

Prisilna razgradnja sofosbuvira i oseltamivira

Tomić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:509600>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Filip Tomić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Filip Tomić

PRISILNA RAZGRADNJA OSELTAMIVIRA I SOFOSBUVIRA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Matija Cvetnić

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Matija Cvetnić

prof. dr. sc. Šime Ukić

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, rujan 2023.

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

Prvenstveno, zahvaljujem se svojem mentoru, doc. dr. sc. Matiji Cvetniću na vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem asistentici Viktoriji Martinjak, mag. ing. cheming., na korisnim savjetima, iskustvima i pruženoj pomoći tijekom izrade i provedbe rada.

Naposljetku, zahvaljujem se svojoj Ireni te svojoj obitelji na podršci i pomoći tijekom svakog trenutka studija i bez kojih ne bih bio ovdje gdje jesam.

Sažetak

Kroz posljednjih nekoliko desetljeća u području istraživanja i zaštite okoliša sve više pozornosti se pridaje takozvanim "novim onečišćujućim tvarima". Pojam "nove onečišćujuće tvari" obuhvaća sve one spojeve i tvari kojima se do nedavno nije pridavalo značenje kao ksenobioticima, a danas se sve više ispuštaju u okoliš u značajnijim količinama koje predstavljaju opasnost za okoliš. Jednu od najvažnijih skupina predstavljaju farmaceutici i sredstva za osobnu higijenu i njegu zbog toga što sadrže veliki broj različitih kemijskih spojeva koji imaju različit utjecaj na okoliš u koji se ispuštaju.

U ovom radu ispitano je ponašanje i stabilnost dvaju farmaceutika, 0,1 mM otopina sofosbuvira i oseltamivira provođenjem testova prisilne razgradnje: a) lužnate hidrolize u prisutnosti 1,0 M otopine NaOH na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata, b) kisele hidrolize u prisutnosti 1,0 M otopine HCl na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata, c) oksidacije u prisutnosti 30%-tne otopine H₂O₂ pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata, d) termičke razgradnje (neutralne hidrolize) pri sobnoj temperaturi, 30 i 40 °C tijekom 168 sati (7 dana) i e) fotolitičke razgradnje djelovanjem UV svjetlosti jačine 600 W/m² pri 25 °C tijekom 6 sati. Analize svih izuzetih uzoraka provodile su se na HPLC-u gdje su za oba farmaceutika prethodno razvijene i validirane metode određivanja.

Na temelju dobivenih rezultata validacije, obje metode zadovoljavaju zahtjeve prema svim parametrima: linearnost s koeficijentom determinacije većim od 0,99, točnost s vrijednostima analitičkog povrata između 70 i 130% te preciznost s *RSD* vrijednostima manjima od 10%. S obzirom na ispitivanja prisilne razgradnje može se zaključiti da su sofosbuvir i oseltamivir zadovoljavajuće i očekivane stabilnosti pri svim ispitanim uvjetima.

Ključne riječi: oseltamivir, sofosbuvir, prisilna razgradnja

Abstract

In recent decades, the so-called "new pollutants" have received increasing attention in the field of research and environmental protection. The term "new pollutants" includes all those compounds and substances that until recently were not considered xenobiotics and are now increasingly entering the environment in significant quantities and therefore posing a threat to the environment. One of the most important groups is pharmaceuticals and personal care products, as they contain a large number of different chemical compounds that have different effects on the environment into which they are released.

In this work, the behavior and stability of two drugs, 0.1 mM solutions of sofosbuvir and oseltamivir, were tested by forced degradation tests: a) alkaline hydrolysis in the presence of a 1.0 M NaOH solution at room temperature for a period of 24 h, b) acid hydrolysis in the presence of a 1.0 M HCl solution at room temperature over a 24-hour period, c) oxidation in the presence of a 30% H₂O₂ solution at room temperature over a 24-hour period, d) thermal decomposition (neutral hydrolysis) at room temperature, 30 °C, and 40 °C over 168 hours (7 days), and e) photolytic decomposition exposed to UV light at 600 W/m² at 25°C over a 6-hour period. Analyses of all excluded samples were performed by HPLC, and the determination methods for both drugs were previously developed and validated.

Based on the validation results obtained, both methods met the requirements for all parameters: Linearity with coefficient of determination higher than 0.99, Accuracy with analytical recoveries between 70 and 130%, and Precision with RSD values lower than 10%. Regarding the forced degradation tests, it can be concluded that sofosbuvir and oseltamivir showed satisfactory and expected stability under all tested conditions.

Key words: sofosbuvir, oseltamivir, forced degradation

Sadržaj

1	Uvod.....	1
2	Teorijski dio	2
2.1	Farmaceutici	2
2.2	Sudbina farmaceutika u okolišu	3
2.3	Antivirolici.....	4
2.3.1	Oseltamivir.....	5
2.3.2	Sofosbuvir	6
2.4	Prisilna razgradnja	8
2.5	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	10
2.6	Validacija HPLC metode.....	12
2.6.1	Linearnost	12
2.6.2	Točnost.....	13
2.6.3	Preciznost.....	13
2.6.4	GK i GD	13
3	Eksperimentalni dio	15
3.1	Kemikalije i reagensi	15
3.2	Popis analitičke opreme.....	15
3.3	Eksperimentalni dizajn	16
3.3.1	Validacija LC metoda za analizu oseltamivira i sofosbuvira.....	16
3.3.2	Prisilna razgradnja	16
3.3.2.1	Lužnata hidroliza.....	17
3.3.2.2	Kisela hidroliza	17
3.3.2.3	Oksidacija vodikovim peroksidom	17
3.3.2.4	Termička razgradnja.....	17
3.3.2.5	Fotolitička razgradnja.....	17
4	Rezultati i rasprava	18
4.1	Validacija LC metoda	18
4.1.1	Linearnost	18
4.1.2	Točnost.....	22
4.1.3	Preciznost.....	25
4.1.4	Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	26
4.2	Prisilna razgradnja	27
4.2.1	Lužnata hidroliza.....	27
4.2.2	Kisela hidroliza	27

4.2.3	Oksidacija vodikovim peroksidom	28
4.2.4	Termička razgradnja	28
4.2.5	Fotolitička razgradnja	29
4.2.6	Usporedba svih primijenjenih postupaka razgradnje	29
5	Zaključak.....	31
6	Literatura.....	32
	Životopis	35

1 Uvod

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća u području istraživanja i zaštite okoliša pozornost se sve više pridaje takozvanim "novim onečišćujućim tvarima", u odnosu na konvencionalne onečišćujuće tvari kao što su npr. policiklički aromatski ugljikovodici ili poliklorirani bifenili.[1] Pod pojmom "nove onečišćujuće tvari" misli se na tvari kojima se do nedavno nije pridavalo značenje kao ksenobioticima, a kontinuirano se ispuštaju u okoliš u sve većim količinama. Dodatno, njihov ispust u okoliš nije ograničen zakonskim regulativama te predstavljaju potencijalnu opasnost za okoliš. Jednu od najvažnijih skupina "novih onečišćujućih tvari" tvore farmaceutici i sredstva za osobnu higijenu jer sadrže veliki broj kemijskih spojeva koji imaju raznovrstan utjecaj na okoliš u koji su ispušteni.[2]

Farmaceutici se primarno koriste s ciljem tretiranja ili prevencije bolesti u humanoj i veterinarskoj medicini dok se proizvodi za osobnu higijenu upotrebljavaju radi poboljšanja kvalitete života te obuhvaćaju šampone, boje za kosu, dezodoranse, paste za zube, hidratantne kreme i slično.[2] Farmaceutici i velik broj kemijskih spojeva korištenih u proizvodima za higijenu su biološki aktivne komponente koje se uglavnom minimalno uklanjaju u postrojenjima za obradu otpadnih voda čime izravno ulaze u vodeni i zemljani okoliš. Prisutnost farmaceutika u podzemnim vodama može također biti uzrokovana i drugim izvorima kao što su procjedne vode s deponija ili proizvodni ostaci.[3]

Iako su u okolišu često prisutni u niskim koncentracijama, njihov kontinuiran unos može rezultirati akumulacijom te dugoročnim negativnim utjecajima na kopnene i vodene organizme. Također, zbog kontinuiranog porasta stanovništva povećavaju se i potrebe za vodom što posljedično uzrokuje sve veće onečišćenje vodenog sustava i veću prisutnost farmaceutika u okolišu i vodama općenito.[4,5] Dodatno, razgradni i transformacijski produkti farmaceutika često mogu biti toksičniji od početnih molekula te zbog promijenjene kemijske strukture mogu posjedovati drugačija fizikalno-kemijska svojstva (često pokazuju visoku toksičnost). Zbog toga je vrlo bitno detaljno ispitati fizikalna i kemijska svojstva raznih farmaceutika te njihove procese razgradnje i postojanost istih tokom razgradnje.[4,6]

2 Teorijski dio

2.1 Farmaceutici

Farmaceutici obuhvaćaju raznolike skupine spojeva različitih molekulskih masa i struktura. Upotrebu pronalaze u liječenju i sprječavanju bolesti ljudi i životinja te poboljšavanju kvalitete života. Primarne karakteristike su njihova biološka aktivnost, bioraspoloživost, lipofilnost i parcijalna topljivost u vodi. Dije se u tri glavne skupine: prirodni, polusintetski i sintetski.[4,6] Glavni sastojak svakog farmaceutskog lijeka je farmaceutski aktivna tvar (eng. *active pharmaceutical ingredient* – API). API-ji su čiste kemijske tvari ili mješavine tvari prirodnog ili sintetskog podrijetla koje imaju odgovarajuću farmakološku aktivnost. Svaki lijek uglavnom sadrži dvije osnovne komponente: API, koji je glavni no količinski manjinski sastojak te je kemijski i biološki aktivan u interakciji s organizmom, te pomoćne tvari/punila koje su kemijski neaktivne komponente dodane s ciljem postizanja određenog okusa, boje ili pak zbog povećanja volumena (npr. laktoza ili mineralno ulje). Također, pomoćne tvari pomažu u isporuci API-ja kroz organizam. Jedni od danas najpoznatijih API-ja na tržištu su: ibuprofen, acetilsalicilna kiselina, paracetamol, amoksicilin i drugi.[7] Prema nekim procjenama, na svjetskoj razini za humanu medicinu koristi se oko 4000 API-ja koji imaju različite terapijske primjene te njihova proizvodnja iznosi više od 100000 tona na godišnjoj razini.[8]

Kod farmaceutika uglavnom govorimo o organskim spojevima molekulske mase u rasponu od 200 do 500 Da koji su lipofilni i umjereno topljivi te su zbog toga biološki aktivni i bioraspoloživi. Pripadaju skupini mikrozagađivala pošto su u vodenoj sredini prisutni u mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama. Tokom njihove primjene, jedan dio lijeka u organizmu prolazi kroz različite metaboličke procese, pri čemu su nastali metaboliti često polarniji od početnog spoja. Zbog toga su topljivi u vodi te često toksičniji od polazne supstance.[9] Drugi dio lijeka prolazi kroz organizam nepromijenjen te dopijeva u otpadne vode u osnovnom obliku.

Jedna od negativnih posljedica upotrebe farmaceutika je njihova povećana prisutnost u okolišu, a njihova koncentracija u pojedinom dijelu ekosustava ovisi o biogeokemijskoj reaktivnosti. Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava oni se vežu na tlo i sediment ili pak podliježu biotičkim (biološka razgradnja bakterijama i gljivama) i abiotičkim (fotoliza ili hidroliza) procesima razgradnje.[5] Farmaceutici koji pokazuju tendenciju vezanja na krute matrice akumuliraju se u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u podzemne i površinske vode gdje su onda podložne daljnjoj biotičkoj transformaciji i razgradnji.[10]

Pod pojmom transformacije podrazumijeva se promjena strukture polazne molekule farmaceutika, pri čemu molekulska masa ostaje ista, dok procesom razgradnje dolazi do cijepanja polazne molekule i nastaju spojevi drugačije molekulske mase. Biološka razgradnja obuhvaća razgradnju farmaceutika pomoću gljiva i bakterija dok abiotički procesi razgradnje podrazumijevaju fotolizu i hidrolizu. Prilikom praćenja ponašanja i sudbine farmaceutika u okolišu važno je poznavanje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava poput: koeficijenta sorpcije na organski ugljik (K_{oc}), koeficijenta razdiobe (K_d), konstante ionizacije (K_k) te koeficijenta razdiobe oktanol/voda (K_{ov}). Upravo ta fizikalno-kemijska svojstva definiraju mogućnost sorpcije farmaceutika u tlo i sedimente te njihovu sklonost prema biotičkoj i abiotičkoj razgradnji.[5]

2.2 Sudbina farmaceutika u okolišu

Postoje tri glavna izvora preko kojih farmaceutici dolaze do izvora pitke vode: a)bolnički otpad b)otpadne vode farmaceutske industrije te c)nepravilno i nepropisno odlaganje neiskorištenih, zastarjelih i neželjenih lijekova. Ovi lijekovi se uglavnom otpuštaju nakon terapijske upotrebe putem ljudskih izlučevina. Također, efluenti s visokom koncentracijom farmaceutika koji se ispuštaju iz proizvodnih pogona predstavljaju opasnost za vodene sustave u blizini. U zadnje vrijeme postoji povećani interes za njihovo uklanjanje pošto su izrazito bioaktivni, a većina ih je otporna na konvencionalne metode razgradnje. Stoga predstavljaju potencijalni rizik od razvoja antivirusne otpornosti kod životinja i ljudi zbog kontinuiranog izlaganja tokom dužeg vremenskog razdoblja.[11]

Hidroliza je jedan od najvažnijih abiotičkih procesa razgradnje farmaceutika u prirodnim vodama, posebice za one farmaceutike koji su otporni na razgradnju djelovanjem mikroorganizama. Iako je ona jedan od najčešćih kemijskih procesa kojima su farmaceutici podvrgnuti u okolišu, postoji malo literaturnih podataka o njihovoj hidrolitičkoj stabilnosti odnosno nestabilnosti. S obzirom na to može se zaključiti da ispitivanja hidrolitičke stabilnosti farmaceutika mogu znatno doprinijeti procjeni njihove sudbine u okolišu.[12] Prema preporukama Uprave za hranu i lijekove i Europske agencije za medicinu laboratorijska ispitivanja korištena za utvrđivanje hidrolitičke stabilnosti farmaceutika u vodi provode se pri pH vrijednostima značajnim za okoliš; prema *Test Guideline 111* danom od strane Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Co-operation and Development* – OECD) pH vrijednosti bi trebale biti 4 do 9.[13]

Za farmaceutike koji pokazuju otpornost na biološku razgradnju i hidrolizu, fotolitička razgradnja vrlo je važan abiotički proces njihove razgradnje. Uglavnom se javlja u čistim površinskim vodama jer u zamućenim jezerima te rijekama ili vodama koja su u sjeni drveća, ili pak ako su spojevi prekriveni tлом ili sedimentom, zbog nedostatka sunčeve svjetlosti ne dolazi do razgradnje.[8] Brzina fotolitičke razgradnje prisutnog farmaceutika, osim što ovisi o različitim koncentracijama tvari prisutnih u prirodnim vodama, ovisi i o koncentraciji samog farmaceutika. Također, povećanje koncentracije prisutnog farmaceutika uzrokuje smanjenje brzine fotolitičke razgradnje. Farmaceutici su isto tako vrlo kompleksne molekule s različitim bazičnim i kiselim funkcijskim skupinama koje se pri određenoj pH vrijednosti ioniziraju. S obzirom na to da prirodne vode imaju različite pH vrijednosti, očekivano je da će to utjecati na fotolitičku razgradnju farmaceutika te je to i potvrđeno za neke farmaceutike.[14] Rezultat fotolitičke razgradnje farmaceutika mogu biti stabilniji produkti veće toksičnosti u odnosu na polaznu molekulu farmaceutika. U nekim slučajevima, čak i nakon potpune razgradnje polazne molekule farmaceutika, nastali razgradni produkti ostaju prisutni u otopini te zbog toga često imaju negativan učinak na okoliš. S obzirom na navedeno može se zaključiti da osim praćenja brzine fotolitičke razgradnje ključno je identificirati i utvrditi strukture nastalih razgradnih produkata.[5]

Većina znanstvenih istraživanja temeljena je na ispitivanju fotolitičke razgradnje pojedinačnih otopina farmaceutika, no to zapravo nije stvarna slika onoga što je prisutno u prirodi pošto se farmaceutici u prirodi nalaze u smjesama. Stoga je vrlo važno ispitati kako se oni ponašaju u smjesama kada su izloženi djelovanju sunčeva zračenju.[15]

2.3 Antiviroci

Antivirusni lijekovi odnosno antiviroci spadaju u skupinu lijekova korištenih za liječenje i tretiranje sustavnih ili lokalnih virusnih bolesti i infekcija. Primjenjuju se peroralno, parenteralno i lokalno. Spadaju u skupinu antimikrobnih lijekova koja još obuhvaća antifungalne lijekove (lijekove protiv gljivičnih infekcija), antiparazitike (lijekovi protiv bolesti uzrokovanih parazitima), antibiotike (lijekovi protiv bakterijskih infekcija) i antivirote na bazi monoklonskog tijela. Većina antivirusnih lijekova smatra se relativno bezopasnim za domaćina pa se stoga mogu koristiti za liječenje i tretiranje infekcija.[16] Struktura virusa relativno je jednostavna te se sastoji od: nukleinske kiseline, virusnog enzima, proteinskog omotača i ponekad lipidne ovojnice. Osim toga virusi koriste stanice domaćina za replikaciju stoga su

obvezni stanični patogeni. Upravo navedene karakteristike stvaraju poteškoće u razvoju lijekova sa selektivnom toksičnošću protiv određenog virusa i njegove aktivnosti.[16,17]

Antivirolici su nedavno prepoznati kao jedni od vodećih onečišćujućih tvari iz skupine farmaceutika u okolišu. Tijekom zadnjih nekoliko godina njihovo kontinuirano otpuštanje i postojanost u okolišu čak u tragovima postaju novi rastući ekološki problem zbog njihove potencijalne toksičnosti. Antivirolici su privukli pozornost i zbog činjenice da ne podliježu degradaciji u postrojenjima za obradu otpadnih voda zbog svoje prirode te pronalaze put u podzemne i površinske vode. Na primjer značajne količine oseltamivir karbosilata, koji je aktivni metabolit lijeka oseltamivira korištenog za tretiranje H5N1 i H1N1 tipa virusa gripe, bile su izlučene tokom pandemije te su na taj način došle u postrojenja za obradu otpadnih voda u biološki aktivnim oblicima.[11] Uz svoje toksične učinke antivirolici također mogu uzrokovati dugotrajne pa čak i nepovratne promjene na virusnom genomu tako što ga čine otpornim na njihovu prisutnost pri niskim koncentracijama.[18]

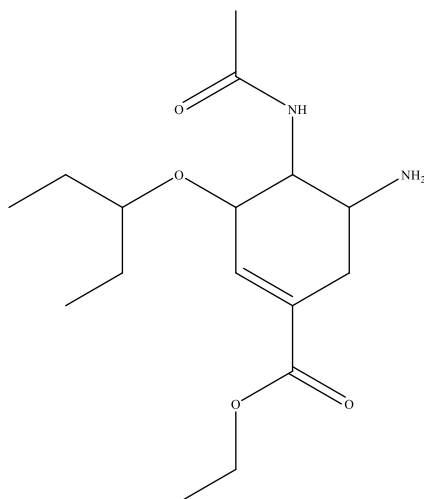
Unatoč pojačanom istraživanju i interesu za pojavu antivirusnih lijekova i njihovih razgradnih produkata u vodenim ekosustavima i otpadnim vodama, njihova distribucija i raspodjela do danas je daleko manje istražena. Također, njihova razgradnja i uklanjanje iz otpadnih voda te potencijalna toksičnost prema organizmima u okolišu slabo su istražene. Uviđa se i nedostatak dostupnih znanja o ukupnoj uporabi i otpuštanju antivirusnih lijekova u okoliš. S porastom svijesti o virusima, njihovom mehanizmu djelovanja te brzom razvoju novih strategija i tehnika za antivirusno djelovanje znatno će se ubrzati razvoj novih antivirusnih lijekova.[11,19]

2.3.1 Oseltamivir

Oseltamivir je antivirusni lijek koji se koristi za tretiranje i prevenciju influence A i B, odnosno virusa koji su uzročnici gripe. Također se pokazao učinkovitim za liječenje profilakse. Antivirusni je lijek koji se primjenjuje oralno kod djece starije od 1 godine i odraslih svih dobi. Globalno je široko korišteni te njegova primjena danas premašuje 65 milijuna terapijskih doza, u više od 40 zemalja diljem svijeta, a kao lijek registriran je u više od 80 zemalja.[20]

Najčešće se nalazi u obliku fosfata kao oseltamivir fosfat kemijske formule $C_{16}H_{28}N_2O_4$ i molarne mase 312,410 g/mol. Oseltamivir fosfat bijela je kristalna krutina kemijskog imena (3R,4R,5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoksi)-1-cikloheksen-1-karboksilna kiselina,

etil ester, fosfat (omjer 1:1). Na slici 1. prikazana je strukturna formula oseltamivira. Spada u skupinu inhibitora enzima neuraminidaze; kompetitivni je inhibitor enzima neuraminidaze virusa gripe. Ovaj enzim cijepa sijalnu kiselinu koja se nalazi u glikoproteinima na površini ljudskih stanica te pomaže novim virionima da izađu iz stanice. Na taj način oseltamivir sprječava oslobađanje, širenje i replikaciju novih virusnih stanica.[21]



Slika 1. Strukturna formula oseltamivira

Istraživanja su pokazala da se oseltamivir ne uklanja niti razgrađuje tijekom konvencionalne obrade otpadnih voda. Također se pokazalo kako se zadržava u površinskim vodama kroz duže vremenske periode što potvrđuje činjenica da mu je vrijeme poluraspada u površinskim vodama 53 dana. Isto tako nedavno se pokazalo kako je primjena antivirusnog lijeka oseltamivir fosfata tokom pandemije predstavljala povećani rizik za sigurnost pitkih voda i ekološko zdravlje. Utvrđeno je da aktivni dio oseltamivira, korišten za prevenciju i liječenje pandemije gripe, ima značajnu otpornost na biološki tretman i djelovanje UV zračenja.[11]

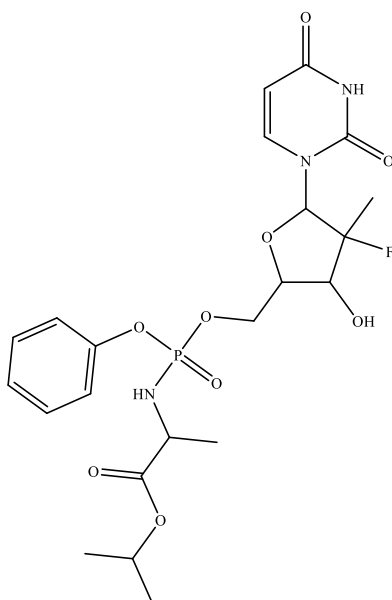
Pojavom COVID-19 virusa oseltamivir se počeo koristiti za tretiranje i ublažavanje simptoma te bolesti, no istraživanja su pokazala da se može smatrati neučinkovitim u liječenju s obzirom da virusu SARS-CoV-2 nedostaje enzim neuraminidaze influence.[11,22]

2.3.2 Sofosbuvir

Sofosbuvir je antivirusni lijek koji se konzumira peroralno te se koristi za liječenje i tretiranje hepatitisa C. Najčešće se primjenjuje u kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje odraslih osoba i djece starije od tri godine, oboljelih od kroničnog (dugotrajnog) hepatitisa C te infekcije prouzročene virusom hepatitisa C koja zahvaća jetru. Djeluje na način da u virusu

hepatitisa C inhibira djelovanje proteina NS5B RNK-ovisna RNK polimeraza koji je neophodan za umnožavanje virusa. Na taj način zaustavlja umnožavanje virusa hepatitisa C i inficiranje i širenje na nove stanice.[23]

Sofosbuvir (slika 2.) je kristalna bjelkasta krutina čija topljivost u vodi, u rasponu pH vrijednosti od 2,0 do 7,7 i pri 37 °C, ima vrijednosti iznad 2 mg/mL. Prema IUPAC-ovoj nomenklaturi službenog je imena (S)-izopropil 2-((S)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1)(2H)-il)-4-fluoro-3-hidroksi-4-metiltetrahydrofuran-2-il)metoksi)-(fenoksi)fosforilamino) propanoat. Kemijska formula mu je $C_{22}H_{29}FN_3O_9P$, a molekulska masa iznosi 529,458 g/mol. [24]



Slika 2. Strukturna formula sofosbuvira

Metabolit sofosbuvira, GS-331007 farmakološki je neaktivan nukleozid čija je maksimalna koncentracija u plazmi prisutna nakon 2 do 4 sata od inicijalne doze. Njegovo vrijeme poluraspada iznosi 27 sati dok je vrijeme poluraspada sofosbuvira 0,4 sata. Nakon primjene jedne oralne doze sofosbuvira od 400 mg velika većina se izlučuje urinom (80% i više).[25]

Za razliku od oseltamivira, prisutnost i razgradnja sofosbuvira u okolišu nije toliko istražena, no to će se morati promijeniti zbog njegove pojačane primjene te zbog stvaranja potencijalne rezistentncije kod ljudi i morskih organizma.

S ciljem istraživanja i ponašanja sofosbuvira i drugih antivirusa te potencijalne opasnosti koju predstavljaju za okoliš i prisutne organizme potrebne su osjetljive i robusne analitičke metode čije granice detekcijska nisu ograničene na niske koncentracije prisutne u biološkim uzorcima.[11]

2.4 Prisilna razgradnja

Razgradnja je postupak kojim se kemijska tvar razgrađuje na manje molekule i svoje sastavne dijelove abiotičkim putem (oksidacije, fotoliza ili hidroliza) ili biotičkim putem (biorazgradnja). Postupak razgradnje i transformacije kroz koje prolazi lijek mogu promijeniti njegova fizikalno-kemijska svojstva, bioraspoloživost, biološku aktivnost (toksičnost) molekule, terapijske učinkovitosti ili pak mogu pridonijeti potpunom uklanjanju iz okoliša (mineralizaciji). Proces razgradnje farmaceutika može započeti već i prije njegovog dospijea u okoliš odnosno prilikom bilo kojeg koraka u procesu njihove proizvodnje, transporta ili skladištenja.[26]

Prisilna razgradnja postupak je razgradnje lijekova i farmaceutskih proizvoda u kojem se oni izlažu intenzivnijim i „težim“ uvjetima nego onima u kojima se mogu naći prilikom primjene. Testovi prisilne razgradnje se provode s ciljem provjere stabilnosti lijeka, otkrivanja njegovih puteva razgradnje te istraživanja prikladnosti i mogućnosti predloženih analitičkih postupaka. Trenutačno postoji velik broj smjernica koje pružaju informacije o provođenju testova prisilne razgradnje, ali nijedne ne pružaju potpune informacije i upute o svakom pojedinom aspektu ovakve razgradnje. Ovi testovi najkorisniji su ako se provode u ranom razvoju ili prvoj fazi kliničkih ispitivanja kada daju pravovremene preporuke za poboljšanje proizvodnog procesa, osiguravaju dovoljno vremena za identifikaciju produkta razgradnje, identifikaciju proizvoda razgradnje te optimizaciju uvjeta stresa što će kasnije pomoći u procesu proizvodnje.[27]

Najčešće korištene smjernice su ICH-Q1A(R2) i ICH-Q1B dane od strane Međunarodne konferencije o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonisation – ICH*). ICH-Q1A smjernice se odnose na testiranje stabilnosti novih lijekova i proizvoda te koriste izraz testiranja na stres (eng. *stress testing*). Testiranje lijekova na stres pomaže pri identificiranju potencijalnih razgradnih produkata koji mogu pomoći pri uspostavljanju razgradnih puteva i intrinzične stabilnosti molekula te potvrditi stabilnost i snagu korištenog analitičkog postupka. Priroda testiranja na stres ovisiti će o prirodi lijeka i vrsti njegovih

produkata.[28] ICH-Q1B smjernice se odnose na testiranje fotolitičke stabilnosti novih lijekova i proizvoda.

Prisilna razgradnja provodi se kako bi se uzorak namjerno razgradio. U obje navedene smjernice prihvaćeno je da se pod uvjetima prisilne razgradnje ili stresa mogu promatrati razgradni produkti koji inače ne bi nastajali pri uvjetima prisutnim u potvrdnim studijama.[29,27] Neki od važnih ciljeva testova prisilne razgradnje su:

- razviti i validirati metode vezane uz stabilnost farmaceutika
- identificirati strukturu i toksičnost razgradnih produkata i nečistoća
- predložiti rok trajanja farmaceutika bez podataka o stabilnosti

Prema uobičajenoj industrijskoj praksi, tipični uvjeti testa otpornosti na stres su:

- toplina
- fotolitička stabilnost
- hidrolitički stres - otpornost na djelovanje kemikalija (lužnata i kisela hidroliza)
- oksidacija (oksidacijska otopina)

Interval željene razgradnje je između 5 i 30% dok se idealnom razgradnjom smatra ona oko 10% od početne vrijednosti. Prisilna razgradnja provodi se u otopljenom ili krutom obliku, ali preporuča se provođenje u obliku otopine, odnosno pomoću otapala zbog homogenog učinka.[26] Fotolitička i toplinska razgradnja primjenjive su za sve vrste lijekova dok se oksidativna razgradnja može primijeniti samo ako je lijek u obliku otopine/suspenzije.[27]

Testovi termičke razgradnje najčešće se provode u temperaturnom rasponu od 40 do 80 °C pošto pri temperaturama višim od 80 °C ne nastaju predviđeni reakcijski putevi. Preporuka je da se učinak temperature proučava u razmacima od 10 °C iznad one za rutinsko ubrzano testiranje i uz 75% i više relativne vlažnosti. Isto tako vlažnost je jedan od ključnih faktora za utvrđivanje razgradnih produkata u konačnom farmaceutskom proizvodu. Također, test se može provoditi i pri višoj temperaturi, ali onda kroz kraći vremenski period. Testiranje i praćenje u nekoliko vremenskih točaka može pružiti informacije o primarnoj i sekundarnoj brzini razgradnje.[27]

Prilikom fotolitičke razgradnje izvor svjetlosti treba proizvoditi izlaznu kombiniranu vidljivu i ultraljubičastu svjetlost (UV 320-400 nm), a razina izlaganja uzorka svjetlosti ovisi od slučaja do slučaja. Uzorak se najčešće izlaže djelovanju od 1,2 milijuna do 2,4 milijuna lux sati odnosno od 200 do 400 W/m² sa spektralnom raspodjelom od 320 do 400 nm kako bi se

omogućila usporedba između API-ja i proizvoda. Općenito, najčešće prihvaćen raspon valnih duljina pri fotolitičkoj razgradnji je od 300 do 800 nm. Testiranje fotolitičke stabilnosti integralni je dio testiranja na stres pogotovo ako je promatrana tvar osjetljiva na svjetlost.[27]

Hidroliza je kemijska reakcija razlaganja tvari na ione u prisutnosti vode pri čemu dolazi do ionizacije vode. Uz vodenu hidrolizu preporuča se provođenje kiselinom katalizirane hidrolize (kisela hidroliza) i lužinom katalizirana hidroliza (lužnata hidroliza) prilikom testiranja lijeka na stres. Ovisno o kiselobaznom karakteru ionskih vrsta koje nastaju razgradnjom promatrane tvari, može doći do reakcije njenog anionskog dijela s protonom (odnosno hidronijevim ionom), kationskog dijela s hidroksilnim ionom ili pak međusobne reakcije anionskog i kationskog dijela. Ispitivanje reakcije hidrolize uobičajeno se provodi pri sobnoj temperaturi sa ili bez dodatnog otapala. Ukoliko pri tim uvjetima ne dolazi do vidljive razgradnje može se provoditi i na višoj temperaturi, od 50 do 70 °C, unutar 7 dana. Također razgrađeni uzorak mora biti neutraliziran prikladnom kiselinom, bazom ili puferom kako bi se spriječila daljnja razgradnja. U stvarnoj praksi najčešće se odabiru kiseline i lužine koncentracije od 0,1 do 1,0 M u svrhu pokretanja razgradne aktivnosti. Klorovodična kiselina i natrijev ili kalijev hidroksid prikladni su za upotrebu kao reagensi.[26,27]

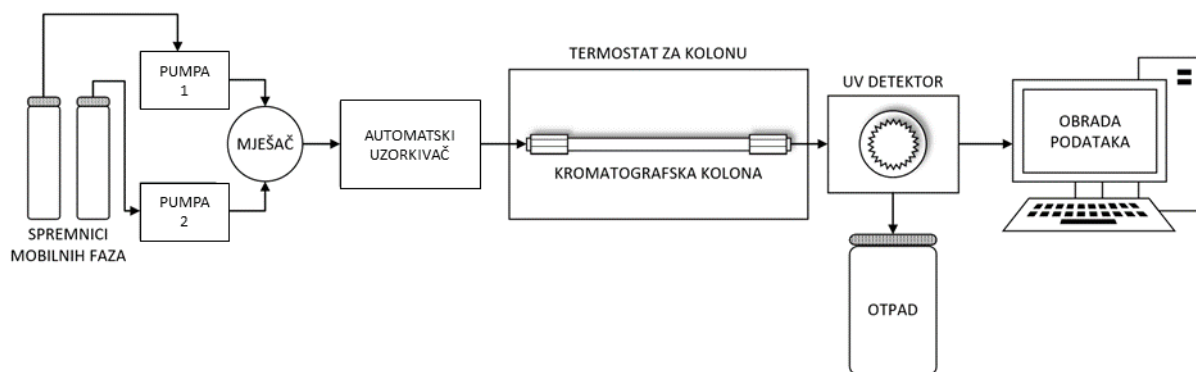
Prilikom provođenja oksidativne razgradnje najčešće se kao oksidans koristi H₂O₂ u koncentracijskom rasponu od 3 do 30%, ali se mogu koristiti i drugi reagensi kao što su metalni ioni, kisik, radikalski inicijatori ili čak azobismetil propionamid dihidroklorid. Pokazalo se da korištenjem H₂O₂ koncentracije od 3 do 10% kroz kraće vrijeme se može postići čak 20%-tna oksidativna razgradnja. U takvim uvjetima nastaju potencijalno značajni razgradni produkti. Također, priopćeno je da za dio antivirusa, prilikom provođenja oksidativne razgradnje, nema značajnije transformacije čak ni u ekstremnim uvjetima što je očekivano pošto ne podliježu svi lijekovi oksidaciji.[27]

2.5 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) analitička je tehnika korištena za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju svake komponente prisutne u smjesi. Koristi se ciljem određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj i drugim industrijama te u kliničkoj praksi i sličnim istraživanjima. Vrlo je važana u analizi procesnih i drugih tekućina, hrane, zraka te za određivanja prisutnosti različitih štetnih tvari.[30] HPLC se razlikuje od tradicionalne

("niskotlačne") tekućinske kromatografije jer ima znatno više radne tlakove (50–350 bara). Dok se obična tekućinska kromatografija oslanja na silu gravitacije za prolazak mobilne faze kroz kolonu, HPLC koristi manji promjer čestica punila i kolone, osjetljivije detektore koji omogućuju detekciju malih količina analita, visok stupanj separacije te samim time ubrzavaju analizu.[30]

HPLC se temelji na radu pumpi koje tjeraju stlačeno otapalo s mješavinu uzorka kroz kolonu ispunjenu krutim adsorpcijskim materijalom. Svaka komponenta u uzorku drugačije reagira s adsorpcijskim materijalom što uzrokuje različite brzine kretanja komponenti te dovodi do njihovog odvajanja prilikom prolaska kroz kolonu. Nepokretna faza – adsorbens – najčešće je čvrsti granulirani materijal promjera od 2 do 50 μm sačinjen of silicijeva dioksida ili kakva polimera. Mobilna faza je uglavnom mješavina vodenog i organskog otapala (na primjer acetonitril ili metanol). Na slici 3. prikazana je shema HPLC sustava.[30]



Slika 3. Shematski prikaz HPLC sustava

Tipični HPLC uređaj sastoji se od pumpe, sustava za automatsko uzorkivanje s injektorom, termostatirane kolone, detektora i računalne jedinice za obradu signala. Iz injektora smjesu uzorka ubrizgava se u struju mobilne faze koju ju onda dalje prenosi kroz kolonu. Detektor generira signal koji je proporcionalan količini komponente uzorka na izlazu iz kolone što zatim omogućuje kvantitativnu analizu uzorka. Na poslijetku digitalni mikroprocesor i korisnički softver kontroliraju instrument i omogućuju analizu podatka za željeni uzorak.[30,31]

Sastav mobilne faze i temperatura igraju bitnu ulogu u procesu separacije jer utječu na fizikalne interakcije između komponenti uzorka i stacionarne faze (hidrofobne interakcije, dipol-dipol, ionske i najčešće kombinacija tih). Spojevi koji su dobro topljivi u mobilnoj fazi, a imaju mali afinitet prema stacionarnoj fazi brže se ispiru iz kolone, dok oni s većim afinitetom

prema stacionarnoj fazi sporije prolaze kroz kolonu. Prolaskom mobilne faze kroz kolonu dolazi do narušavanja ravnoteže, te se nova ravnoteža uspostavlja između sastojaka razdijeljenih među fazama. Sastojci unutar uzorka imaju različite ravnotežne raspodjele između faza, pri čemu svaki sastojak ostvaruje različito vrijeme zadržavanja. Rezultat toga stvaranje je kromatografskih pikova koji su karakteristični i lako vidljivi na kromatogramu.[30,31]

2.6 Validacija HPLC metode

Validacija metode postupak je dokazivanja valjanosti i prikladnosti analitičkog postupka za odgovarajuću namjenu, odnosno ona je određeno jamstvo da će svaki budući rezultat dobiven tom metodom zadovoljiti kriterij prihvaćanja. Prilikom pripreme za postupak validacije bitno je osigurati dovoljnu količinu standarda poznatog sadržaja i čistoće, koristiti analitičku opremu koja je jasno definirana, kalibrirana i karakterizirana te imati ljude upoznate s tehnikama rada i osposobljene za rad na instrumentu. Tokom postupka validacije potrebno je voditi računa o nekoliko kriterija koje metoda mora zadovoljavati: specifičnost, selektivnost, prikladnost sustava, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, točnost, preciznost, robusnost, stabilnost te ponovljivost i raspon metode.[32]

Specifičnost je sposobnost metode da može uspješno procijeniti i otkriti analit, a selektivnost metode sposobnost da precizno mjeri količinu analita u prisutnosti drugih očekivanih komponenata bez međusobnih interferencija. Robusnost metode mjera je njezine mogućnosti da ostane netaknuta i nepromijenjena uvođenjem malih, ali namjernih varijacija parametara metode te s obzirom na to daje indicaciju o pouzdanosti metode tijekom normalne uporabe. Stabilnost metode predstavlja procjenu dopuštenog vremena između prikupljanja uzoraka i analize. Uz veliku stabilnost metode duže vremena može proći između prikupljanja uzoraka i njihovog analiziranja.[32] Prikladnost sustava skup je parametara koji potvrđuju prikladnost i efektivnost odabranog sustava te time potvrđuje da je sustav valjan za određenu namjenu. O njima će u slijedećim odlomcima biti rečeno nešto više.

2.6.1 Linearnost

Linearnost analitičke metode je njeno svojstvo da unutar danog raspona daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentracijama i količinama analita u uzorku.[32] Za potvrdu linearnosti najčešće se koristi koeficijent determinacije, R^2 , koji mora biti iznad 0,9900.

2.6.2 Točnost

Točnost metode je blizina i slaganje dobivenog rezultata sa stvarnom unaprijed definiranom vrijednosti kao referentnom.[32] Razlike u njihovim iznosima ukazuju na prisutnost sustavnih pogreški. Kao kriterij za točnost najčešće se koristi vrijednost analitičkog povrata koja uobičajeno mora iznositi između 70 i 130%. Analitički povrat računa se prema sljedećoj jednadžbi:

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

2.6.3 Preciznost

Preciznost predstavlja raspršenost podataka i blizinu mjerenja oko srednje vrijednosti dobivenih ponovljenim ispitivanjima homogenih uzoraka te je pokazatelj postojanja slučajne pogreške. Obuhvaća tri razine: ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost.[32] Ponovljivost predstavlja preciznost pri istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu, dok se međupreciznost određuje pri različitim uvjetima. Obnovljivost obuhvaća mjerenja na istom uzorku provedena u različitim laboratorijima i instrumentima.

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

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

gdje *s* predstavlja standardno odstupanje *n* ponovljenih mjerenja, a \bar{x} srednju vrijednost izmjerenih podataka.

2.6.4 GK i GD

Granica detekcije (*GD*) označava najmanju količinu analita u uzorku koja se može dokazati, ali ne mora se nužno kvantificirati kao točna vrijednost dok je granica kvantifikacije (*GK*) najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti sa željenom točnošću i preciznošću.[32]

GD i GK računata su iz rezultata dobivenih na najmanjoj koncentracijskoj razini pri čemu su korištene sljedeće jednadžbe:

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

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

gdje je σ standardna devijacija eksperimentalno dobivenih koncentracija, a a nagib kalibracijskog pravca nižeg koncentracijskog područja.

3 Eksperimentalni dio

3.1 Kemikalije i reagensi

Kemikalije i reagensi korišteni za validacije metoda te provođenje testova prisilne razgradnje oseltamivira i sofosbuvira navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija i reagensa

Kemikalija	Formula	Čistoća	Proizvođač	Država	Upotreba
Kalij dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	Krutina, $\geq 99,5\%$	Alkaloid AD Skopje	NMK	Mobilna faza
Klorovodična kiselina	HCl	Otopina, 37%	VWR	US	Reagens
Metanol	CH_3OH	Otopina, HPLC grade	J.T. Baker	US	Mobilna faza
Natrijev hidroksid	NaOH	Krutina, 99,3%	Lach:ner	CZ	Reagens
Oseltamivir	$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$	Krutina, $99,6 \pm 0,3\%$	Supelco	US	CRM
Sofosbuvir	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{FN}_3\text{O}_9\text{P}$	Krutina, $\geq 99\%$	Biosynth Carbosynth	CH	CRM
Vodikov peroksid	H_2O_2	Otopina, 30%	Gram-mol d.o.o.	HR	Reagens

3.2 Popis analitičke opreme

Tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada korištena je sljedeća analitička oprema:

- Tehnička vaga Mettler Toledo, model PB1502-L, US
- Analitička vaga Mettler Toledo, model XA105DU, US
- pH metar Mettler Toledo, model S20 SevenEasy, US
- pH elektroda Mettler Toledo, model InLab Expert Pro, US
- Filtracijski sustav za proizvodnju ultra-čiste vode bez organskih tvari Mili Q, Reagent Grade Water System, Milipore Co.
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti LC-20ADXR sa SPD-20AV UV detektorom, Shimadzu, JP
- Kromatografska kolona XBridge C18 3,5 μm , 4,6x150 mm, Waters, US
- Magnetska miješalica Witeg Labortechnik GmbH, model MSH-20A, DE
- Suntest uređaj Atlas Material Testing Technology GmbH, model CPS+, US
- Ultrazvučna kupelj Rocker, model Soner 210, TW
- Termostat, Termo medicinski aparati Bodalec & Havočić, model EBT, HR

3.3 Eksperimentalni dizajn

3.3.1 Validacija LC metoda za analizu oseltamivira i sofosbuvira

Prilikom provođenja validacije metode korištene su otopine koncentracija 0,1250, 0,1000, 0,0750, 0,0500, 0,0250, 0,0100, 0,0075, 0,0050, 0,0025 i 0,0010 mM. Mjerenja su se provodila u tri serije te je svaka od pripremljenih koncentracija analizirana tri puta. Odnosno, za svaku od navedenih koncentracija napravljeno je po devet mjerenja.

Stock otopina oseltamivira (OST) pripremljena je otapanjem 28,70 mg standarda oseltamivira u 50 mL ultra čiste vode. *Stock* otopina sofosbuvira (SOF) pripremljena je otapanjem 31,80 mg standarda sofosbuvira u 50 mL ultra čiste vode. Kalibracijske otopine pripremane su razrjeđivanjem *stock* otopina.

Za OST i SOF korištene su dvije različite HPLC metode. Obje su metode imale izokratno eluiranje otopinama kalijevog dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) i metanola (CH_3OH), na kromatografskoj kolona XBridge C18 (dimenzija 4,6×150 mm s promjerom čestica punila od 3,5 μm). Detaljni uvjeti elucije navedeni su u tablici 2.

Tablica 2. Kromatografski uvjeti metoda za analizu oseltamivira i sofosbuvira

	OST	SOF
Mobilna faza	45 % 20 mM KH_2PO_4 55 % CH_3OH	53 % 20 mM KH_2PO_4 47 % CH_3OH
Protok/ mL min^{-1}	1	1
Volumen injekcije/ μL	30	30
Temperatura pećnice/ $^{\circ}\text{C}$	30	30
UV detekcija/ nm	215	261
Trajanje metode/ min	12	13

3.3.2 Prisilna razgradnja

Prisilna razgradnja OST-a i SOF-a provedena je neutralnom, lužnatom i kiselom hidrolizom, oksidacijom s H_2O_2 , te termičkom i fotolitičkom razgradnjom. U ovom slučaju neutralna hidroliza spoja na sobnoj temperaturi znači da se pratila razgradnja i ponašanje 0,1 mM otopine oba spoja u tamnim bočicama bez dodatka ikakvog reagensa kroz period od 168 sati odnosno 7 dana.

3.3.2.1 Lužnata hidroliza

Prilikom provođenja lužnate hidrolize praćena je razgradnja i ponašanje 0,1 mM otopine oba spoja kroz vremenski period od 90 min u prisutnosti NaOH kao reagensa za lužnatu razgradnju. Razgradnja se provodila u odmjernim tikvicama od 50 mL te je u obje tikvice bilo prisutno 49,5 mL OST-a odnosno SOF-a uz dodatak 0,5 mL 1 M otopine NaOH. Uzorkovanje se provodilo svakih 15 minuta odnosno nakon 0, 15, 30, 45, 60, 75 i 90 minuta.

3.3.2.2 Kisela hidroliza

Kisela hidroliza također se pratila kroz vremenski period od 24 sata u prisutnosti HCl kao reagensa za kiselu razgradnju. Razgradnja se provodila u odmjernim tikvicama od 50 mL te je u obje tikvice bilo prisutno 49,5 mL OST-a i SOF-a uz dodatak 0,5 mL 1 M otopine HCl. Uzorkovanje se u prvom satu provodilo svakih 30 minuta, a nakon toga svakih sat vremena kroz period od 5 sati odnosno nakon 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 i 5 sati te se na kraju uzimao uzorak nakon 24 sata.

3.3.2.3 Oksidacija vodikovim peroksidom

Prisilna razgradnja oksidacijom provodila se kroz 24 sata u prisutnosti 30%-tne otopine H₂O₂ kao oksidacijskog reagensa. Razgradnja se provodila u odmjernim tikvicama od 50 mL te je u obje tikvice bilo prisutno 45,0 mL OST-a i SOF-a uz dodatak 5,0 mL 30%-tne otopine H₂O₂. Uzorkovanje se provodilo kroz period od 180 minuta u intervalima 0, 15, 30, 60, 120 i 180 minuta, a na kraju je izuzet uzorak nakon 24 sata.

3.3.2.4 Termička razgradnja

Kod termičke razgradnje pratila se razgradnja i ponašanje 0,1 mM otopine oba spoja u tamnim bočicama bez dodatka reagensa u termostatima na 30 i 40 °C tijekom 7 dana.

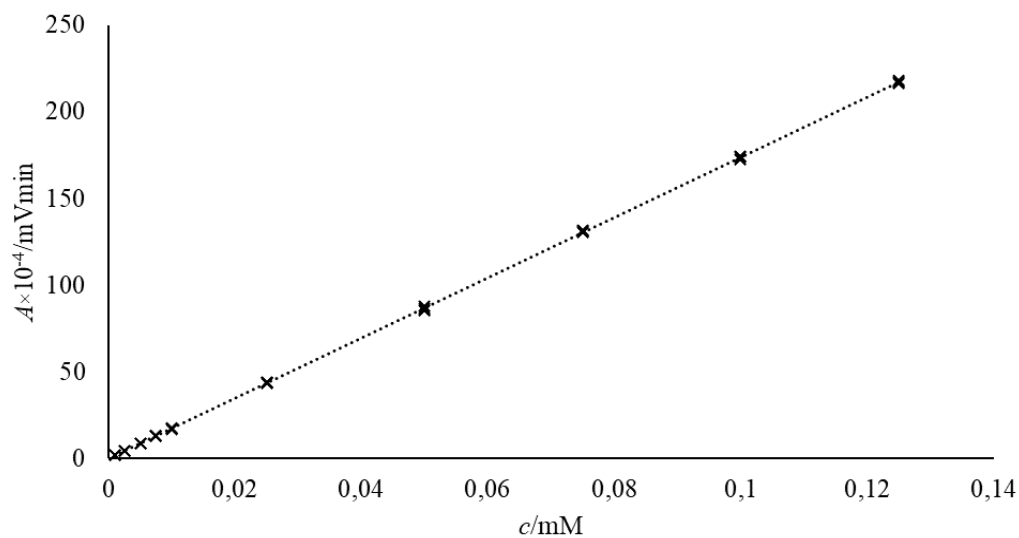
3.3.2.5 Fotolitička razgradnja

Fotolitička razgradnja provodila se uz pomoć Sun test uređaja, Otopine pojedinog spoja nalazile su se u kvarcnim čašicama te su kraj njih paralelno izlagane i slijepe probe – čašice omotane alu-folijom kako na njih ne bi utjecalo svjetlosno zračenje. Razgradnja se provodila pri 25 °C uz snagu lampe 600 W/m². Uzorkovanje se u prvom satu provodilo svakih 30 minuta, a nakon toga svakih sat vremena kroz period od 6 sati odnosno nakon 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 sati. Isto tako uz izuzimanje uzoraka paralelno su se izuzimale i slijepe probe iz omotanih čašica te su i one također analizirane.

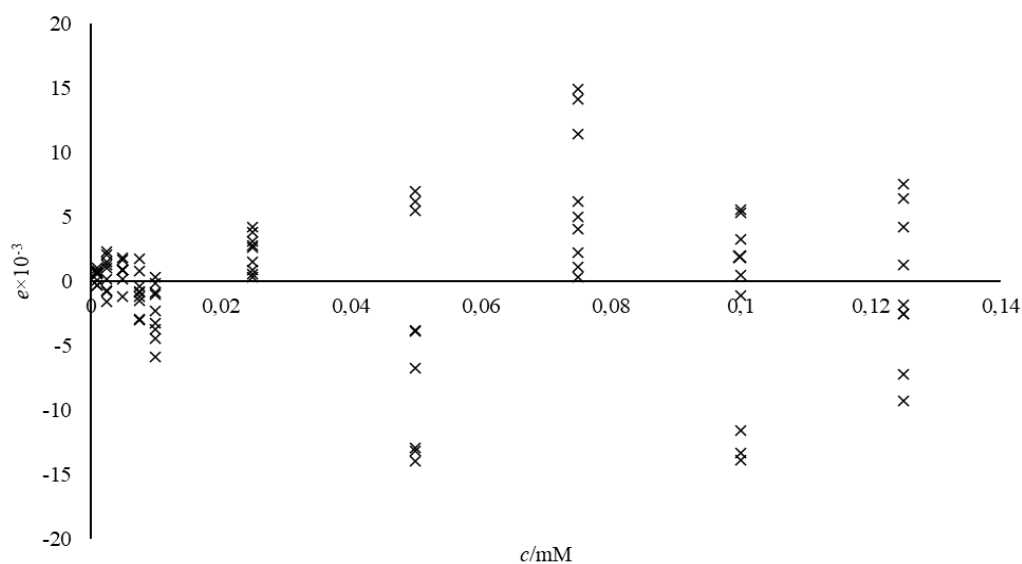
4 Rezultati i rasprava

4.1 Validacija LC metoda

4.1.1 Linearnost



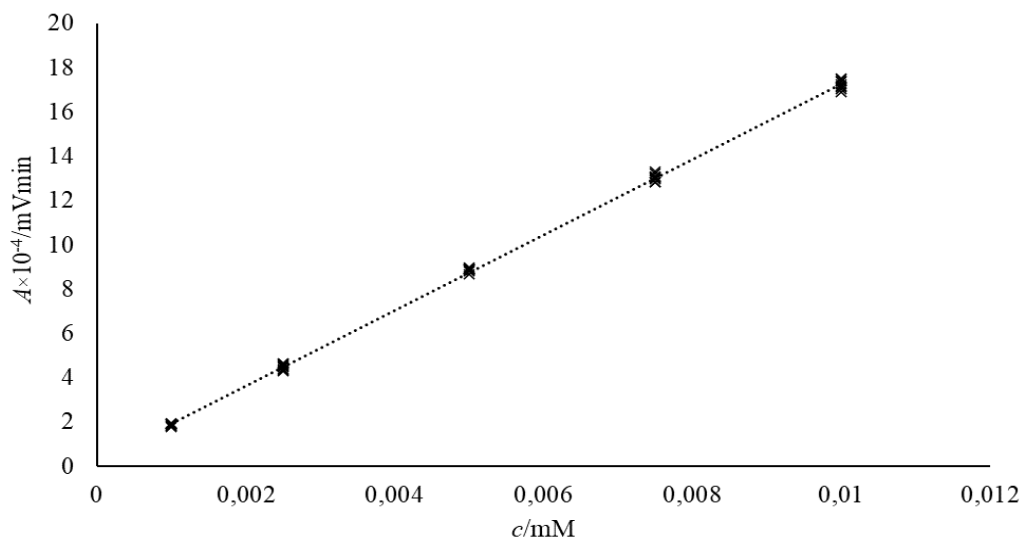
Slika 4. Kalibracijski pravac za analizu SOF-a ($y = 1,7 \cdot 10^7 x + 9,4 \cdot 10^2$; $R^2 = 1,0000$) u području koncentracija od 0,0010 do 0,1250 mM



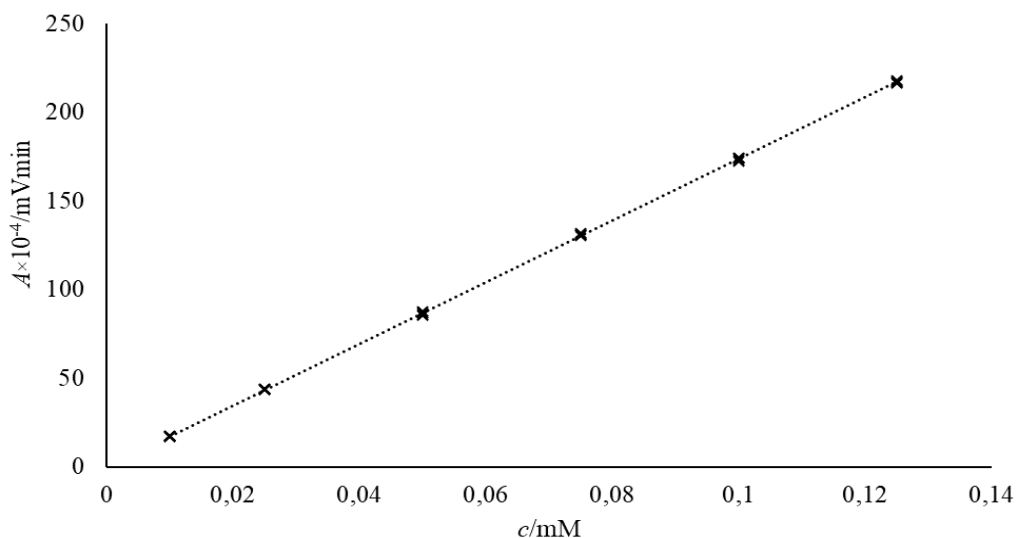
Slika 5. Graf rezidualnih odstupanja SOF-a za kalibracijski pravac $y = 1,7 \cdot 10^7 x + 9,4 \cdot 10^2$

Unatoč zadovoljenom kriteriju linearnosti ($R^2 \geq 0,9900$) na kalibracijskom pravcu SOF-a, iz grafa rezidualnih odstupanja za cijelo područje jasno je vidljivo da pri većim koncentracijama

dolazi do većeg rasipanja podataka. Zbog toga je potrebno je kalkulaciju i kalibracijske pravce razdvojiti na dva područja: od 0,0010 mM do 0,0100 mM, te 0,0100 do 0,1250 mM.

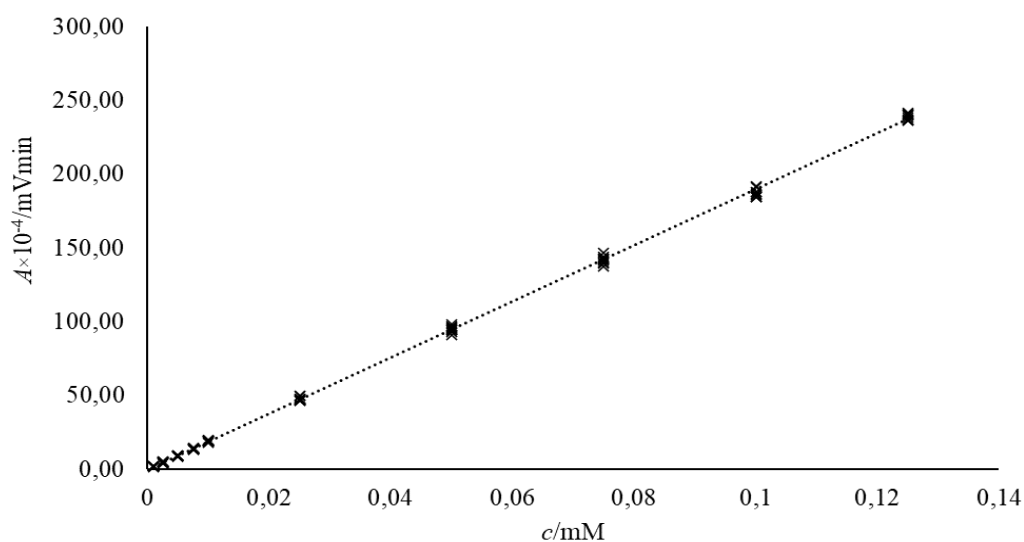


Slika 6. Kalibracijski pravac za analizu SOF-a ($y = 1,7 \cdot 10^7 x + 2,3 \cdot 10^3$; $R^2 = 0,9993$) u području koncentracija od 0,0010 do 0,0100 mM

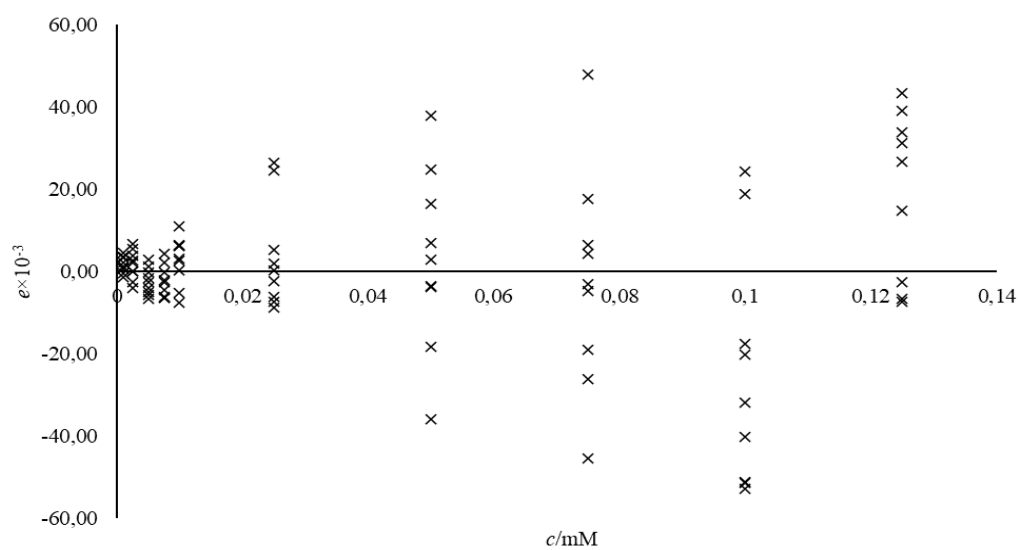


Slika 7. Kalibracijski pravac za analizu SOF-a ($y = 1,7 \cdot 10^7 x + 4,8 \cdot 10^2$; $R^2 = 0,9999$) u području koncentracija od 0,0100 do 0,1250 mM

Iznos koeficijenta determinacije je i kod razdvojenih kalibracijskih pravaca $\geq 0,9900$ te se obzirom na to može zaključiti da je i razdvajanjem kalibracijskih pravaca zadovoljen uvjet linearnosti. Iz usporedbe nagiba i odsječaka krivulja za oba područja vidljivo je da je nagib krivulje za kalibracijsko područje koncentracija od 0,0100 do 0,1250 mM veći u odnosu na nagib za područje koncentracija od 0,0010 do 0,010 mM dok je odsječak krivulje za područje viših koncentracija manji u odnosu na onaj za područje nižih koncentracija.

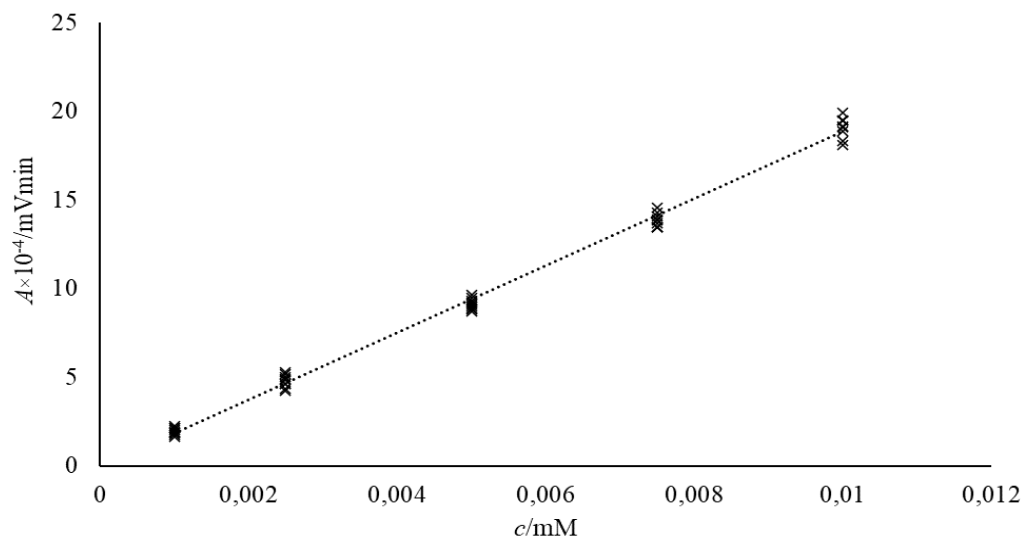


Slika 8. Kalibracijski pravac za analizu OST-a ($y = 1,9 \cdot 10^7 x - 1,1 \cdot 10^3$; $R^2 = 0,9995$) u području koncentracija od 0,0010 mM do 0,1250 mM

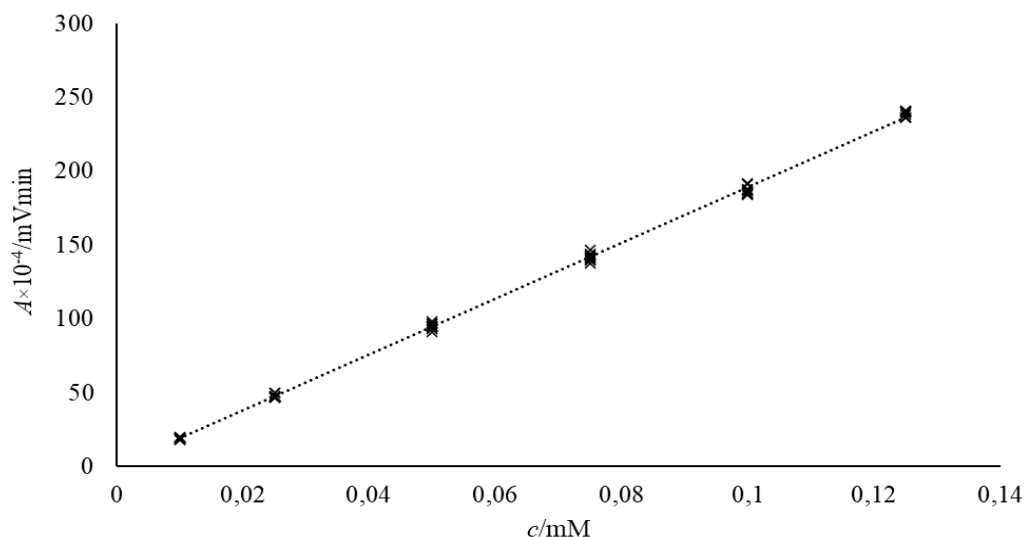


Slika 9. Graf rezidualnih odstupanja OST-a za kalibracijski pravac $y = 1,9 \cdot 10^7 x - 1,1 \cdot 10^3$

Kao i kod SOF-a, i kod kalibracijskog pravca OST-a u cijelom koncentracijskom području također je vidljivo da pri većim koncentracijama dolazi do sve većeg rasipanja podataka te je i ovdje bilo potrebno kalkulaciju i kalibracijske pravce razdvojiti na dva područja: od 0,0010 do 0,0100 mM te od 0,0100 0,1250 mM.



Slika 10. Kalibracijski pravac za analizu OST-a ($y = 1,9 \cdot 10^7 x - 5,6 \cdot 10^2$; $R^2 = 0,9952$) u području koncentracija od 0,0010 do 0,0100 mM

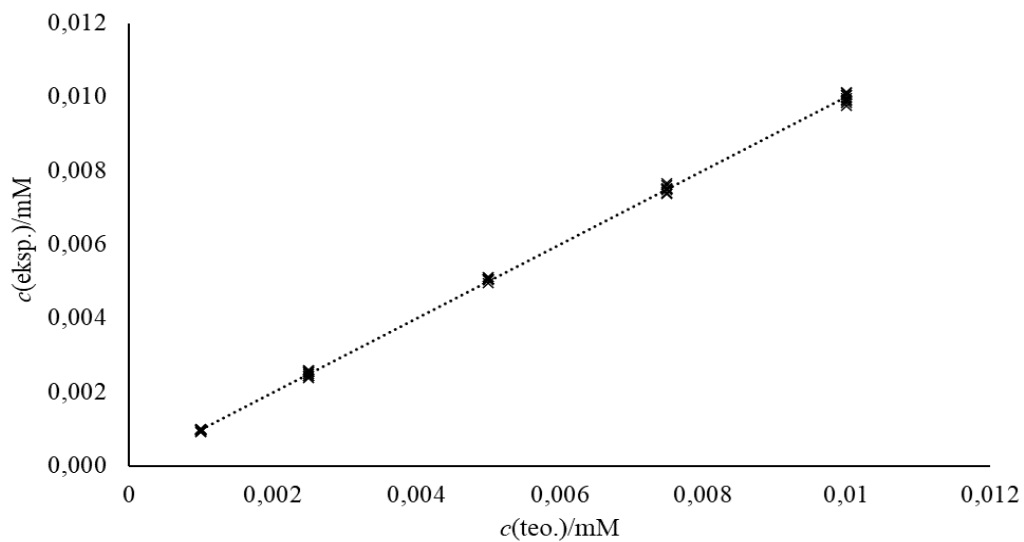


Slika 11. Kalibracijski pravac za analizu OST-a ($y = 1,9 \cdot 10^7 x - 3,8 \cdot 10^2$; $R^2 = 0,9990$) u području koncentracija od 0,0100 do 0,1250 mM

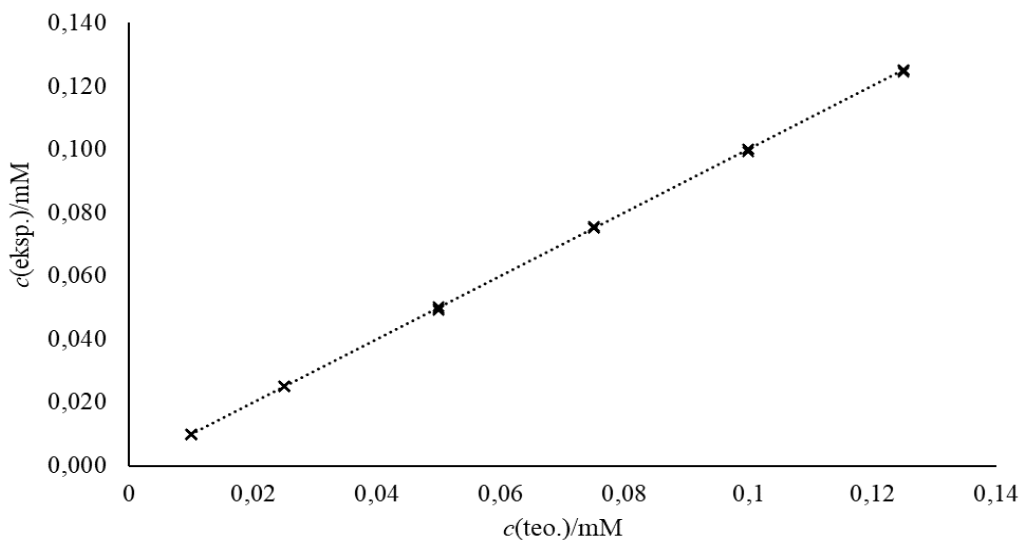
Iz usporedbe nagiba i odsječaka krivulja za oba područja vidljivo je da su i nagib i odsječak pravca za kalibracijsko područje viših koncentracija od 0,0100 do 0,1250 mM veći u odnosu na nagib i odsječak za područje koncentracija od 0,0010 do 0,0100 mM. Uvjet za linearnost je također zadovoljen u oba kalibracijska područja.

4.1.2 Točnost

Parametar točnosti ukazuje na postojanje sustavne pogreške. Kod grafa usporedbe mjerenih vrijednosti koncentracija o pripremljenima, u idealnom slučaju nagib regresijskog pravca je 1, a odsječak 0. Ako odstupa iznos nagiba prisutna je proporcionalna sustavna pogreška, a ako odstupa vrijednost odsječka konstantna sustavna pogreška. Sustavne pogreške karakteristične su za pojedini sustav te ih se može odrediti i kvantificirati, pa samim time i računski korigirati kako bi se uklonio njihov utjecaj. U slučaju da parametri pravca (nagib i odsječak) odstupaju od nominalnih vrijednosti, a vrijednosti 1 i 0 se nalaze unutar njihovog intervala pouzdanosti, uzimamo i dalje da su te vrijednosti zadovoljene.



Slika 12. Usporedba mjerenih i pripremljenih vrijednosti koncentracija SOF-a u području koncentracija od 0,0010 do 0,0100 mM



Slika 13. Usporedba mjerenih i pripremljenih vrijednosti koncentracija SOF-a u području koncentracija od 0,0100 do 0,1250 mM

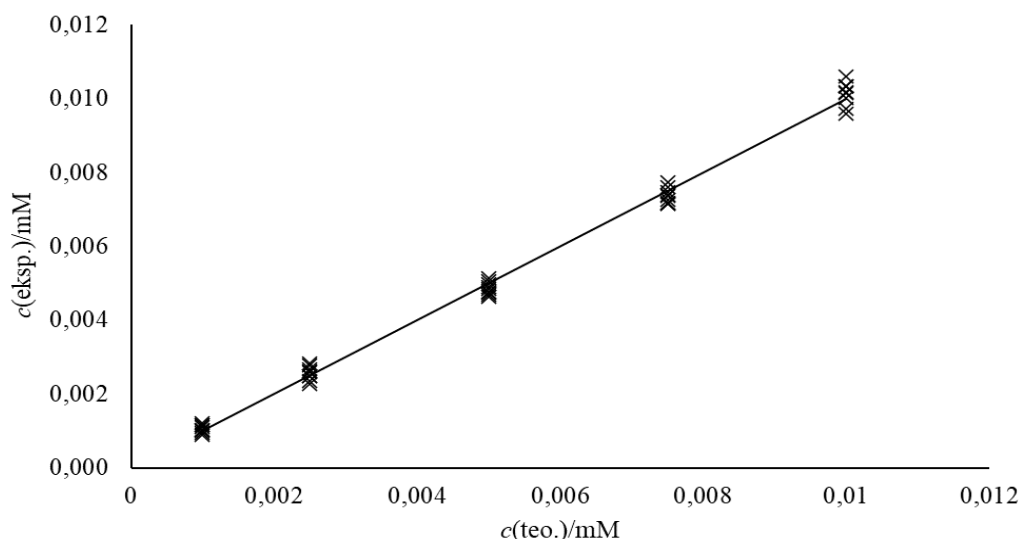
Kod SOF-a za oba koncentracijska područja nagib regresijskog pravca iznosi 1, a odsječak 0 te se s obzirom na to može se zaključiti da nije prisutna sustavna pogreška. Rezultati analize točnosti prikazani su u tablici 3. Za razvijenu metodu izračunate su vrijednosti analitičkog povrata za sve pripremljene otopine. No, radi jednostavnijeg prikaza uzimane su srednje vrijednosti za pojedinu koncentraciju. Uvjet za zadovoljavanje kriterija točnosti je vrijednost analitičkog povrata između 70 i 130 %. Iz priloženih rezultata (tablica 4.) vidljivo je da je i ovaj kriterij točnosti zadovoljen.

Tablica 3. Rezultati analize točnosti za SOF

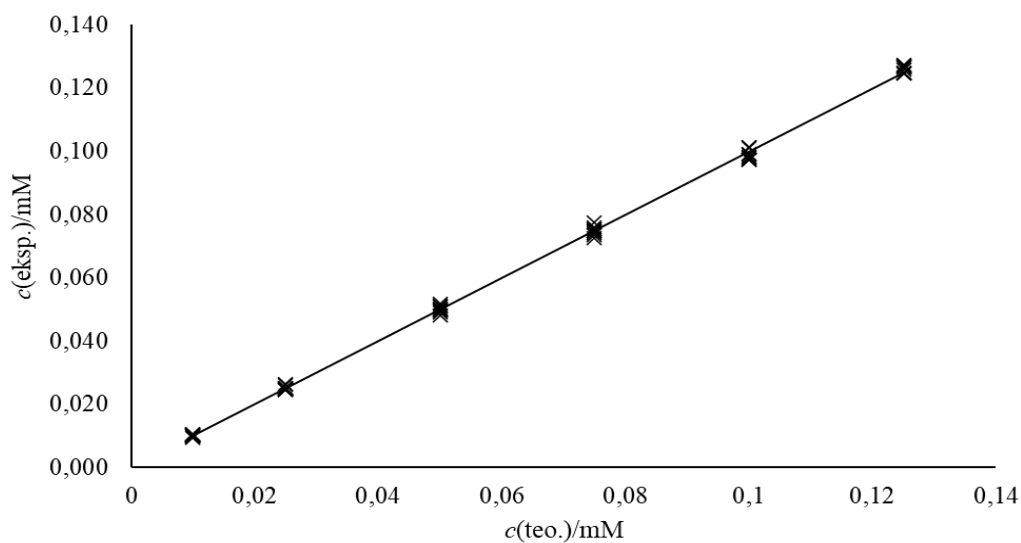
Koncentracijsko područje / mM	Parametar	Vrijednost parametra	Interval pouzdanosti 95,0 %	
			Donja granica	Gornja granica
0,0010–0,0100	Odsječak	0,0000	$-4,9 \cdot 10^{-5}$	$4,9 \cdot 10^{-5}$
	Nagib	1,0000	0,9921	1,0079
0,0100–0,1250	Odsječak	0,0000	-0,0002	0,0002
	Nagib	1,0000	0,9973	1,0026

Tablica 4. Rezultati srednjih vrijednosti analitičkog povrata za SOF

$c(\text{SOF})_{\text{teor}} / \text{mM}$	$c(\text{SOF})_{\text{eksp}} / \text{mM}$	Analitički povrat / %
0,0010	0,0010	96,39
0,0025	0,0025	100,07
0,0050	0,0051	101,17
0,0075	0,0075	100,10
0,0100	0,0100	99,68
0,0250	0,0251	100,57
0,0500	0,0498	99,56
0,0750	0,0754	100,51
0,1000	0,0998	99,85
0,1250	0,1250	99,97



Slika 14. Usporedba mjerenih i pripremljenih vrijednosti koncentracija OST-a u području koncentracija od 0,0010 do 0,0100 mM



Slika 15. Usporedba mjerenih i pripremljenih vrijednosti koncentracija OST-a u području koncentracija od 0,0100 do 0,1250 mM

Kod OST-a za oba koncentracijska područja nagib regresijskog pravca je 1, a odsječak 0 te se s obzirom na to može se zaključiti da i ovdje također nije prisutna sustavna pogreška. Rezultati analize točnosti prikazani su u tablici 5. Za razvijenu metodu izračunate su vrijednosti analitičkog povrata za sve pripremljene otopine. No, radi jednostavnijeg prikaza uzimane su srednje vrijednosti za pojedinu koncentraciju. Uvjet za zadovoljavanje kriterija točnosti je vrijednost analitičkog povrata između 70 i 130 %. Iz priloženih rezultata (tablica 6.) vidljivo je da je i ovaj kriterij točnosti zadovoljen.

Tablica 5. Rezultati analize točnosti za OST

Koncentracijsko područje / mM	Parametar	Vrijednost parametra	Interval pouzdanosti 95,0 %	
			Donja granica	Gornja granica
0,0010-0,0100	Odsječak	0,0000	$-1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$
	Nagib	1,0000	0,9786	1,0214
0,0100-0,1250	Odsječak	0,0000	$-6,6 \cdot 10^{-4}$	$6,6 \cdot 10^{-4}$
	Nagib	1,0000	0,9913	1,0087

Tablica 6. Rezultati srednjih vrijednosti analitičkog povrata za OST

$c(\text{OST})_{\text{teor}} / \text{mM}$	$c(\text{OST})_{\text{eksp}} / \text{mM}$	Analitički povrat / %
0,0010	0,0010	105,91
0,0025	0,0025	102,57
0,0050	0,0051	97,26
0,0075	0,0075	98,24
0,0100	0,0100	101,45
0,0250	0,0251	100,68
0,0500	0,0498	100,28
0,0750	0,0754	99,82
0,1000	0,0998	98,70
0,1250	0,1250	100,82

4.1.3 Preciznost

Preciznost predstavlja raspršenost podataka dobivenih ponovljenim ispitivanjima homogenih uzoraka oko srednje vrijednosti te je pokazatelj postojanja slučajne pogreške. U ovom radu ona je iskazana kao ponovljivost te je izražena preko *RSD* vrijednosti. Standardna devijacija, s obzirom na veliki broj točaka, računata je na koncentraciji 0,0050 mM za koncentracijsko područje od 0,0010 mM do 0,0100 mM te na koncentraciji 0,0750 mM za koncentracijsko područje od 0,0100 mM do 0,1250 mM. Uvjet za zadovoljavanje preciznosti je $RSD \leq 10\%$.

U tablicama 7 i 8 prikazani su rezultati analize preciznosti za SOF odnosno OST. *RSD* pri obje koncentracije za oba ispitivana spoja iznosi $\leq 10\%$ čime je zadovoljen kriterij preciznosti obaju metoda.

Tablica 7. Analiza preciznosti SOF-a

	$c_{\text{teor}} / \text{mM}$	$c_{\text{eksp}} / \text{mM}$	$c_{\text{teor}} / \text{mM}$	$c_{\text{eksp}} / \text{mM}$
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0757
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0759
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0758
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0754
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0752
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0753
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0751
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0751
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0750
$c_{\text{sr}} / \text{mM}$	0,0050	0,0051	0,0750	0,0754
Standardna devijacija / mM		0,0001		0,0003
RSD / %		1,02		0,42

Tablica 8. Analiza preciznosti OST-a

	$c_{\text{teor}} / \text{mM}$	$c_{\text{eksp}} / \text{mM}$	$c_{\text{teor}} / \text{mM}$	$c_{\text{eksp}} / \text{mM}$
	0,0050	0,0050	0,0750	0,0759
	0,0050	0,0047	0,0750	0,0740
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0753
	0,0050	0,0051	0,0750	0,0747
	0,0050	0,0048	0,0750	0,0726
	0,0050	0,0047	0,0750	0,0736
	0,0050	0,0049	0,0750	0,0775
	0,0050	0,0046	0,0750	0,0748
	0,0050	0,0048	0,0750	0,0752
$c_{\text{sr}} / \text{mM}$	0,0050	0,0049	0,0750	0,0749
Standardna devijacija / mM		0,0002		0,0014
RSD / %		3,52		1,89

4.1.4 Granica detekcije i granica kvantifikacije

GD i GK izračunate su prema jednadžbama 3 i 4 na temelju kalibracijskog pravca za koncentracijsko područje od 0,0010 do 0,0100 mM i standardne devijacije najmanje koncentracijske razine – 0,0010 mM. Rezultati su prikazani u tablici 9.

Tablica 9. Vrijednosti granica detekcije (*GD*) i kvantifikacije (*GK*) za SOF i OST

	SOF	OST
<i>GD</i> / mM	$5,6 \cdot 10^{-12}$	$1,8 \cdot 10^{-11}$
<i>GK</i> / mM	$1,7 \cdot 10^{-11}$	$5,5 \cdot 10^{-11}$

4.2 Prisilna razgradnja

„Neutralna“ hidroliza pratila se 7 dana na temperaturi od 25 °C te je praćenjem kinetike hidrolize utvrđeno da u tom periodu nije došlo do razgradnje nijednog od navedenih spojeva.

4.2.1 Lužnata hidroliza

U tablici 10 prikazani su rezultati razgradnje preko normalizirane površine A/A_0 , gdje je t vrijeme, A površina ispod kromatografskog pika nakon određenog vremena trajanja hidrolize, a A_0 površina ispod kromatografskog pika prije hidrolize. Nakon provođenja lužnate hidrolize vidljivo je da u promatranom vremenskom razdoblju od 90 minuta dolazi do potpune razgradnje oba spoja. S obzirom da se OST u potpunosti razgradio već nakon 75 minuta, sljedeći uzorak nije bilo potrebno izuzimati.

Tablica 10. Rezultati lužnate razgradnje SOF-a i OST-a

	SOF	OST
t / min	A/A_0	A/A_0
0	1,00	1,00
15	0,39	0,43
30	0,15	0,17
45	0,06	0,06
60	0,02	0,03
75	0,01	0,00
90	0,00	-

4.2.2 Kisela hidroliza

Nakon provođenja kisele hidrolize vidljivo je da tokom 24 sata provođenja pokusa dolazi do djelomične razgradnje SOF-a (tablica 11). Za razliku od toga, OST slabije podliježe kiseloj hidrolizi te se nakon 24 sata razgrađuje tek 2 %.

Tablica 11. Rezultati kisele razgradnje SOF-a i OST-a

	SOF	OST
<i>t</i> / h	<i>A/A</i> ₀	<i>A/A</i> ₀
0	1,00	1,00
0,5	0,98	1,00
1	0,95	1,00
2	0,88	1,00
3	0,81	1,00
4	0,74	1,00
5	0,69	1,00
24	0,15	0,98

4.2.3 Oksidacija vodikovim peroksidom

Nakon provođenja oksidacije 30%-tnom otopinom H₂O₂ kroz period od 180 minuta vidljivo je da ne dolazi do značajne razgradnje spojeva. Rezultati su prikazani u tablici 12 gdje je vidljivo da je OST nešto podložniji oksidativnoj razgradnji. Kako bi se zadovoljio zahtjev ICH smjernica za razgradnju oko 10 %, razgradnju bi bilo poželjno pratiti kroz duži vremenski period u većim intervalima ili bi se trebala dodati veća količina reagensa. S obzirom na to može se zaključiti da je sofosbuvir stabilan i da se ne razgrađuje u prisutnosti vodikovog peroksida (H₂O₂) unutar promatranog vremenskog razdoblja.

Tablica 12. Rezultati oksidativne razgradnje SOF-a i OST-a

	SOF	OST
<i>t</i> / min	<i>A/A</i> ₀	<i>A/A</i> ₀
0	1,00	1,00
15	0,99	0,99
30	0,99	0,97
60	0,99	0,97
120	0,98	0,96
180	0,97	0,96

4.2.4 Termička razgradnja

Termičkom razgradnjom SOF-a, na 30 °C i 40 °C kroz period od 7 dana došlo je do 1 odnosno 2%-tne razgradnje spoja. OST se pri temperaturi 30 °C nije razgradio, dok je na 40 °C došlo do 2%-tne razgradnje. Iz rezultata se može zaključiti da su oba spoja stabilna na povišenoj temperaturi.

4.2.5 Fotolitička razgradnja

Fotolitičkom razgradnjom spojeva upotrebom SunTest uređaja pri navedenim uvjetima kroz period od 6 sati ne dolazi do razgradnje nijednog spoja.

4.2.6 Usporedba svih primijenjenih postupaka razgradnje

Prisilna razgradnja SOF i OST provodila se pri istim uvjetima, a svi rezultati objedinjeni su i prikazani u tablici 13.

Tablica 13. Objedinjeni rezultati primijenjenih uvjeta prisilne razgradnje

Uvjeti/medij/trajanje	Razgradnja SOF-a/%	Razgradnja OST-a/%
Neutralno/-/7 dana	0	0
Lužnato/1 M NaOH/1,5 h	100	100
Kiselo/1 M HCl/5 h	31	1
Kiselo/1 M HCl/24 h	85	2
Oksidativno/30% H ₂ O ₂ /3 h	3	4
Oksidativno/30% H ₂ O ₂ /24 h	14	5
Termičko/30 °C/7 dana	1	0
Termičko/40 °C/7 dana	2	2
Fotolitičko/600 W/m ² /6 h	0	0

Uspoređujući dobivene rezultate za SOF s literaturno dostupnim podacima vidljivo je njihovo poklapanje te da je ponašanje SOF-a u opisanim uvjetima razgradnje isto kao i u dostupnoj literaturi. U istraživanju koje su proveli B. Agarwal i sur.[33] promatrana je prisilna razgradnja 1 mM otopine sofosbuvira u uvjetima lužnate hidrolize uz 0,1 M NaOH pri 70 °C kroz 10 sati, kisele hidroliza uz 0,1 M HCl pri 70 °C kroz 6 sati te oksidativne razgradnje uz 3% H₂O₂ pri sobnoj temperaturi kroz 7 dana. Termička razgradnja praćena je pri 50 °C kroz 21 dan dok je fotolitička razgradnja praćena izlaganje otopine suncu kroz 21 dan. Nakon kisele hidrolize došlo je do 23%-tne razgradnje, nakon lužnate do 50%-tne razgradnje dok je nakon oksidativne zabilježena 19%-tna razgradnja. U uvjetima termičke i fotolitičke razgradnje SOF je bio postojan. Iz usporedbe s našim rezultatima vidljiv je isti trend ponašanja SOF-a jer je isto tako bio podložan lužnatoj, kiseloj i oksidativnoj razgradnji te otporan na termičku i fotolitičku razgradnju. Isto tako iz usporedbe dobivenih kromatograma te količine razgradnih produkata s onima iz opisanog istraživanja vidljivo je također poklapanje. Značajnija razgradnja u oksidativnim uvjetima prisutna je zbog dužeg perioda izlaganja u odnosu na naš slučaj. U našem

slučaju pošto je korištena 0,1 mM otopina došlo je samo do brže razgradnje u odnosu na onu u opisanom istraživanju.[33]

Uspoređujući naše rezultate za OST s onima iz istraživanja provedenog od strane B. Narasimhan i sur.[34], također vidimo podudaranje. Oni su pratili ponašanje OST-a u uvjetima kisele hidrolize uz 1 M HCl-a pri 85 °C kroz 25 minuta, lužnate hidrolize uz 0,05 M NaOH pri sobnoj temperaturi kroz 5 sati, oksidativne razgradnje uz 30%-tni H₂O₂ pri 90 °C kroz 10 minuta te termičke razgradnje pri 100 °C kroz sat vremena. Nakon kisele hidrolize došlo je do 10% razgradnje koja je ovdje nešto veća nego u našem slučaju jer je praćena pri znatno višoj temperaturi, ali je prisutan isti trend razgradnje kao i kod nas. Prilikom lužnate razgradnje u došlo je do 25% razgradnje što je manje od naših 100% no to je zbog toga što je korištena znatno manja koncentracija NaOH, ali je također prisutan isti trend razgradnje. Rezultat oksidacije s H₂O₂ je 39% razgradnje OST-a što je znatno više u odnosu na naših 3% pošto, no razgradnja je u ovom slučaju praćena na znatno višoj temperaturi. Nakon termičke razgradnje došlo je do 10% razgradnje što je nešto više nego kod nas zbog više temperature, ali s obzirom na naš rezultat jasno je vidljivo da bi uz višu temperaturu od 40 °C došlo do znatnije razgradnje.[34] R.I. Al-Bagary i sur. [35] ispitivali su fotolitičku razgradnju OST-a pod djelovanjem UV lampe kroz 24 sata gdje nije došlo do značajne razgradnje što je u podudarnosti s dobivenim rezultatima u ovome radu.

5 Zaključak

Razgradnja sofosbuvira i oseltamivira provedena u neutralnom, lužnatom i kiselom hidrolizom, oksidacijom s H_2O_2 , te termičkim i fotolitičkim djelovanjem. Analiza uzoraka provedena je na HPLC-u prethodno validiranim metodama.

Na temelju dobivenih rezultata validacije, obje metode zadovoljavaju zahtjeve prema svim parametrima: linearnost s koeficijentom determinacije većim od 0,99, točnost s vrijednostima analitičkog povrata između 70 i 130% te preciznost s *RSD* vrijednostima manjima od 10%. Cilj provedenih pokusa prisilne razgradnje bio je istražiti ponašanje i stabilnost sofosbuvira i oseltamivira pri različitim uvjetima stresa u kojima bi se oni potencijalno mogli naći u okolišu. Iz dobivenih rezultata može se uočiti da se sofosbuvir i oseltamivir potpuno razgrađuju u uvjetima provedene lužnate hidrolize te su djelomično podložni razgradnji kiselom hidrolizom. U ostalim uvjetima kojima su bili izloženi spojevi su stabilni te dolazi do njihove minimalne ili nikakve razgradnje. S obzirom da se ipak pri većini uvjeta spojevi nisu razgradili, vjerojatnost da će se u okolišu razgraditi bez primjene vanjskih agensa je mala. To upućuje na nužnost razvitka metoda njihovog uklanjanja.

Oseltamivir i sofosbuvir su sami po sebi su vrlo stabilni u vodenom okolišu, no veliki problem predstavljaju i njihovi metaboliti koji mogu biti još stabilniji i postojaniji. Prilikom prolaska kroz proces obrade otpadnih voda iz vodenog okoliša najčešće se ne mogu kvalitetno ukloniti te na taj način dospijevaju u površinske vode. Trenutno postoji vrlo malo literaturnih podataka o toksikološkim efektima antivirotika na vodene organizme te je stoga potrebno provoditi dodatna istraživanja koja će se baviti toksičnošću i degradacijskim mehanizmima ovih spojeva.

6 Literatura

1. Q. Bu, B. Wang, J. Huang, S. Deng, G. Yu: Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review, *Journal of Hazardous Materials* **262** (2013) 189–211
2. A.B.A. Boxall, M.A. Rudd, B.W. Brooks, D.J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J.P. Staveley, T. Verslycke, G.T. Ankley, K.F. Beazley, S.E. Belanger, J.P. Berninger, P. Carriquiriborde, A. Coors, P.C. DeLeo, S.D. Dyer, J.F. Ericson, F. Gagné, J.P. Giesy, T. Guin, L. Hallstrom, M.V. Karlsson, D.G.J. Larsson, J.M. Lazorchak, F. Mastrocco, A. McLaughlin, M.E. McMaster, R.D. Meyerhoff, R. Moore, J.L. Parrott, J.R. Snape, R. Murray-Smith, M.R. Servos, P.K. Sibley, J.O. Straub, N.D. Szabo, E. Topp, G.R. Tetreault, V.L. Trudeau, G. Van Der Kraak: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions?, *Environmental Health Perspectives* **120**(9) (2012) 1221–1229
3. T. Heberer: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letters* **131** (2002) 5–17
4. S. Zrnčević: Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode* **24**(96) (2016) 119–136
5. M. Periša, S. Babić: Farmaceutici u okolišu, *Kemija u Industriji* **65**(9-10) (2016) 417–482
6. M. Kaštelan-Macan, M. Petrović: *Analitika okoliša*, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
7. V. Kumar, V. Bansal, A. Madhavan, M. Kumar, R. Sindhu, M.K. Awasthi, P. Binod, S. Saran: Active pharmaceutical ingredient (API) chemicals: a critical review of current biotechnological approaches, *Bioengineered* **13**(2) (2022) 4309–4327
8. IWW-Rheinisch-Westfaelisches Institut für Wasser: Pharmaceuticals in the environment – the global perspective: Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM (2014)
9. B. Testa, A. Pedretti, G. Vistoli: Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics, *Drug Discovery Today* **17** (2012) 549–560
10. Q. Sui, X. Cao, S. Lu, W. Zhao, Z. Qiu, G. Yu: Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review, *Emerging Contaminants* **1** (2015) 14–24

11. S. Jain, P. Kumar, R.K. Vyas, P. Pandit, A.K. Dalai: Occurrence and Removal of Antiviral Drugs in Environment: A Review, *Water, Air, & Soil Pollution* **224** (2013) 1410
12. R. Alexy, K. Kummerer: Antibiotics for Human Use u: T. Reemtsma, M. Jekel (ur.), *Organic pollutants in the Water Cycle – Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
13. OECD, *Test No. 111: Hydrolysis as a Function of pH*, 2004
14. D. Prabhakaran, P. Sukul, M. Lamshoft, M. A. Maheswari, S. Zuhlke, M. Spitteller: Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems, *Chemosphere* **77** (2009) 739–746
15. S. Babić, M. Periša, I. Škorić: Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media, *Chemosphere* **91**(11) (2013) 1635–1642
16. https://en.wikipedia.org/wiki/Antiviral_drug (pristupljeno 20. svibnja 2023.)
17. S. Kausar, F.S. Khan, M. Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M. Akram, M. Riaz, G. Rasool, A.H. Khan, I. Saleem, S. Shamim, A. Malik: A review: Mechanism of action of antiviral drugs, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **35** (2021) 1–12
18. F.R. Slater, A.C. Singer, S. Turner, J.J. Barr, P.L. Bond: Pandemic pharmaceutical dosing effects on wastewater treatment: no adaptation of activated sludge bacteria to degrade the antiviral drug Oseltamivir (Tamiflu[®]) and loss of nutrient removal performance, *FEMS Microbiology Letters* **315**(1) (2011) 17–22
19. W-J. Shin, L.B. Seong: Novel antiviral drug discovery strategies to tackle drug-resistant mutants of influenza virus strains, *Expert Opinion on Drug Discovery*, **14**(2) (2018) 1–16
20. B.E. Davies: Pharmacokinetics of oseltamivir: an oral antiviral for the treatment and prophylaxis of influenza in diverse populations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65** (2010) ii5–ii10
21. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=ee3c9555-60f2-4f82-a760-11983c86e97b> (pristupljeno 22.05.2023.)
22. D. Wang, B. Hu, C. Hu, F. Zhu, X. Liu, J. Zhang J, B. Wang, H. Xiang, Z. Cheng, Y. Xiong, Y. Zhao, Y. Li, X. Wang, Z. Peng.: Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China, *JAMA Network* **323** (2020) 1061–1069
23. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/sovaldi-epar-medicine-overview_hr.pdf (pristupljeno 25.05.2023.)
24. <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=b66d2de5-8550-4015-9c2c-d7a9150926b4#S2.2> (pristupljeno 25.05.2023.)

25. B.J. Kirby, W.T. Symonds, B.P. Kearney, A.A. Mathias: Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Drug-Interaction Profile of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase Inhibitor Sofosbuvir, *Clinical Pharmacokinetics* **54**(7) (2015) 677–690
26. J. Kovačić: Praćenje razgradnje odabrane aktivne supstance, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2021.
27. P.P. Talekar, C.M. Bhalgat, W. Zhang, Z. Huang, H.Y. Yang, F.F. Chen, K. Pokharkar, A. Nakade, N. Jambhale, N. Gharat, N. Bhoir, R. Ambule, S. Gambhir, J. Harlikar, M. Gangrade: Forced degradation studies: Regulatory considerations and implementations in analytical method development and validation, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* **5**(10) (2018) 159–166
28. International Conference on Harmonisation Guideline for Stability Testing of New Drug Substances and Products, Current Step 4 version ICH Q1A (R2) (2003)
29. International Conference on Harmonisation Guideline for Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Current Step 4 version ICH Q1B (1996)
30. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spöndlin: Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3µm particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice, *Journal of Chromatography A* **1036**(2) (2004) 127–133
31. <https://www.pharmaguideline.com/2018/04/differences-between-hplc-and-uplc.html> (pristupljeno 02.06.2023.)
32. P. Borman, D. Elder: Q2(R1) Validation of Analytical Procedures u: A. Teasdale, D. Elder, R.W. Nims (ur.), *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, John Wiley & Sons, New York, 2017.
33. B. Agarwal, S. Jagdale, S. Gandhi: Forced Degradation Study of Sofosbuvir: Identification of Degradation Products by LC-ESI-MS, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* **58**(2) (2022) 181–188
34. B. Narasimhan, K. Abida, K. Srinivas: Stability Indicating RP-HPLC Method Development and Validation for Oseltamivir API, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **56**(4) (2008) 413–417
35. R.I. Al-Bagary, A.A. El-Zaher, F.A. Morsy, M.M. Fouad: Kinetic Study of the Alkaline Degradation of Oseltamivir Phosphate and Valacyclovir Hydrochloride using Validated Stability Indicating HPLC, *Analytical Chemistry Insights* **9** (2014) 41–48

Životopis

Filip Tomić [REDACTED] Osnovnu školu pohađao je u Zaprešiću, a paralelno je završio i Osnovnu glazbenu školu Zlatka Balokovića, također u Zaprešiću. Opći smjer Gimnazije Lucijana Vranjanina u Zagrebu upisuje 2013. Maturirao je 2017. te iste godine upisuje preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Stručnu praksu odradio je u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ u službi kemijsko-fizikalnih i toksikoloških vještačenja na odjelu Forenzične toksikologije. Preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva završava 2021. obranivši završni rad pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Šime Ukića na temu *Uklanjanje dibutil ftalata iz vodenog medija* čime stječe zvanje sveučilišnog prvostupnika inženjera kemijskog inženjerstva. Iste godine upisuje diplomski studij Kemijskog inženjerstva, modul Kemijske tehnologije i proizvodi na matičnom fakultetu.