Prisilna razgradnja atazanavira i nirmatrelvira

Večenaj, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:149:079140

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Luka Večenaj

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Luka Večenaj

PRISILNA RAZGRADNJA ATAZANAVIRA I NIRMATRELVIRA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: znanstveno-nastavno radno mjesto: prof. dr. sc. Šime Ukić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. znanstveno-nastavno radno mjesto: prof. dr. sc. Šime Ukić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
2. znanstveno-nastavno radno mjesto: doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
3. znanstveno-nastavno radno mjesto: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Zagreb, travanj 2024.

Ovaj diplomski rad je napisan u sklopu projekta Okolišni aspekti SARS-CoV-2 antivirotika (EnA-SARS, IP-2022-10-2822) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Prvenstveno, zahvaljujem se svojem mentoru prof. dr. sc. Šimi Ukiću na pruženoj prilici za izradom diplomskog rada pod njegovim mentorstvom te pomoći i vodstvu prilikom izrade ovog rada.

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

Zahvaljujem se svojoj Ani, koja mi je bila velika podrška tijekom cijelog trajanja studija. Hvala ti na bezuvjetnoj motivaciji i ljubavi.

Naposljetku, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i podršci tijekom studiranja.

SAŽETAK

U zadnjih nekoliko desetljeća razvoj farmaceutika i njihova primjena u medicini su znatno poboljšali kvalitetu ljudskog života. No, uslijed njihove proizvodnje i korištenja dospijevaju u okoliš gdje predstavljaju opasnost za organizme u njemu. Farmaceutici, njihovi metaboliti i nusprodukti u okolišu mogu biti vrlo postojani i akumulirati se što može rezultirati visokim koncentracijama koje djeluju toksično na cijeli ekosustav. Zbog toga potrebno je istražiti njihovu stabilnost i postojanost u okolišu te istražiti moguće razgradne produkte koji pri tome nastaju.

U ovom radu ispitana je stabilnost i ponašanje dvaju farmaceutika, atazanavira i nirmatrelvira, provođenjem testova prisilne razgradnje. Prisilna razgradnja se provodila na 0,003 mM otopini atazanavira i 0,1 mM otopini nirmatrelvira u uvjetima: lužnate hidrolize s 1,0 M NaOH na sobnoj temperaturi tijekom 24 h, kisele hidrolize s 1,0 M HCl na sobnoj temperaturi tijekom 24 h, oksidacijskom razgradnjom s 30% H_2O_2 na sobnoj temperaturi tijekom 24 h, termičko razgradnjom pri temperaturama od 30 i 40 °C tijekom 7 dana, neutralne hidrolize na sobnoj temperaturi (25 °C) tijekom 7 dana i fotolitičke razgradnje djelovanjem UV svjetlosti jačine 600 W/m^2 pri 25 °C tijekom 6 sati. Analize svih uzoraka su se provodile na HPLC-u te su u tu svrhu razvijene i validirane HPLC metode.

Za razvijene metode utvrđeno je da zadovoljavaju sve kriterije validacije: linearnost s koeficijentom determinacije većim od 0,9900, točnost s analitičkim povratom između 70 i 130% te preciznost s *RSD* vrijednostima manjim od 10%. Rezultati ispitivanja prisilne razgradnje pokazali su očekivanu stabilnost ispitivanih spojeva pri većini primijenjenih uvjeta.

Ključne riječi: atazanavir, nirmatrelvir, prisilna razgradnja

ABSTRACT

In recent decades, the development of pharmaceuticals and their use in medicine have significantly improved quality of human life. However, as a result of their production and use, they end up in the environment, where they pose a risk to the organisms living in it. Pharmaceuticals, their metabolites and degradation products can be very persistent and accumulate in the environment, which can lead to high concentrations that have a toxic effect on the ecosystem. For this reason, it is necessary to investigate their stability and persistence in the environment as well as the possible degradation products that are formed.

In this work, the stability and behavior of two pharmaceuticals, atazanavir and nirmatrelvir, were tested by forced degradation experiments. Forced degradation was performed with a 0.003 mM solution of atazanavir and a 0.1 mM solution of nirmatrelvir under the following conditions: alkaline hydrolysis in the presence of a 1.0 M NaOH solution at room temperature for a period of 24 hours, acid hydrolysis in the presence of a 1.0 M HCl solution at room temperature over a period of 24 hours, oxidation in the presence of a 30% H_2O_2 solution at room temperature over a period of 5 hours, thermal decomposition at 30 °C and 40 °C over a period of 7 days, neutral hydrolysis at room temperature (25 °C) over a period of 7 days and photolytic decomposition under UV light at 600 W/m^2 at 25 °C over a period of 6 hours. HPLC methods were developed and validated for analysis of atazanavir and nirmatrelvir. The developed methods were found to fulfill all validation criteria: linearity with a coefficient of determination above 0.9900, accuracy with recoveries between 70 and 130% and precision with *RSD* values of less than 10%. The results of the forced degradation tests showed the expected stability of the tested compounds under most of the applied conditions.

Key words: atazanavir, nirmatrelvir, forced degradation

SADRŽAJ

1.Uvod 1

2. Teorijski dio 2

2.1. Farmaceutici 2

2.2. Antivirotici 2

2.1.1. Atazanavir 3

2.1.2. Nirmatrelvir 4

2.3. Prisilna razgradnja 5

2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 6

2.5. Validacija metode 8

2.4.1. Linearnost 9

2.4.2. Točnost 9

2.4.3. Preciznost 9

2.4.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije 10

3. Eksperimentalni dio 11

3.1. Kemikalije i reagensi 11

3.2. Popis instrumenata i opreme 11

3.3. Eksperimentalni dizajn 12

3.3.1. Validacija LC metoda za analizu atazanavira i nirmatrelvira 12

3.3.2. Prisilna razgradnja 12

4. Rezultati i rasprava 15

4.1. Validacija LC metoda 15

4.1.1. Linearnost 15

4.1.2. Točnost 19

4.1.3. Preciznost 22

4.1.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije 24

4.2. Prisilna razgradnja 24

4.2.1. Lužnata hidroliza 24

4.2.2. Kisela hidroliza 25

4.2.3. Oksidacija vodikovim peroksidom 25

4.2.4. Termička razgradnja 26

4.2.6. Fotolitička razgradnja 27

4.2.7. Usporedba svih pripremljenih postupaka razgradnje 27

5. Zaključak 29

6. Literatura 30

Životopis 34

1.Uvod

Farmaceutici su spojevi koji se upotrebljavaju za terapiju i preventivu kod ljudi i životinja te kao promotori rasta u veterinarskoj medicini. [1] Veliki dio farmaceutika koji se koriste za liječenje ljudi ili životinja završava u otpadnim vodama, rijekama, jezerima i morima te također može dospjeti u vodu za piće. Dokazano je da u okolišu mogu biti prisutne sve vrste farmaceutika (analgetici, antibiotici, hormoni, antidepresivi, antivirotici i dr.). Koncentracije farmaceutika u okolišu su obično niske, ali rizik svejedno postoji jer su to biološki aktivne supstance koje izazivaju učinke i pri vrlo niskim dozama. Pojava svakog lijeka u okolišu izravno je povezana s intenzitetom njegove primjene. [2] Farmaceutici su u okolišu izloženi okolišnim uvjetima te podliježu abiotičkim (hidroliza i fotoliza) i biotičkim (biološka razgradnja bakterijama i gljivicama) procesima razgradnje. Navedenim procesima dolazi do smanjenja početne koncentracije farmaceutika te nastanka novih spojeva, odnosno razgradnih produkata, koji mogu biti više ili manje stabilni u odnosu na početnu molekulu farmaceutika. Nastali produkti razgradnje mogu biti toksičniji od polazne supstance. [1,3] Međunarodna konferencija za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove (eng. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*; ICH) ima za cilj postići usklađenost u cijelom svijetu za razvoj i odobravanje sigurnih, učinkovitih i visoko kvalitetnih lijekova na resursno efikasan način. [4]

S pojavom pandemije SARS-CoV-2 virusa počinju se intenzivno koristiti antivirotici za liječenje te bolesti. Mnoge antivirusne supstance su relativno nove te nedostaju informacije o njihovom ponašanju u okolišu. Međutim, dio njih je od prije poznat te se koriste u različitim kombinacijama s drugim farmaceuticima za liječenje COVID-19 infekcije. Takve kombinacije antivirusnih supstanci s ostalim farmaceuticima predstavljaju potencijalni rizik za okoliš jer se zbog sinergističkog učinka mogu ponašati toksičnije nego zasebno. Potrebno je istražiti njihovu sudbinu i ponašanje (razgradnju i ekotoksičnost) u okolišu te istražiti procese koji bi ih mogli učinkovito uklanjati iz okoliša. [5]

2. Teorijski dio

2.1. Farmaceutici

Svaki farmaceutik sadrži farmaceutski aktivnu tvar (eng. *active pharmaceutical ingredient*; API) i pomoćne tvari (služe za stabilizaciju, suspendiranje, otapanje, emulgiranje, i konzerviranje, ili pak daju boju, miris i okus gotovom lijeku). API je glavni sastojak svakog farmaceutskog pripravka. On može biti prirodnog ili sintetskog podrijetla te su to čiste kemijske tvari ili mješavine tvari koje imaju odgovarajuću farmakološku aktivnost. [6] Pomoćne tvari oblikuju ljekovitu supstancu u učinkovit i prikladan dozirni oblik, ali mogu i pomoći u terapijskom djelovanju lijeka te pridonijeti njegovoj boljoj podnošljivosti. [3] Primarne karakteristike svakog farmaceutika su biološka aktivnost, lipofilnost, parcijalna topljivost u vodi, biorazgradivost i toksičnost. [7] Nakon primjene lijeka, on prolazi razne metaboličke procese u ljudskom tijelu pri čemu nastaju metaboliti koji su topivi u vodi te često otrovniji od polazne supstance. Metaboliti i ostaci farmaceutika se iz ljudskog tijela izlučuju i dospijevaju u komunalne otpadne vode. [3,8] Zbog nedovoljno učinkovitog uklanjanja na postrojenjima za obradu otpadnih voda farmaceutici dospijevaju u okoliš gdje se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava vežu na tlo i sediment te podliježu abiotičkim (hidroliza i fotoliza) i biotičkim (biološka razgradnja bakterijama i gljivicama) procesima razgradnje. Rezultat procesa razgradnje je smanjenje početne koncentracije farmaceutika, međutim pri tome nastaju novi spojevi koji mogu biti stabilniji i toksičniji od početnih spojeva. [1] Također mogu dospjeti u površinske i podzemne vode. [8] Ostali načini ulaska farmaceutika u okoliš su bolnice (nepropisno odlaganje neiskorištenih lijekova) i farmaceutska industrija (gubitci iz proizvodnih pogona). Ostaci lijekova i njihovi produkti su biološki aktivni spojevi, koji su razvijeni s ciljem izazivanja bioloških učinaka pri niskim dozama, pa su dovoljni i tragovi farmaceutika za nepoželjno djelovanje na ljude i cijeli ekosustav. [3] Također, iako se ispuštaju u niskim koncentracijama u okoliš, kontinuiranim unošenjem farmaceutika u okoliš se povećava njihova koncentracija s dugoročno negativnim posljedicama po okoliš. [1]

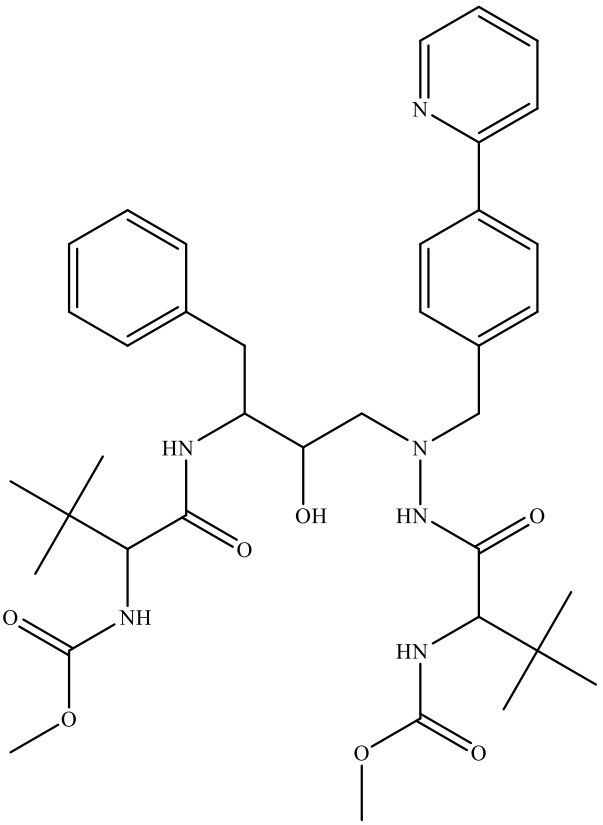
2.2. Antivirotici

Antivirotici su lijekovi koji se koriste za liječenje virusnih infekcija. Prvi antivirotik, idoksuridin, je dopušten za upotrebu 1963. te je od tada u upotrebu pušteno još 90 antivirotika

koji služe za liječenje virusnih infekcija kod ljudi i životinja. Neke od najčešćih virusnih infekcija su uzrokovane virusom humane imunodeficijencije (HIV), hepatitisa B, hepatitisa C, influenca, humanim papiloma virusom (HPV) itd. Djelovanje antivirotika ovisi o vrsti virusa, ali oni općenito inhibiraju enzime koji omogućuju replikaciju virusa. [9] Antivirotici dospijevaju u okoliš nakon upotrebe putem izlučivanja iz ljudskog tijela. Prisutnost antivirotika je otkrivena u otpadnim vodama, podzemnim vodama, površinskim vodama, moru i tlu. U okolišu predstavljaju ozbiljnu prijetnju jer su visoko biološki aktivni, otporni su na konvencionalne biološke metode razgradnje, kemijski su stabilni u vodi i lipofilni. Glavni problem predstavlja mogućnost nastanka antivirusne rezistencije kod ljudi i životinja. Zbog svega toga potrebno je razviti osjetljive i robusne analitičke metode koje će moći detektirati antivirotike u vrlo malim koncentracijama. Također, potrebno je ispitati njihovu stabilnost i razgradnju u okolišnim uvjetima. [10]

2.1.1. Atazanavir

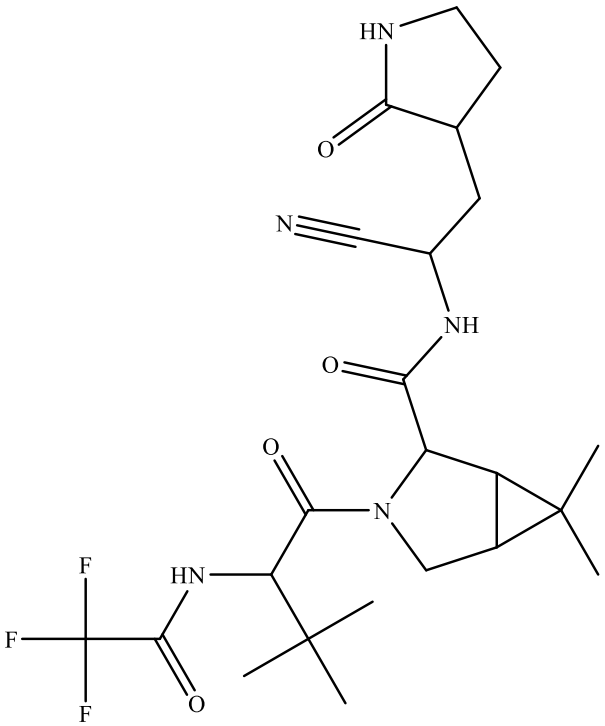
Atazanavir (ATV) je bijeli do slabo žućkasti prah slabo topljiv u vodi koji se najčešće nalazi u obliku sulfatne soli. Molekulska formula atazanavir sulfata je $C_{38}H_{54}N_6O_{11}S$ (M = 802,9 g/mol), a kemijska struktura je prikazana na Slika 1. Najčešće se koristi u kombinaciji s drugim antiviroticima za liječenje osoba zaraženih virusom HIV-a. [11] Odobren je za upotrebu od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) 2003. godine i stavljen na tržište od strane tvrtke Bristol-Myers pod nazivom Reyataz. [12,13] Godinu dana kasnije odobren je za upotrebu pod istim imenom od Europske agencije za lijekove (EMA). Od 2019. godine ga kao generički lijek na tržište stavlja farmaceutska kompanija Krka pod nazivom Atazanavir Krka. [14] Atazanavir sulfat sprečava reprodukciju HIV-a i pripada skupini antivirotika inhibitora proteaze. Atazanavir se razlikuje od drugih antivirotika za liječenje AIDS-a u tome što je potrebno uzimati samo jednu dozu dnevno te ima manje negativnih utjecaja na pacijenta (ne smanjuje količinu kolesterola i drugih masnih komponenata u krvi). [15] Tijekom COVID-19 pandemije počinje se koristiti u liječenju zaraženih SARS-CoV-2 virusom čime dolazi do intenziviranja njegove upotrebe, a samim time i povećanja količina atazanavira koje dospijevaju u okoliš. [16]



Slika 1. Strukturna formula atazanavira

2.1.2. Nirmatrelvir

Nirmatrelvir (NMV) je bijeli prah topljiv u metil izobutil ketonu, 1-butanolu i izopropil acetatu. Slabo je topljiv u anisolu, *n*-propil acetatu i *n*-butil acetatu te je netopljiv u heptanu. Njegova molekulska formula je $C_{23}H_{32}F_3N_5O_4$ (M = 499,5 g/mol) te je na Slika 2 prikazana njegova kemijska struktura. [17] Paxlovid je lijek razvijen od strane kompanije Pfizer i sastoji se od dvije aktivne supstance: NMV-a i ritonavira. Godine 2021., Američka agencija za lijekove (FDA) i Europska agencija za lijekove (EMA) dale su dopuštenje za upotrebu Paxlovida za liječenje COVID-19 infekcije. NMV je SARS-CoV-2 inhibitor proteaze te on blokira virusne poliproteine i na taj način zaustavlja daljnju reprodukciju virusa. Ritonavir nema direktan učinak na virus, ali on inhibira metabolizam nirmatrelvira i održava njegovu konstantnu koncentraciju u krvi. Paxlovid se pokazao učinkovitim za sprečavanje progresije COVID-19 infekcije kod visokorizičnih pacijenata. [18,19] NMV se intenzivno koristio za liječenje tijekom pandemije, pa su velike količine dospjele u okoliš.



Slika 2. Kemijska struktura nirmatrelvira

2.3. Prisilna razgradnja

Prisilna razgradnja je razgradnja farmaceutika pod stresnim uvjetima. Ona je potrebna kako bi se prikazala stabilnost farmaceutika pri različitim uvjetima, definirali se procesi razgradnje i nastali produkti. [20] Prisilna razgradnja je opisana različitim smjernicama koje su izdane od strane raznih organizacija: ICH, EMA, FDA i USP. [21] ICH je objavila skup smjernica koje daju upute i informacije o degradaciji i stabilnosti različitih tipova farmaceutika. [22] Stabilnost farmaceutika je vrlo važna kako bi se osigurala njegova kvaliteta tokom uporabe. Prisilnom razgradnjom se želi proučiti kako kvaliteta farmaceutika varira pod utjecajem različitih stresnih uvjeta u određenom vremenskom periodu. Ona se najčešće provodi pri povišenim temperaturama, širokom rasponu pH vrijednosti (kiseli, alkalni i neutralni uvjeti), pod utjecajem svjetla i u oksidativnim uvjetima. [20]

Hidrolitička razgradnja se provodi u širokom rasponu pH vrijednosti. Provodi se u kiselim i alkalnim uvjetima pri čemu dolazi do reakcija hidrolize između karakterističnih funkcionalnih skupina u farmaceutiku s kiselinom ili lužinom. Za kiselu hidrolizu se najčešće upotrebljava HCl ili H_2SO_4 koncentracija 0,1–1,0 M, a za alkalnu se upotrebljava KOH ili NaOH koncentracija 0,1–1,0 M. Hidrolitička razgradnja se najčešće provodi pri sobnoj

temperaturi te ukoliko pri navedenoj temperaturi ne dolazi do razgradnje, temperatura se povisuje na 50–70 °C. Preporuka je da se razgradnja provodi maksimalno 7 dana. [20]

Oksidacijska razgradnja se provodi najčešće uz vodikov peroksid, ali se mogu koristiti i drugi oksidansi (metalni ioni, kisik i ozon). Oksidans, njegova koncentracija i uvjeti razgradnje se biraju prema stabilnosti farmaceutika. Obično se upotrebljava 3–30% H_2O_2, a razgradnja se provodi pri sobnoj temperaturi i najviše 7 dana. U slučaju da je razgradnja veća od 20% u kratkom vremenskom razdoblju smanjuje se koncentracija oksidansa. [20,21]

Fotolitička razgradnja se provodi izlaganjem farmaceutika svjetlosti iz UV i vidljivog dijela spektra. Prilikom razgradnje potrebno je temperaturu održavati konstantnom kako ona ne bi utjecala na mehanizam razgradnje. Svjetlost kojoj se izlaže uzorak mora biti u rasponu 300–800 nm i najveće jačine 600 W/m^2. Trenutno ne postoje smjernice kolika bi se razgradnja trebala postići, ali razgradnja 5–30% se u industrijskoj praksi smatra prihvatljivom. [20]

Termička razgradnja se treba provoditi pri uvjetima intenzivnijim od onih koje propisuje ICH Q1A smjernica. Razgradnja se provodi maksimalno 7 dana pri temperaturama 20–80 °C. Za kraće periode razgradnje preporuka je koristiti više temperature. [21]

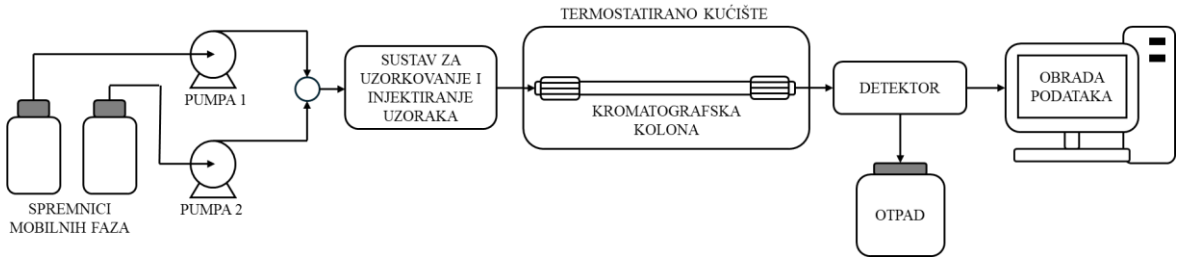
Generalno gledajući, prisilna razgradnja se ne smije provoditi u previše intenzivnim uvjetima jer može doći do pojave sekundarne razgradnje razgradnih produkata i tada su dobiveni rezultati nerealni. Ukoliko se razgradnja provodi pri preblagim uvjetima ne mogu se definirati svi mehanizmi razgradnje i produkti. Preporuka je da se razgradnja provodi tako dugo dok se ne razgradi 5–20% početne koncentracije farmaceutika. [22]

2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je fizikalna separacijska tehnika u kojoj se komponente uzorka raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, dok se druga faza, pokretna, giba u određenom smjeru. Ispitivana tvar (analit) se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze. Zbog dinamičke ravnoteže dolazi do narušavanja ravnotežnog stanja i to uzrokuje da dio molekula putuje zajedno s mobilnom fazom u smjeru gibanja. Nepokretna faza selektivno zadržava dio molekula u različitim vremenskim periodima što uzrokuje separaciju, odnosno razdvajanje komponenata u smjesi. Kromatografske tehnike se mogu podijeliti s obzirom na prirodu ravnoteže na: razdjelnu kromatografiju, adsorpcijsku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju, kromatografiju

isključenjem i ionsku izmjenjivačku kromatografiju. Zatim se kromatografske tehnike mogu podijeliti na temelju sastava pokretne faze na: plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Podjela kromatografskih tehnika prema obliku nepokretne faze: plošna i kolonska kromatografija. [23,29]

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Perfomance Liquid Chromatography*; HPLC) je oblik kromatografije na koloni koji se često koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. [25] Vrlo je pogodna za praćenje prisilne razgradnje farmaceutika jer je njome moguće razdvojiti produkte nastale razgradnjom od početnog farmaceutika. [26] HPLC se razlikuje od klasične tekućinske kromatografije jer koristi znatno više tlakove (do 400 bara), upotrebljavaju se kolone s malim promjerom te malim veličinama čestica punila (< 10 μm), protoci mobilnih faza su veliki (0,1–5,0 mL/s) i koriste se osjetljiviji detektori koji omogućuju detekciju malih količina analita. [24] Zbog svega toga analiza je puno brža i neke prednosti ovog tipa kromatografije su: visoka osjetljivost, prilagodljivost, analiza termički osjetljivih spojeva i širok spektar uzoraka. Glavni dijelovi HPLC instrumenta su: pumpe, sustav za uzorkovanje i injektiranje uzoraka, kromatografska kolona i detektor. Glavne komponente HPLC sustava su shematski prikazane na Slika 3.



Slika 3. Shematski prikaz HPLC sustava

Na separaciju komponenata iz uzorka utječu mnogi faktori kao što su: sastav mobilne faze, temperatura i vrsta kolone. [25] Princip rada HPLC-a je da se mobilne faze iz spremnika pomoću pumpa transportiraju u komoru za miješanje. Omjer mobilnih faza se namješta pomoću ventila i on može bit konstantan, pa se tada radi o izokratnoj eluciji. Ukoliko se omjer mijenja u vremenu onda se radi o gradijentnoj eluciji. Iz komore za miješanje mobilna faza se dalje kreće prema sustavu za uzorkovanje i injektiranje. Uzorak se preko tzv. injekcijske petlje unosi u mobilnu fazu te se dalje nosi prema kromatografskoj koloni. [27] Kolone su ispunjene stacionarnom fazom različite vrste i veličine čestica punila. Kolone su obično termostatirane u kućištu jer je temperatura bitan faktor za očuvanje preciznosti vremena zadržavanja, selektivnosti i učinkovitosti separacije. [28] Tijekom prolaska analita kroz

kolonu uspostavljaju se interakcije analita i stacionarne faze što rezultira razdvajanjem analita od matrice uzorka. Do separacije dolazi jer komponente uzorka izlaze iz kolone u različitim vremenima te dolaze na detektor. Prolaskom analita kroz detektor stvara se signal koji je proporcionalan koncentraciji. Razlikuje se nekoliko vrsta detektora, kao što su: refrakcijski, UV/VIS, DAD, flourescentni, konduktometrijski i spektrometar masa. Analit i mobilna faza nakon prolaska kroz detektor odlaze u otpad. Signal koji nastaje na detektoru se obrađuje i prikazuje na računalo kao pik na kromatografskoj krivulji. [27]

2.5. Validacija metode

Validacija neke metode je postupak kojim se potvrđuje i dokumentira prikladnost analitičkog sustava za određenu namjenu. Odnosno, to je jamstvo da će svaki budući rezultat dobiven tom metodom zadovoljiti kriterij prihvaćanja. Prilikom pripreme za postupak validacije potrebno je koristiti analitičku opremu koja je jasno definirana, kalibrirana i karakterizirana te osigurati dovoljnu količinu standarda poznate čistoće i sadržaja. Ljudi koji rade na postupku validacije moraju biti upoznati s tehnikama rada i biti osposobljeni za rad na instrumentu. Tokom postupka validacije, metoda mora zadovoljiti nekoliko kriterija: specifičnost, prikladnost sustava, selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, robusnost, granice detekcije i kvantifikacije, stabilnost, ponovljivost i raspon metode. Validacija metode se može provoditi za nenormirane metode, metode razvijene u vlastitom laboratoriju, za modifikacije postojeće metode i kada se normirana metoda želi primijeniti izvan normiranog područja. [30,31]

Selektivnost metode je sposobnost da se precizno mjeri količina analita u prisutnosti drugih komponenata bez interakcija među njima. Specifičnost se definira kao sposobnost metode da može uspješno procijeniti i otkriti analit. Stabilnost metode je procjena dopuštenog vremena između prikupljanja uzoraka i analize. Što je stabilnost veća to može proći više vremena između prikupljanja uzoraka i njihove analize. Robusnost metode je mjera njezine mogućnosti da ostane nepromijenjena uvođenjem malih, ali namjernih varijacija parametara metode i ona daje indikaciju o pouzdanosti metode tijekom normalne upotrebe. Prikladnost sustava je skup parametara koji potvrđuju efektivnost i prikladnost odabranog sustava te se time potvrđuje da je sustav valjan za određenu namjenu. [30] U sljedećim odlomcima će se nešto više reći o njima.

2.4.1. Linearnost

Linearnost je svojstvo metode da unutar danog raspona zadanih koncentracija daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentracijama analita u uzorku. Određuje se postupkom umjeravanja ili kalibracije, odnosno mjerenjem odziva standardnih otopina različitih koncentracija analita i analizom ovisnosti odziva o koncentraciji. Za potvrdu linearnosti se najčešće koristi koeficijent determinacije, R^2, koji mora biti iznad 0,9900. Svrha kalibracije je smanjiti ili ukloniti pogrešku mjernog sustava. [30,31]

2.4.2. Točnost

Točnost metode je slaganje srednje vrijednosti niza ponovljenih mjerenja i unaprijed definirane referentne, odnosno prave vrijednosti. Razlike u vrijednostima su posljedica sustavne pogreške. Kao kriterij točnosti se najčešće koristi analitički povrat koji se računa prema jednadžbi (1). Analitički povrat se mora uobičajeno nalaziti između 70 i 130% kako bi se rezultati smatrali točnima. [30,31]

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

2.4.3. Preciznost

Preciznost je stupanj podudaranja više nezavisnih rezultata izvedenih iz istog homogenog uzorka, odnosno predstavlja raspršenost podataka oko srednje vrijednosti dobivene ponovljenim ispitivanjem uzoraka. Pokazatelj je postojanja slučajne pogreške te se izražava kao standardno odstupanje i relativno standardno odstupanje (*RSD*). Preciznost obuhvaća tri razine: ponovljivost, obnovljivost i međupreciznost. Ponovljivost je preciznost pri istim ispitnim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Obnovljivost se definira kao mjerenje izvedeno na identičnom uzorku ali u različitim laboratorijima te se koristi kod međulaboratorijskih usporedbi. Međupreciznost se definira kao preciznost pri različitim uvjetima. U ovom radu je preciznost iskazana preko *RSD* vrijednosti koja se računa prema jednadžbi (2). [30,31]

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

Pri tome je s standardno odstupanje, a $\bar{x}$ srednja vrijednost izmjerenih podataka.

2.4.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (*GD*) je najmanja količina analita u uzorku koju je moguće razlučiti od pozadinskog signala (šuma), ali se ne mora nužno moći kvantificirati. Granica kvantifikacije (*GK*) se definira kao najmanja količina analita u uzorku koju je moguće kvantitativno odrediti uz odgovarajuću točnost i preciznost. *GD* i *GK* je moguće računski odrediti primjenom jednadžbi (3) i (4) [30,31].

$$GD = \frac{3{,}3 \cdot \sigma}{a} \tag{3}$$

$$GK = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \tag{4}$$

Pri tome je σ standardna devijacija eksperimentalno dobivene najniže koncentracije, a a je nagib kalibracijskog pravca.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Kemikalije i reagensi

Kemikalije i reagensi koju su se upotrebljavali za prisilnu razgradnju i validaciju metoda za određivanje ATV-a i NMV-a su navedeni u Tablica 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija i reagensa

Kemikalija	Formula	Čistoća	Proizvođač	Država
Atazanavir sulfat	$C_{38}H_{52}N_6O_7 \cdot 0{,}25H_2SO_4$	Krutina, 96,2%	Sigma-Aldrich	US
Kalijev dihidrogenfosfat	KH_2PO_4	Krutina, ≥ 99,5%	Alkaloid	MK
Klorovodična kiselina	HCl	Otopina, 37%	VWR	US
Metanol	CH_3OH	Otopina, HPLC stupanj	J.T. Baker	US
Natrijev hidroksid	NaOH	Krutina, 99,3%	Lachner	CZ
Nirmatrelvir	$C_{23}H_{32}F_3N_5O_4$	Krutina, ≥ 95%	Biosynth	UK
Vodikov peroksid	H_2O_2	Otopina, 30%	Gram-mol	HR
Acetonitril	C_2H_3N	Otopina, HPLC stupanj	Fischer Chemicals	US
Mravlja kiselina	HCOOH	Otopina, 98%	Lach-Ner	HR

3.2. Popis instrumenata i 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
- Filtracijski sustav za proizvodnju ultračiste 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

- Suntest uređaj Atlas Material Testing Technology GmbH, model CPS+, US
- Ultrazvučna kupelj Rocker, model Soner 210, TW
- Termostat, Termo medicinski aparati Bodalec & Havoić, model EBT, HR

3.3. Eksperimentalni dizajn

3.3.1. Validacija LC metoda za analizu atazanavira i nirmatrelvira

Temeljne standardne otopine (*stock* otopine) ATV-a i NMV-a pripremljene su otapanjem 0,25 mg standarda ATV-a, odnosno 1,61 mg standarda NMV-a u 25 mL ultračiste vode. Iz temeljnih standardnih otopina pripremljena su razrjeđenja za kalibraciju u rasponu koncentracija od 0,0005 do 0,0100 mM za ATV te od 0,001 do 0,125 mM za NMV. Navedene otopine su pripremane u triplikatu, a svaka od pripremljenih otopina analizirana je tri puta.

Za analizu oba spoja su razvijene dvije različite HPLC metode. Detaljne karakteristike metoda navedene su u Tablica 2.

Tablica 2. HPLC metode analize atazanavira i nirmatrelvira.

	Atazanavir	**Nirmatrelvir**
Kromatografska kolona	XBridge C18 (4,6×150 mm, promjer punila 3,5 µm)	
Način eluiranja	Izokratno	
Sastav mobilne faze	60% HCOOH i 40% CH_3OH	38% C_2H_3N i 62% 20 mM KH_2PO_4
Protok	1 mL min^{-1}	
Volumen injekcije	20 µL	10 µL
Temperatura pećnice	40 °C	
Valna duljina detekcije	248 nm	217 nm
Trajanje analize	20 min	

3.3.2. Prisilna razgradnja

Nakon validacije LC metoda za analizu ATV-a i NMV-a provedena je prisilna razgradnja. Prisilne razgradnje oba spoja provedene su: neutralnom, alkalnom i kiselom

hidrolizom, oksidacijom vodikovim peroksidom te termičkom i fotolitičkom razgradnjom. Razgradnje ATV-a su provedene na otopinama početnih koncentracija 0,003 mM, što je bila maksimalna topivost ATV-a u ultračistoj vodi, a razgradnje NMV-a na otopinama početnih koncentracija 0,1 mM. Neutralna hidroliza je praćena na sobnoj temperaturi tijekom perioda od 7 dana, odnosno 168 sati u tamnim bočicama na otopinama spojeva bez dodatka ikakvog reagensa što je ujedno poslužilo i kao slijepa proba za ostale razgradnje.

3.3.2.1. Lužnata hidroliza

Lužnata hidroliza provodila se s 1 M otopinom NaOH koja je pripravljena otapanjem 10 g krutog NaOH u 250 mL ultračiste vode.

Lužnata hidroliza ATV-a se provodila u odmjernoj tikvici od 50 mL pri čemu je dodano 49 mL 0,003 mM otopine atazanavira i 1 mL 1 M otopine NaOH. Razgradnja se pratila 3h, a uzorci su uzimani svakih 30 min. Lužnata hidroliza NMV-a se provodila u odmjernoj tikvici od 50 mL pri čemu je dodano 10 mL 1 M otopine NaOH i 40 mL 0,1 mM otopine nirmatrelvira. Razgradnja se pratila 3 h pri čemu su uzorci uzimani svakih 30 min. Uzorci su još uzeti i nakon 24 h kod oba spoja.

3.3.2.2. Kisela hidroliza

Kisela hidroliza provodila se s 1 M otopinom HCl koja je pripravljena razrjeđivanjem 20,5 mL 37%-tne otopine HCl u 250 mL vode.

Razgradnja se provodila u odmjernoj tikvici od 50 mL pri čemu je dodano 25 mL 1 M otopine HCl i 25 mL 0,1 mM otopine NMV-a, odnosno 0,003 mM otopine ATV-a. Razgradnja se u oba slučaja pratila 5 h. Uzorci su tijekom prvog sata uzimani svakih 30 min, nakon toga svakih sat vremena do petog sata te nakon 24 h od početka eksperimenta.

3.3.2.3. Oksidacija vodikovim peroksidom

Prisilna razgradnja oksidacijom se provodila s 30%-tnom otopinom H_2O_2 u odmjernoj tikvici od 50 mL.

Razgradnja ATV-a se provodila na način da je dodano 5 mL otopine H_2O_2 i 45 mL 0,003 mM otopine ATV-a. Razgradnja NMV-a se provodila na način da je dodano 10 mL

otopine H_2O_2 i 40 mL 0,1 mM otopine NMV-a. Razgradnja se pratila 5 h te su uzorci uzimani svakih 30 min prva 2 sata, a nakon toga svakih sat vremena do petog sata. Uzorci su još uzeti nakon 24 h.

3.3.2.4. Termička razgradnja

Termička razgradnja spojeva provodila se tijekom 7 dana u termostatima, u tamnim bočicama pri temperaturama 30 i 40 °C.

3.3.2.5. Fotolitička razgradnja

Fotolitička razgradnja spojeva se provodila na Sunset uređaju gdje su uzorci bili izloženi svjetlosti valnih duljina 300–800 nm. Jačina svjetlosti kojom su osvjetljavani uzorci je bila 600 W/m^2 na 25 °C. Razgradnja je praćena kroz 6 h, te su se uz osvijetljene uzorke, radile i tamne slijepe probe na način da su kivete omotane aluminijskom folijom stavljene u uređaj pokraj osvijetljenih uzoraka.

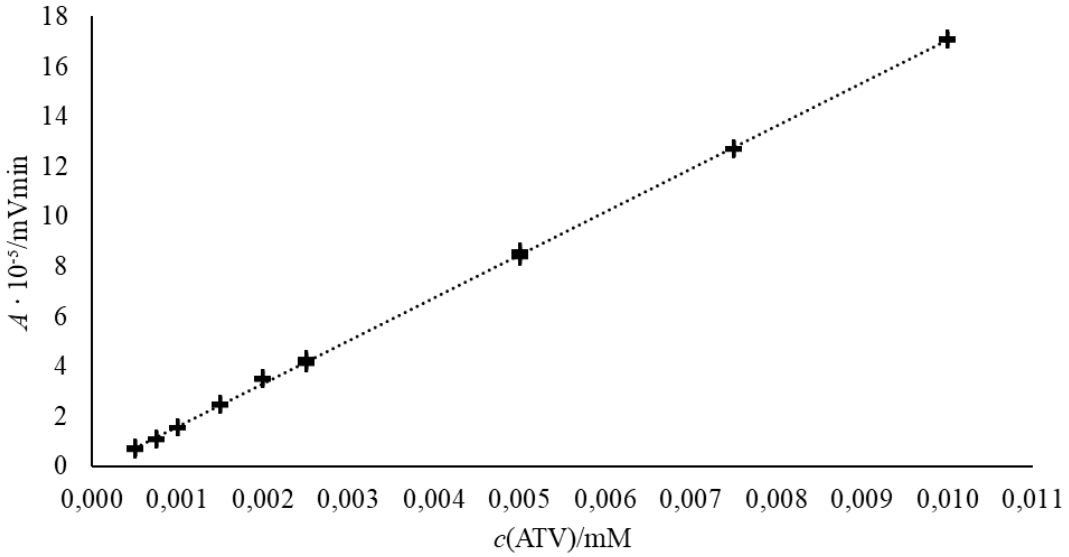
4. Rezultati i rasprava

4.1. Validacija LC metoda

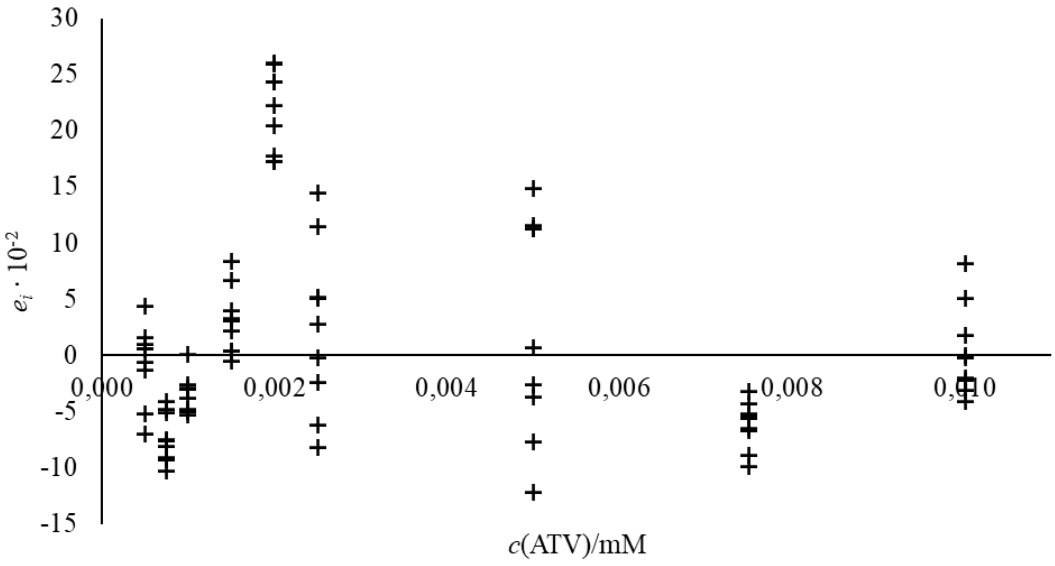
Za analizu ATV-a i NMV-a razvijene su i validirane HPLC metode. Određene su linearnost, točnost i preciznost metoda te njihove granice kvantifikacije i detekcije. Granice kvantifikacije i detekcije određene su računski primjenom jednadžbi (3) i (4) uz korištenje standardne devijacije uzorka najniže koncentracije pojedinog analita.

4.1.1. Linearnost

Linearnost je određena postupkom kalibracije, odnosno preko kalibracijskog pravca. Na Slika *4* je prikazan kalibracijski pravac dobiven za ATV.

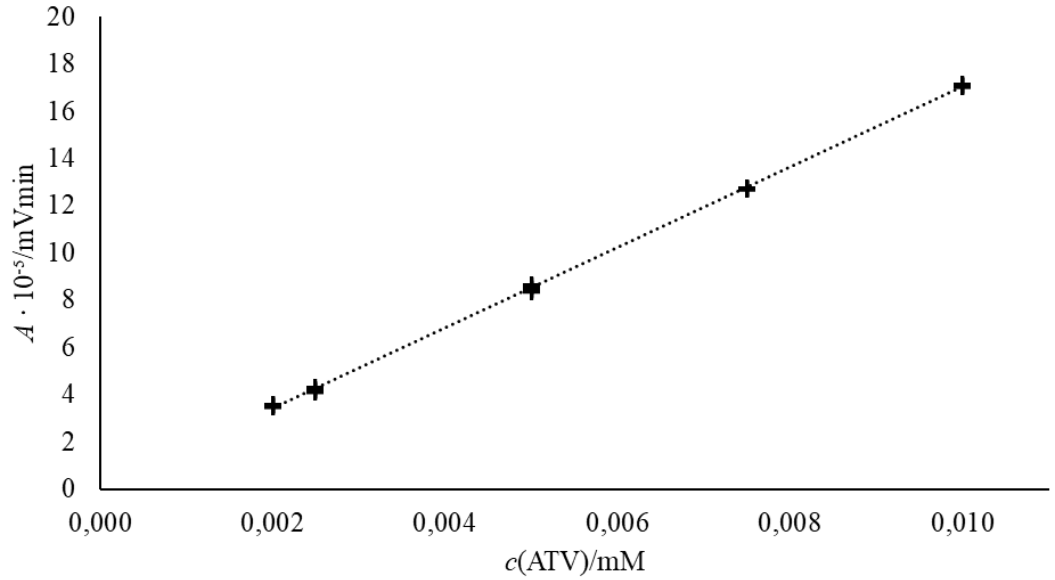


Slika 4. Kalibracijski pravac za analizu ATV-a ($y = 1{,}7 \cdot 10^7 x - 1{,}0 \cdot 10^3$, $R^2 = 0{,}9997$) u području koncentracija od 0,0005 do 0,0100 mM

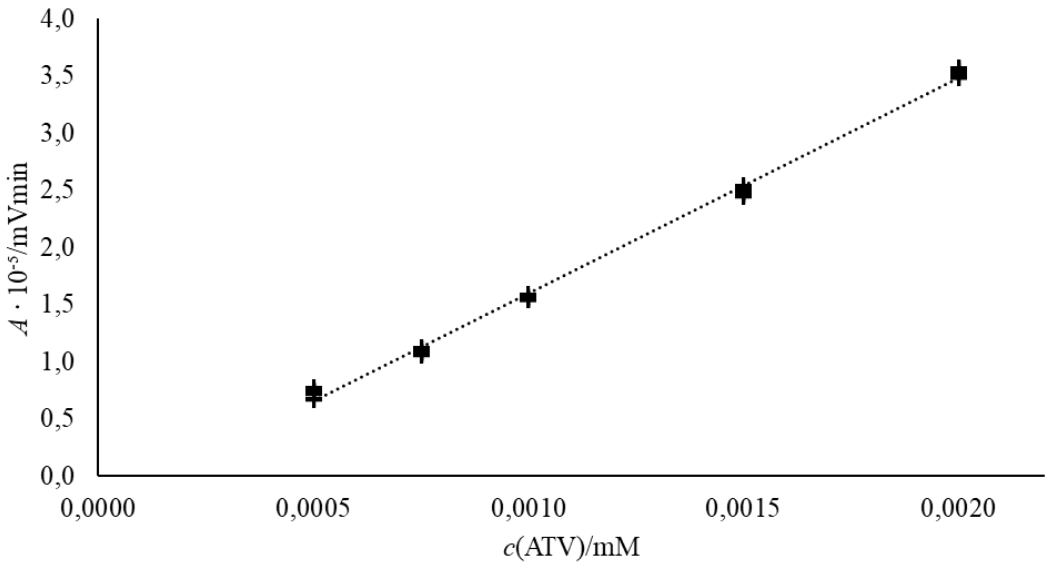


Slika 5. Graf rezidualnih odstupanja ATV-a za kalibracijski pravac $y = 1{,}7 \cdot 10^7 x - 1{,}0 \cdot 10^3$

Iako je kriterij linearnosti zadovoljen ($R^2 > 0{,}9900$) na kalibracijskom pravcu ATV-a iz grafa rezidualnih odstupanja (Slika 5) vidi se da je pri većim koncentracijama veće rasipanje podataka. Zbog toga je potrebno kalibracijske pravce i kalkulaciju razdvojiti na dva područja: od 0,0020 do 0,0100 mM (Slika *6*) te od 0,0005 do 0,0020 mM (Slika *7*).

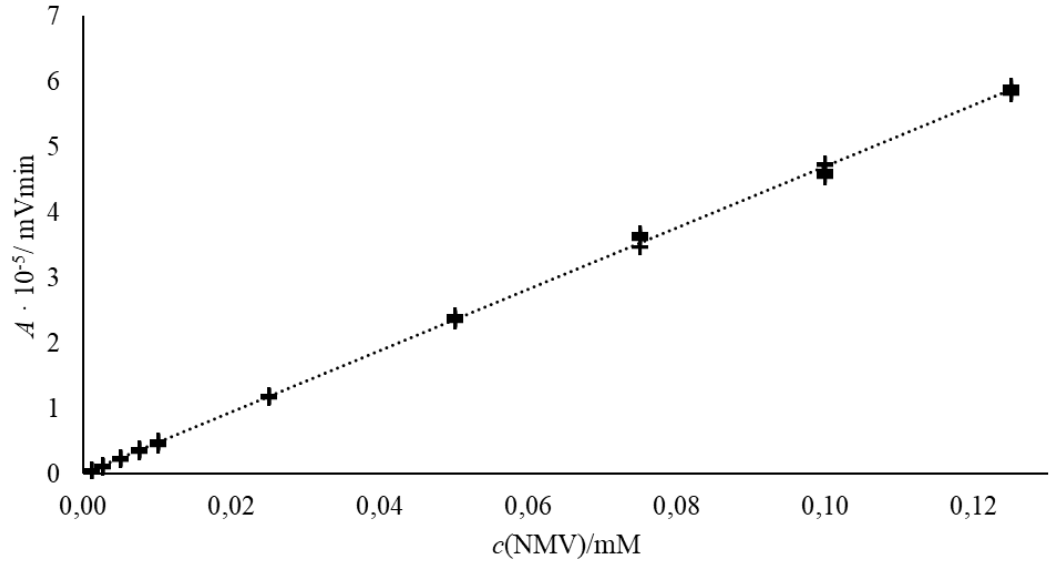


Slika 6. Kalibracijski pravac za analizu ATV-a ($y = 1{,}7 \cdot 10^7 x - 2{,}5 \cdot 10^2$, $R^2 = 0{,}9997$) u području koncentracija od 0,0020 do 0,0100 mM

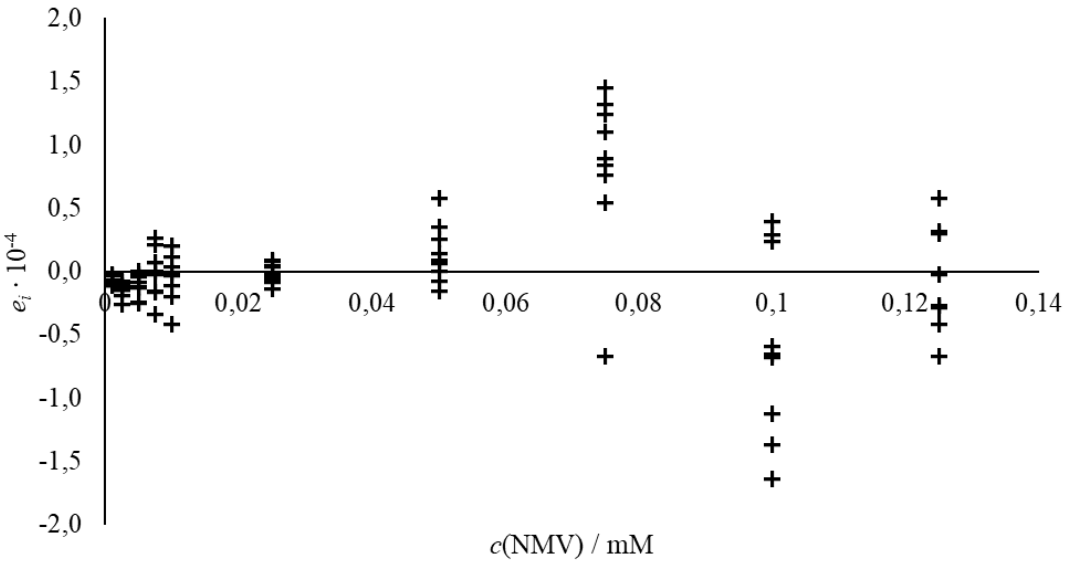


Slika 7. Kalibracijski pravac za analizu ATV-a ($y = 1{,}9 \cdot 10^7 x - 2{,}9 \cdot 10^2$, $R^2 = 0{,}9967$) u području koncentracija od 0,0005 do 0,0020 mM

Iznos koeficijenta determinacije je zadovoljen i kod razdvojenih kalibracijskih pravaca ($R^2 \geq 0{,}9900$) te se može zaključiti da je i razdvajanjem kalibracijskih pravaca zadovoljen uvjet linearnosti.

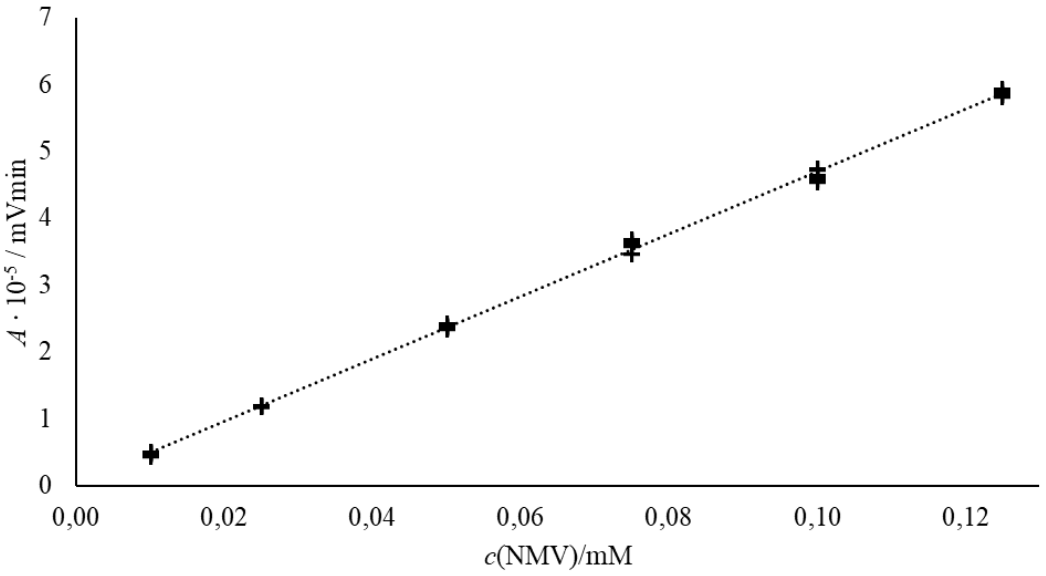


Slika 8. Kalibracijski pravac za analizu NMV-a ($y = 4{,}7 \cdot 10^6 x - 9{,}5 \cdot 10^2$, $R^2 = 0{,}9995$) u području koncentracija od 0,0010 do 0,1250 mM

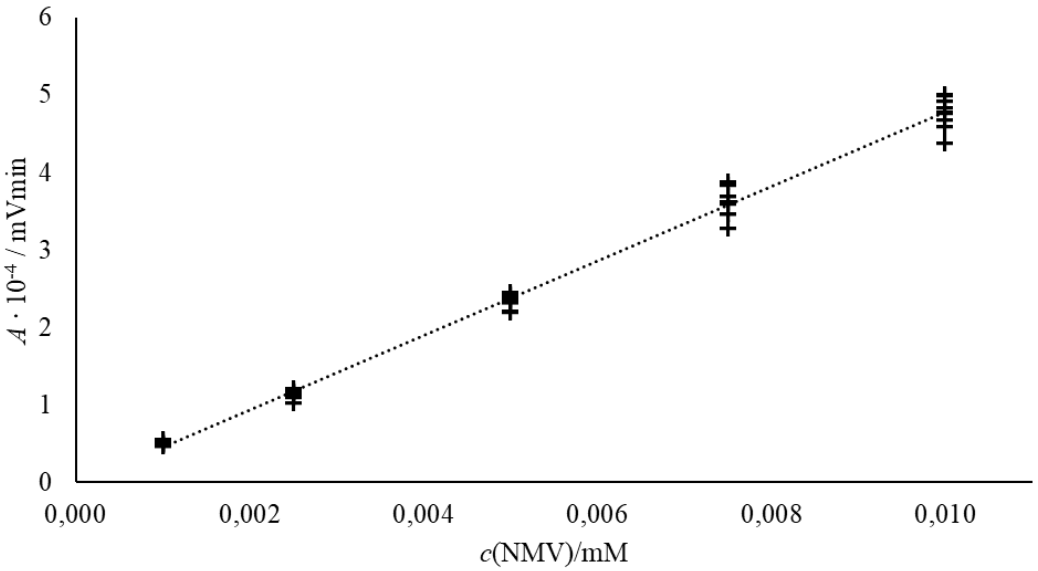


Slika 9. Graf rezidualnih odstupanja NMV-a za kalibracijski pravac $y = 4{,}7 \cdot 10^6 x - 9{,}5 \cdot 10^2$

Na Slika *8* je prikazan kalibracijski pravac dobiven za NMV. Kao i kod ATV-a, iako je kriterij linearnosti zadovoljen (R^2 > 0,9900) na kalibracijskom pravcu NMV-a iz grafa rezidualnih odstupanja (Slika 9) vidljivo je veće rasipanje podataka pri većim koncentracijama. Zbog toga je i u ovom slučaju kalibracija razdvojena na dva područja koncentracija: od 0,0100 do 0,1250 mM (Slika *10*) te od 0,0100 do 0,0010 mM (Slika *11*).



Slika 10. Kalibracijski pravac za analizu NMV-a ($y = 4{,}7 \cdot 10^6 x - 2{,}6 \cdot 10^3$, R^2 = 0,9990) u području koncentracija od 0,0100 do 0,1250 mM



Slika 11. Kalibracijski pravac za analizu NMV-a ($y = 4{,}8 \cdot 10^6 x - 2{,}4 \cdot 10^2$, $R^2 = 0{,}9932$) u području koncentracija od 0,0010 do 0,0100 mM

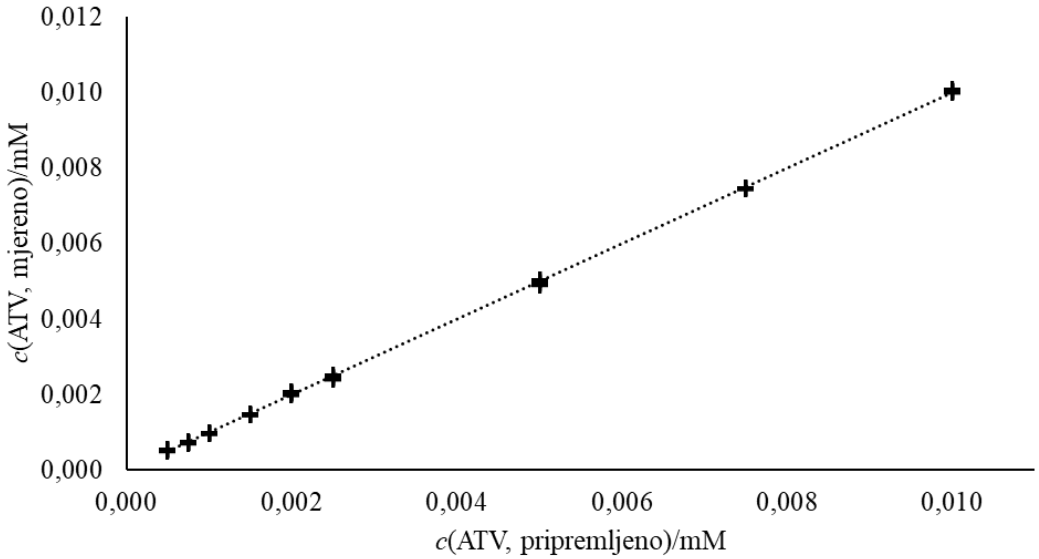
Iz priloženih grafova vidljivo je da je i razdvajanjem kalibracijskih pravaca NMV-a zadovoljen uvjet linearnosti.

4.1.2. Točnost

Za sve kalibracijske krivulje analiziran je odnos mjerenih i stvarnih (pripremljenih) vrijednosti koncentracija otopina ATV-a (Slika 12), odnosno NMV-a (Slika 13). Radi jednostavnosti prikaza grafovi su napravljeni u jedinstvenom području koncentracija, dok su tablični rezultati prikazani na odvojenim područjima koncentracija. Točnost metode povezana je uz odsutnost sustavne pogreške. Sustavna pogreška može biti proporcionalna ili konstantna. U idealnom slučaju odnos mjerenih i stvarnih koncentracija otopina analita trebao bi biti linearan uz nagib 1 te odsječak na ordinati jednak 0. Tada nisu prisutne ni proporcionalna ni konstantna pogreška. Analizom je utvrđeno (tablice 3 i 4) kako uz 95%-tnu pouzdanost možemo konstatirati da metode razvijene za ATV i NMV ne sadrže ni konstantnu ni proporcionalnu pogrešku. Naime, dobiveni intervali 95%-tne pouzdanosti za nagib i odsječak sadrže vrijednosti 1, odnosno 0, potvrđujući da se regresijom određene vrijednosti nagiba i odsječka statistički ne razlikuju od 1, odnosno 0.

Također, izračunata je i vrijednost analitičkog povrata za sve pripremljene otopine. Zbog jednostavnijeg prikaza uzimane su srednje vrijednosti pojedine koncentracijske razine

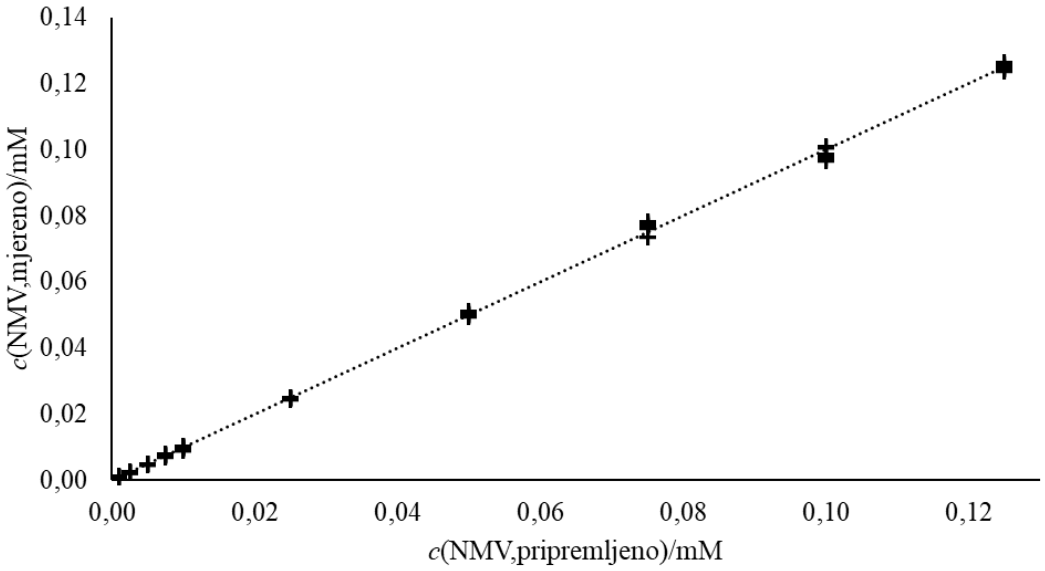
(tablice 5 i 6). Kao kriterij prihvatljivosti analitičkog povrata uzet je interval od 70 do 130%. S obzirom da se srednje vrijednosti analitičkog povrata za ATV kao i za NMV nalaze unutar granica tog intervala, smatramo da metoda daje točne rezultate.



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

Tablica 3. Rezultati analize točnosti metode za određivanje ATV-a

Kalibracijsko	**Parametar**		**Interval pouzdanosti 95,0 %**	
područje / mM	**Naziv**	**Vrijednost**	**Donja granica**	**Gornja granica**
0,0020 – 0,0100	odsječak	0,0000	–0,00003	0,00004
	nagib	0,9997	0,99426	1,00512
0,0005 – 0,0020	odsječak	0,0000	–0,00002	0,00003
	nagib	0,9967	0,97896	1,01439



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

Tablica 4. Rezultati analize točnosti metode za određivanje NMV-a

Kalibracijsko područje / mM	**Parametar**		**Interval pouzdanosti 95,0 %**	
	Naziv	**Vrijednost**	**Donja granica**	**Gornja granica**
0,0100 – 0,1250	odsječak	0,0000	–0,0007	0,0007
	nagib	1,0000	0,9913	1,0087
0,0010 – 0,0100	odsječak	0,0001	–0,00002	0,0003
	nagib	0,9932	0,9678	1,0185

Tablica 5. Vrijednosti analitičkog povrata za ATV

$c(\mathrm{ATV})_{\mathrm{pripravljeno}}$ / mM	$c(\mathrm{ATV})_{\mathrm{mjereno}}$ / mM	Analitički povrat / %
0,01000	0,01003	100,33
0,00750	0,00746	99,52
0,00500	0,00499	99,72
0,00250	0,00245	98,20
0,00200	0,00206	101,41
0,00150	0,00147	98,16
0,00100	0,00098	97,98
0,00075	0,00073	97,52
0,00050	0,00054	107,64

Tablica 6. Vrijednosti analitičkog povrata za NMV

c(NMV)$_{pripravljeno}$ / mM	c(NMV)$_{mjereno}$ / mM	Analitički povrat / %
0,1250	0,1249	99,96
0,1000	0,0988	98,81
0,0750	0,0767	102,29
0,0500	0,0501	100,29
0,0250	0,0247	98,95
0,0100	0,0096	96,47
0,0075	0,0075	99,80
0,0050	0,0048	96,37
0,0025	0,0023	92,99
0,0010	0,0010	98,84

4.1.3. Preciznost

Preciznost je u ovom radu iskazana kao ponovljivost te je izražena preko relativnog standardnog odstupanja (*RSD*). S obzirom na veliki broj točaka, preciznost je za ATV računata na koncentraciji 0,0050 mM za koncentracijsko područje od 0,0020 do 0,0100 mM te na koncentraciji od 0,0010 mM za koncentracijsko područje od 0,0005 do 0,0020 mM. Preciznost za NMV računata je na koncentraciji 0,0500 mM za koncentracijsko područje od 0,0100 do 0,1250 mM te na koncentraciji od 0,0050 mM za koncentracijsko područje od 0,0010 do 0,0100 mM. Kao kriterij prihvatljive preciznosti uzet je $RSD \leq 10\%$. U Tablica 7 je prikazan rezultat analize preciznosti za ATV, a u Tablica 8 za NMV. *RSD* vrijednosti za oba spoja ne prelaze 3,81% čime je za obje metode zadovoljen postavljeni kriterij preciznosti.

Tablica 7. Analiza preciznosti metode za određivanje ATV-a

	Mjerenje	***c* / mM**	***c* / mM**
	1	0,0050	0,0010
	2	0,0050	0,0010
	3	0,0050	0,0010
	4	0,0050	0,0010
	5	0,0049	0,0010
	6	0,0051	0,0010
	7	0,0049	0,0010
	8	0,0049	0,0010
	9	0,0050	0,0010
Srednja vrijednost / mM		0,0050	0,0010
Standardna devijacija / mM		0,0001	0,0000
***RSD* / %**		1,16	0,94

Tablica 8. Analiza preciznosti metode za određivanje NMV-a

	Mjerenje	***c* / mM**	***c* / mM**
	1	0,0506	0,0051
	2	0,0495	0,0048
	3	0,0497	0,0045
	4	0,0499	0,0049
	5	0,0500	0,0048
	6	0,0504	0,0045
	7	0,0511	0,0050
	8	0,0500	0,0050
	9	0,0501	0,0048
Srednja vrijednost / mM		0,0501	0,0048
Standardna devijacija / mM		0,0005	0,0002
***RSD* / %**		0,96	3,81

4.1.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

GD i *GK* su određene koristeći vrijednosti standardne devijacije mjerenja otopina analita najmanjih pripremljenih koncentracija, odnosno 0,0005 mM otopine za ATV i 0,001 mM otopine za NMV. Rezultati su prikazani u Tablica 9.

Tablica 9. Proračunate vrijednosti *GD* i *GK* metoda za analizu ATV-a i NMV-a

	ATV	**NMV**
GD / mM	$3{,}2 \cdot 10^{-12}$	$4{,}5 \cdot 10^{-11}$
GK / mM	$9{,}8 \cdot 10^{-12}$	$1{,}3 \cdot 10^{-10}$

4.2. Prisilna razgradnja

U Tablica 10 su prikazani rezultati razgradnje neutralnom hidrolizom. Rezultati su iskazani preko normalizirane površine A/A_0, gdje je t vrijeme, A_0 površina ispod kromatografskog pika prije razgradnje, a A površina ispod kromatografskog pika nakon određenog perioda razgradnje. Vidljivo je da je u nakon 7 dana došlo do 15%-tne razgradnje ATV-a te 4%-tne razgradnje NMV-a.

Tablica 10. Rezultati neutralne razgradnje ATV-a i NMV-a

	ATV	**NMV**
***t* / h**	$\boldsymbol{A/A_0}$	$\boldsymbol{A/A_0}$
0	1,00	1,00
24	0,94	0,98
48	0,89	0,97
72	0,88	0,97
96	0,87	0,96
168	0,85	0,96

4.2.1. Lužnata hidroliza

U tablici 11 su prikazani rezultati razgradnje spojeva preko normalizirane površine. Vidljivo je da se pri navedenim uvjetima nakon 3 h ATV razgradio 35%, dok se NMV nakon 3 h razgradio 64%. Oba spoja su se nakon 24 h razgradila u potpunosti.

Tablica 11. Rezultati lužnate hidrolize ATV-a i NMV-a

	ATV	**NMV**
***t* / min**	***A/A*$_0$**	***A/A*$_0$**
0	1,00	1,00
30	0,93	0,84
60	0,86	0,68
90	0,80	0,57
120	0,77	0,45
180	0,65	0,36

4.2.2. Kisela hidroliza

U Tablica 12 su prikazani rezultati razgradnje kiselom hidrolizom. Vidljivo je kako se ATV nakon 5 h razgradio 23%, dok se NMV razgradio 15%.

Tablica 12. Rezultati kisele hidrolize ATV-a i NMV-a

	ATV	**NMV**
***t* / min**	***A/A*$_0$**	***A/A*$_0$**
0	1,00	1,00
30	0,95	0,99
60	0,94	0,98
90	0,92	0,97
120	0,91	0,96
180	0,88	0,93
240	0,84	0,85
300	0,77	0,85

4.2.3. Oksidacija vodikovim peroksidom

U Tablica *13* su prikazani rezultati oksidativne razgradnje. Nakon 5 h ATV se razgradio 16%, dok se NMV razgradio 9%.

Tablica 13. Rezultati oksidativne razgradnje ATV-a i NMV-a

	ATV	**NMV**
***t* / min**	***A/A*$_0$**	***A/A*$_0$**
0	1,00	1,00
30	0,96	0,98
60	0,94	0,98
90	0,88	0,97
120	0,85	0,96
180	0,84	0,95
240	0,84	0,92
300	0,84	0,91

4.2.4. Termička razgradnja

Termička razgradnja ATV-a i NMV-a se provodila pri 30 i 40 °C tijekom 7 dana. U Tablica 14 su prikazani rezultati termičke razgradnje ATV-a, a Tablica 15 rezultati termičke razgradnje NMV-a. Nakon 7 dana pri temperaturi od 30 °C se razgradilo 21% ATV-a i 8% NMV-a, a pri 40 °C se razgradilo 30% ATV-a i 11% NMV-a.

Tablica 14. Rezultati termičke razgradnje ATV-a

	30 °C	**40 °C**
***t* / h**	***A/A*$_0$**	***A/A*$_0$**
0	1,00	1,00
24	0,89	0,79
48	0,86	0,73
72	0,82	0,71
96	0,82	0,71
168	0,79	0,70

Tablica 15. Rezultati termičke razgradnje NMV-a

	30 °C	**40 °C**
***t* / h**	***A/A*$_0$**	***A/A*$_0$**
0	1,00	1,00
24	0,95	0,93
48	0,94	0,91
72	0,93	0,91
144	0,92	0,90
168	0,92	0,89

4.2.6. Fotolitička razgradnja

Fotolitička razgradnja ATV-a i NMV-a se pratila 6 h usporedno s njihovim tamnim slijepim probama. Pri navedenim uvjetima nije došlo do razgradnje ni jednog od spojeva.

4.2.7. Usporedba svih pripremljenih postupaka razgradnje

U Tablica 16 su objedinjeni rezultati dobiveni prisilnom razgradnjom oba spoja. Oba spoja su sklonija razgradnji u lužnatom mediju gdje se oba spoja nakon 24 h u potpunosti razgrađuju. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim podacima [32–35] gdje se lužnatom hidrolizom postiže veća razgradnja. NMV je podložniji lužnatoj hidrolizi zbog prisutnosti amidnih i nitrilnih skupina u svojoj strukturi. [35] Kiselom hidrolizom se nakon 5 h razgradilo 24% ATV-a i 15% NMV-a. U literaturno dostupnim podacima [12] kisela hidroliza ATV-a se provodila pri intenzivnijima uvjetima hidrolize (duže vrijeme izlaganja i povišena temperatura) te je došlo do veće razgradnje.

Oksidacijska razgradnja ATV-a i NMV-a se provodila s 30%-tnim vodikovim peroksidom. Nakon 5 h se razgradilo 16% ATV-a i 9% NMV-a. Dobiveni rezultat je u skladu s literaturno dostupnim podacima [32–35] iako oni imaju manju razgradnju. Međutim u našem slučaju su primijenjeni intenzivniji uvjeti razgradnje pa je i razgradnja veća. Termička razgradnja se provodila na 30 i 40 °C tijekom 7 dana. ATV se pri temperaturi od 30 °C razgradio 21%, a na 40 °C 29%. Dey i suradnici [12] su ispitivali termičku razgradnju na 40 °C tijekom 14 dana te im se razgradilo 19% početnog spoja. Bhirud i Hiremath [33] su provodili termičku razgradnju pri 100 °C tijekom 2 h te kao rezultat dobili da nije došlo do

razgradnje. Warokar i suradnici [11] su provodili termičku razgradnju pri 60 °C tijekom 2 h i razgradilo se 1,7% početnog spoja. Kod termičke razgradnje literaturni rezultati se dosta razlikuju i teško ih je usporediti s dobivenima u ovom radu. NMV se na 30 °C razgradio 8%, a na 40 °C 11%. U literaturno dostupnim podacima [34] ne dolazi do termičke razgradnje NMV-a na 70 °C tijekom 1 h, što je u skladu s dobivenim rezultatima jer je u našem slučaju NMV izlagan duže vrijeme povišenoj temperaturi. Ispitivala se i neutralna razgradnja na 25 °C tijekom 7 dana pri čemu se razgradilo 15% ATV-a i 4 % NMV-a. Nažalost, zbog nedostatka literaturnih podataka ne mogu se usporediti dobiveni rezultati. Fotolitičkom razgradnjom ne dolazi do razgradnje ni jednog od oba spoja što je u skladu s literaturno dostupnim podacima [32–35].

Tablica 16. Objedinjeni rezultati primijenjenih uvjeta prisilne razgradnje ATV-a i NMV-a

Uvjet/medij/trajanje	**Razgradnja ATV-a / %**	**Razgradnja NMV-a / %**
Kiseli/1 M HCl/5 h	24	15
Lužnati/1 M NaOH/3 h	35	64
Lužnati/1 M NaOH/24 h	100	100
Oksidativni/30% H_2O_2/5 h	16	9
Neutralni/25 °C/7 dana	15	4
Termički/30 °C/7 dana	21	8
Termički/40 °C/7 dana	29	11
Fotolitički/200 W/m^2/6 h	0	0

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se oba spoja razgrađuju u uvjetima lužnate hidrolize. U uvjetima kisele hidrolize i oksidativne razgradnje je razgradnja oba spoja djelomična. Oba spoja su podložna neutralnoj i termičkoj razgradnji. ATV je podložniji razgradnji od NMV-a u gotovo svim uvjetima. U uvjetima fotolitičke razgradnje oba spoja su stabilna te ne dolazi do razgradnje. S obzirom da dolazi do razgradnje pri gotovo svim uvjetima, postoji mogućnost da se ATV i NMV razgrađuju pri uvjetima koji bi se mogli pojaviti u okolišu. Međutim za veću razgradnju potrebno je primijeniti intenzivnije uvjete (dodatak kemijskih sredstava i povišena temperatura).

5. Zaključak

Cilj ovog rada je bio provesti prisilnu razgradnju atazanavira i nirmatrelvira. Razgradnja je provedena lužnatom, kiselom i neutralnom hidrolizom, oksidacijom s H_2O_2 te termičkim i fotolitičkim djelovanjem. Za analizu razvijena je i validirana odgovarajuća HPLC metoda. Na temelju dobivenih rezultata validacije, obje metode zadovoljavaju zahtjeve prema svim parametrima. Linearnost je zadovoljena s koeficijentom determinacije većim od 0,9900. Točnost metode je prikazana preko analitičkog povrata koji je bio unutar granica 70–130% te je utvrđeno odsustvo sustavne pogreške. Preciznost metode je zadovoljena s *RSD* vrijednošću manjom od 10%. Određene su i granice kvantifikacije i granice detekcije za oba spoja.

Prisilna razgradnja ATV-a i NMV-a se provodila kako bi se istražila stabilnost i ponašanje farmaceutika u uvjetima koji bi se mogli potencijalno naći u okolišu. Prisilna razgradnja se provodila prema ICH smjernicama. S obzirom da dolazi do razgradnje pri gotovo svim uvjetima, postoji mogućnost da se ATV i NMV razgrade pri uvjetima koji bi se mogli pojaviti u okolišu. Međutim za veću (ako ne i potpunu) i bržu razgradnju potrebno je primijeniti intenzivnije uvjete. Zbog izrazite važnosti je istražiti napredne metode uklanjanja, kao što su napredni oksidacijski procesi i biološka razgradnja. Trenutno u literaturi postoji vrlo malo podataka o toksikološkim efektima antivirotika na organizme u okolišu te je stoga potrebno istražiti mehanizme degradacije ovih spojeva te razgradnje produkte koji nastaju. Ovim radom su određeni uvjeti prisilne razgradnje koje daju željeni postotak razgradnje, kako bi se dalje ti uvjeti mogli primijeniti za istraživanje razgradnih puteva i produkata.

6. Literatura

1. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kemija u Industriji **65** (2016) 417–482
2. V. Vrček, Lijekovi u okolišu, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, URL: https://www.hdki.hr/_news/36922/Sazetak%20-%20Vrcek.pdf (pristup 18.3.2024.)
3. S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode **24** (2016) 119–136
4. URL:https://www.ema.europa.eu/en/partners-networks/international-activities/multilateral-coalitions-and-initiatives/international-council-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-ich#:~:text=ICH%20aims%20to%20achieve%20greater,the%20most%20resource%2Defficient%20manner (pristup 18.3.2024.)
5. URL: https://www.croris.hr/projekti/projekt/9236 (pristup 18.3.2024.)
6. 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** (2022) 4309–4327
7. L. Di, E. H. Kerns, G. T. Carter, Drug-like property concepts in pharmaceutical design, Current Pharmaceutical Design **15** (2009)2184–2194
8. 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. Gouin, 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** (2012) 1221–1229
9. E. De Clercq, G. Li, Approved antiviral drugs over the past 50 years, Clinical Microbiology Reviews **29**(3) (2016) 695–747
10. S. Jain, P. Kumar, R. K. Vyas, P. Pandit, A. K. Dalai, Occurrence and removal of antiviral drug sin environment: a review, Water, Air & Soil Pullution **224** (2013) 1410
11. A. Warokar, S. Supare, N. Charbe, L. Barde, U. Mahajan, Development and validation of stability indicating new RP-HPLC method for the determination of Atazanavir sulfate

in bulk and capsule dosage form, Journal of Advanced Scientific Research **12**(1) (2021) 92–98

12. S. Dey, S. Subhasis Patro, N. Suresh Babu, P. N. Murthy, S. K. Panda, Development and validation of stability-indicating RP-HPLC method for estimation of atazanavir sulfate in bulk, Journal of Pharmaceutical Analysis **7** (2017) 134–140
13. A. Raya, J. Lebbos, P. Kirkpatrick, Atazanavir sulphate, Drug Discovery **2** (2003) 857–858
14. URL:https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/atazanavir-krka#:~:text=Atazanavir%20Krka%20received%20a%20marketing,EU%20on%2025%20March%202019. (pristup 14.3.2024.)
15. M. K. V. V. N. Mantripragado, S. V. Rao, V. V. S. Mutulapati, B. P. V. Mantera, Simultaneous determination of impurities of Atazanavir and Ritonavir in tablet dosage form by using reversed-phase ultra performance liquid chromatographic method, Journal of Chromatographic Science **56** (2018) 270–284
16. O. A. Chaves, C. Q. Sacramento, A. C. Ferreira, M. Mattos, N. Fintelman-Rodrigues, J. R. Temerozo, L. Vasquez, D. P. Pinto, G. P. E. da Silveria, L. S. da Fonseca, H. M. Pereira, A. S. Carlos, J. C. d´Avilla, J. P. B. Viola, R. Q. Monteiro, P. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, T. M. L. Souza, Atazanavir is a competitive inhibitor of SARS-CoV-2 M^{pro}, impairing variants replication in vitro and in vivo, Pharmaceuticals **1** (2022) 15–21
17. M. S. Imam, A. S. Batubara, M. Gamal, A. H. Abdelazim, A. A. Almrasy, S. Ramzy, Adjusted green HPLC determination of nirmatrelvir and ritonavir in the new FDA approved co-packaged pharmaceutical dosage using supported computational calculations, Scientific Reports **13** (2023) 137
18. F. Zhao, Z. Xiang, J. Han, J. Pan, Y. Qu, K. Fan, Z. Wu, D. Xu, Y. Yu, Z. Shen, C. Su, Simultaneous quantification of nirmatrelvir/ritonavir in human serum by LC-HRMS, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **237** (2024) 115796
19. J. Martens-Lobenhoffer, C. R. Boger, J. Kielstein, S. M. Bode-Boger, Simultaneous quantification of nirmatrelvir and ritonavir by LC-MS/MS in patiens treated for COVID-19, Journal of Chromatography B **1212** (2022) 123510
20. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review, Journal of Pharmaceutical Analysis **4** (2014) 159–165

21. S. M. Durgule, P. M. Patil, A. P. Kore, M. T. Singh, S. D. Kadam, An introduction to forced degradation studies for drug substance and drug products, Journal of Emerging Technologies and Innovative Research **8**(9) (2021) 260–269
22. H. Janzen, Forced degradation studies-comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015, Master of Drug Regulatory Affairs (2016)
23. URL:https://www.lab-worldwide.com/chromotography-what-is-it-a-1e09909f9a6f4394d3c3899eccf952bd/ (pristup 4.3.2024.)
24. F. Gerber, M. Krummen, H. Potgeter, A. Roth, C. Siffrin, C. Spoendlin, Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 μm 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
25. URL:https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information.html (pristup 5.3.2024.)
26. URL:https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/an-introduction-to-forced-degradation-studies-for-drug-substance-drug-product-0001 (pristup 5.3.2024.)
27. URL:https://www.lab-worldwide.com/the-reason-why-hplc-is-the-most-used-chromatography-method-a-54d51d9df3ddfb34e650138f04f60414/# (pristup 5.3.2024.)
28. URL:https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-system-components/how-hplc-columns-work.html (pristup 5.3.2024.)
29. O. Coskun, Separation techniques: Chromatography, Northern Clinics of Istanbul **3** (2016) 156–160
30. 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.
31. L. Huber, Validation and Qualification in Analytical Laboratories, CRC Press, New York, 2007.
32. U. R. Eslawath, S Thokala, T. Yakaiah, R. Vadlakonda, Method development and forced degradation studies of atazanavir in solid dosage form by RP-HPLC, Human Journals **10** (2017) 380–393

33. C. H. Bhirud, S. N. Hiremath, Stability indicating RP-HPLC method for the determination of Atazanavir sulphate in bulk and dosage form, Drug Invention Today **5** (2013) 81–86
34. H. S. Elbordiny, N. Z. Alzoman, H. M. Maher, S. I. Aboras, Tailoring two white chromatographic platforms for simultaneous estimation of ritonavir-boosted nirmatrelvir in their novel pills: degradation, validation, and environmental impact studies, RCS Advances **13**(38) (2023) 26719–26731
35. P. H. Secretan, M. Annereau, W. Kini-Matondo, B. Prost, J. Prudhomme, L. Bournane, M. Paul, N. Yagoubi, H. Sadou-Yaye, B. Do; Unequal behavior between hydrolysable functions of nirmatrelvir under stress conditions: Structural and theoretical approaches in support of preformulation studies, Pharmaceutics **14** (2022) 1720

Životopis

Luka Večenaj [redacted] Završio je Osnovnu školu Braće Radić u Koprivnici. Maturirao je 2019. u Srednjoj školi Koprivnica, smjer farmaceutski tehničar. Iste godine upisuje prijediplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Završni rad je napisao pod mentorstvom prof. dr. sc. Šime Ukića na temu *Analitičke metode za praćenje degradacije mikroplastike*, a njegovom obranom stječe zvanje sveučilišnog prvostupnika inženjera kemijskog inženjerstva. Diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijske tehnologije i proizvodi, upisuje 2022. na matičnom fakultetu. Stručnu praksu je odradio tijekom 2. godine prijediplomskog studija u tvrtki Podravka d.d. u odjelu Kontrola kvalitete te tijekom 2. godine diplomskog studija u tvrtki Belupo d.d. također u odjelu Kontrola kvalitete.