents*

1. I.Ružić, M.Škerget, Ž. Knez, M.Runje, Phenolic content and antioxidant potential of macerated white wines. *Eur Food Res Technol* 233(2011) 465-472.
2. T,Skuhala,V.Trkulja,M.Runje,D.Vukelić, B Desnica, Albendazolesulphoxide concentrations in plasma and hydatid cyst and prediction of parasitological and clinical outcomes in patients with liver hydatidosis caused by *Echinococcus granulosus*, *Croat Med J.* 55(2) (2014) 146–155.
3. M.Runje, S.Babić, E.Meštrović, I.Nekola.,Ž. Dujmić-Vučinić , N.Vojčić , Forced degradation of nepafenac: Development and validation of stability indicating UHPLC method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 123 (2016) 42–52.
4. D.Mutavdžić Pavlović, A. Glavač, M.Gluhak, M.Runje,Sorption of albendazole in sediments and soils: isotherms and kinetics , *Chemosphere*, 193 (2018) 635-644.