

Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za određivanje potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u fosamprenaviru

Biškupić, Roberto

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:293041>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Roberto Biškupić

**Razvoj metode tekućinske kromatografije
ultravisoke djelotvornosti za određivanje
potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u
fosamprenaviru**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je TAPI Pliva R&D Analitika pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Luke Jerića, dipl. ing.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Nives Galić na pruženoj prilici za mentorstvo i pomoći prilikom pisanja diplomskog rada.

Ogromno hvala neposrednom voditelju Luki Jeriću, dipl. ing. na vođenju kroz eksperimente, prenesenom znanju i vještinama, toplim riječima i motivaciji da napišem ovaj diplomski rad.

Hvala i svima u Analitičkom odjelu u Plivi koji su mi pokazali što i kako se radi u analitičkom laboratoriju uz uvijek ugodnu atmosferu.

Hvala kolegama s faksa koji su mi učinili studentske dane zabavnim bilo to na predavanju, u menzi ili negdje drugdje. Također hvala na pomoći vezano za učenje, pisanje prezentacija, seminara, laboratorijskih dnevnika te priprema za kolokvije i ispite.

Ekipi iz NDK se zahvaljujem na konstantnim šalama, blagim provokacijama, predivnim trenucima i druženjima.

I za kraj, najveće hvala mojim roditeljima, sestrama i široj obitelji. Hvala na ljubavi, podršci, vjeri, žrtvi i odricanju kako bi dospio do ovog trenutka u svojem životu.

Sadržaj

| | |
|--|-------------|
| SAŽETAK..... | XI |
| ABSTRACT | XIII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1. Fosamprenavir | 2 |
| 2.2. Kromatografija..... | 3 |
| 2.2.1. <i>Parametri kromatografije</i> | <i>5</i> |
| 2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti | 8 |
| 2.4. Spektrometrija masa..... | 10 |
| 2.5. Kvaliteta ugrađena u dizajn..... | 13 |
| 2.5.1. <i>Kvaliteta ugrađena u dizajn za razvoj analitičkih metoda.....</i> | <i>14</i> |
| 2.6. DryLab® | 17 |
| 2.7. Genotoksična onečišćenja..... | 18 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 20 |
| 3.1. Materijali | 20 |
| 3.1.1. <i>Fosamprenavir i onečišćenja</i> | <i>20</i> |
| 3.1.2. <i>Kemikalije</i> | <i>21</i> |
| 3.2. Instrumenti | 21 |
| 3.3. Metoda rada..... | 25 |
| 3.3.1. <i>Priprema mobilnih faza i diluenta</i> | <i>25</i> |
| 3.3.2. <i>Priprema standardnih otopina fosamprenavira i onečišćenja.....</i> | <i>26</i> |
| 3.3.3. <i>Razvoj i optimiziranje metode.....</i> | <i>27</i> |
| 3.3.4. <i>Program DryLab®.....</i> | <i>33</i> |
| 3.3.5. <i>Određivanje koncentracije genotoksičnih onečišćenja</i> | <i>33</i> |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 35 |
| 4.1. Rezultati UHPLC analize | 35 |
| 4.1.1. <i>Odabir pH-vrijednosti mobilnih faza.....</i> | <i>35</i> |
| 4.1.2. <i>Odabir valne duljine</i> | <i>35</i> |
| 4.1.3. <i>Rezultati eksperimenata prije optimizacije</i> | <i>36</i> |
| 4.2. Razvoj metode u programu DryLab® | 43 |
| 4.3. Rezultati HPLC-MS analize..... | 48 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 55 |

| | |
|--|------|
| § 6. LITERATURNI IZVORI..... | 56 |
| § 7. DODATAK..... | XV |
| 7.1. Distribucija specija ovisno o pH i pKa vrijednostima..... | xv |
| 7.2. Ovisnost vrijednosti log <i>D</i> o pH-vrijednosti | xvii |
| § 8. ŽIVOTOPIS | XIX |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za određivanje potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u fosamprenaviru

Roberto Biškupić

Fosamprenavir je protuvirusni lijek koji se koristi za liječenje bolesnika zaraženih virusom humane imunodeficijencije tipa 1. Prilikom proizvodnje lijekova mogu nastati nečistoće koje je potrebno detaljno ispitati kako ne bi došlo do ugrožavanja zdravlja pacijenta. U ovom diplomskom radu razvijena je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu potencijalno genotoksičnih onečišćenja u lijeku Fosamprenavir, prema načelima kvalitete ugrađene u dizajn, primjenom računalnog programa DryLab®. Razvijena je metoda čiji eksperimentalni uvjeti iznose: pH-vrijednost mobilne faze 4,00; temperatura kolone 60 °C i vrijeme gradijentnog eluiranja 3 minute. Pomoću razvijene metode moguće je odrediti koncentraciju genotoksičnih onečišćenja u vrlo niskim koncentracijama od 1 mg/L.

(56 stranica, 40 slika, 22 tablice, 24 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: DryLab®, fosamprenavir, kvaliteta ugrađena u dizajn, genotoksična onečišćenja, UHPLC

Mentor: Prof. dr. sc. Nives Galić
Neposredni voditelj: Luka Jerić, mag. chem.

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Nives Galić
 2. Doc. dr. sc. Đani Škalamera
 3. Prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: Prof. dr. sc. Sandra Rončević

Datum diplomskog ispita: 15. prosinca 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Development of ultra-high performance liquid chromatographic method for determination of potentially genotoxic impurities in the fosamprenavir

Roberto Biškupić

Fosamprenavir is an antiviral drug that is used to treat patients infected with the human immunodeficiency virus type 1. During the production of drugs, impurities may arise that must be examined in detail in order not to endanger the patient's health. In this thesis, an ultra-high-performance liquid chromatography method was developed for the analysis of potentially genotoxic contaminants in the drug Fosamprenavir, according to the principles of quality by design, using the computer program DryLab[®]. A method was developed whose experimental conditions were: pH-value of the mobile phase 4.00; column temperature 60 °C and gradient elution time 3 minutes. Using the developed method, it is possible to determine the concentration of genotoxic impurities in very low concentrations of 1 mg/L.

(56 pages, 40 figures, 22 tables, 24 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: DryLab[®], fosamprenavir, quality by design, genotoxic impurities, UHPLC

Mentor: Prof. dr. sc. Nives Galić
Assistant mentor: Luka Jerić, MChem

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
 3. Dr. Željka Soldin, Associate Professor
- Substitute: Dr. Sandra Rončević, Professor

Date of exam: December 15, 2022.

§ 1. UVOD

Fosamprenavir je protuvirusni lijek koji se koristi za liječenje bolesnika zaraženih virusom humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1)¹. Fosamprenavir je predlijek amprenavira, što znači da se u organizmu fosamprenavir pretvara u amprenavir koji se veže na aktivno mjesto HIV-1 proteaza.² Razine onečišćenja koja nastaju tijekom proizvodnje ili razgradnjom fosamprenavira mogu utjecati na pojedina ljekovita svojstva. Kako bi se dokazalo da nije došlo do nastanka onečišćenja, potrebno je razviti analitičku metodu pomoću koje je moguće detektirati, identificirati i kvantitativno odrediti onečišćenja.

Kromatografija je jedna od analitičkih tehnika u kojoj se analit raspodjeli između pokretne i nepokretne faze. Često se koristi za razdvajanje i identifikaciju spojeva u smjesi. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je najčešće korištena kromatografska metoda jer omogućuje brze analize i niske granice detekcije.³ Međutim, za određivanje genotoksičnih onečišćenja u uzorcima lijeka Fosamprenavira, detekcijske granice koje se postižu primjenom tehnike HPLC nisu dovoljne, te se stoga koristi vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrometrija masa. Korištenjem spektrometra masa kao detektora postižu se puno niže detekcijske granice pa je moguće odrediti koncentraciju genotoksičnih onečišćenja.⁴

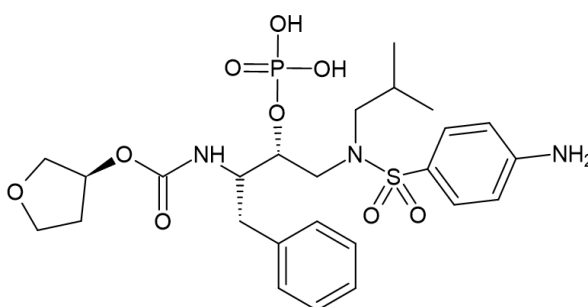
Program DryLab[®] služi za poboljšavanje efikasnosti te ubrzavanje postupka analize. Pomoću programa određuje se utjecaj pH-vrijednosti, vremenski gradijent i temperatura kolone na kvalitetu kromatografskog odvajanja.⁵ Na temelju rezultata dobivenih programom DryLab[®] moguće je razviti i optimizirati analitičku metodu.

U radu će se razviti metoda temeljena na principu kvalitete ugrađene u dizajn primjenom računalnog programa DryLab[®] pri čemu će se ispitati utjecaj pH-vrijednosti, gradijenta eluiranja i temperature kolone na razlučivanje potencijalnih genotoksičnih onečišćenja u lijeku fosamprenavir.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Fosamprenavir

Fosamprenavir (FSM) je protuvirusni lijek koji se koristi za liječenje bolesnika zaraženih virusom humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1). Molekulska formula fosamprenavira je: $C_{25}H_{35}N_4O_{12}PS$, čija je struktura prikazana na slici 1.



Slika 1. Struktura fosamprenavira

Fosamprenavir je fosfatni ester predlijeka amprenavira, što znači da se u tijelu pretvara u molekulu amprenavira. Do brzog pretvaranja fosamprenavira u amprenavir uz oslobađanje fosfata dolazi zbog djelovanja alkalnih fosfataza koje se nalaze na crijevnim resicama tankoga crijeva kojima se amprenavir apsorbira u krvotok.² Amprenavir je slabo topljiv u vodi te bi trebalo unijeti više tableta u organizam kako bi se postigla preporučena doza za zadovoljavajući učinak.⁶ U kliničkom istraživanju ispitane su dvije vrste soli fosamprenavira; fosamprenavir-kalcij i fosamprenavir-natrij. Obje vrste soli u organizmu daju amprenavir, ali se u medicinske svrhe koristi fosamprenavir-kalcij koji je topljiv pri fiziološkom pH, stabilan i u krutoj i tekućoj fazi te topljiv u vodi, dok je fosamprenavir-natrij veoma higroskopan što utječe na stabilnost lijeka.⁷ Amprenavir je inhibitor proteaza, koji se veže na aktivno mjesto HIV-1 proteaza, koje služe za širenje HIV-a, prilikom čega dolazi do prestanka pretvaranja virusnih poliproteinskih prekursora, te zbog toga nastaju nezrele i nezarazne virusne stanice. Fosamprenavir se uz još nekoliko lijekova, poput ritonavira, abacavira, zidovudina i drugih, koristi paralelno kako bi došlo do što uspješnijeg usporavanja, odnosno zaustavljanja širenja HIV-a. Lijek s kojim se fosamprenavir najčešće koristi je lijek ritonavir koji povećava koncentraciju amprenavira u krvnoj plazmi tako što inhibira metabolizam amprenavira.⁶

Kombinacijom ta dva lijeka koncentracija amprenavira u krvnoj plazmi je veća od srednje vrijednosti koncentracije amprenavira vezanog na protein. Koncentracija amprenavira u akutno zaraženim stanicama iznosi od 0,012 do 0,08 $\mu\text{mol/L}$ pa sve do 0,41 $\mu\text{mol/L}$.⁸ Prednosti fosamprenavira naspram drugih sličnih lijekova je u oralnoj bioraspoloživosti, količini unosa tableta dnevno i u usklađenosti s drugim lijekovima te načinom prehrane. Zbog razvitka fosamprenavira, došlo je do smanjenja unosa tableta s deset na četiri tablete dnevno za jednaku koncentraciju i jednak učinak amprenavira za pacijente.^{6,8}

2.2. Kromatografija

Kromatografija je analitičkih tehnika u kojoj dolazi do separacije analita između pokretne i nepokretne faze. Kromatografija je jedna od najčešće korištenih analitičkih metoda u farmaceutskoj industriji. Kromatografske metode mogu se podijeliti na tri načina: podjela prema agregacijskom stanju mobilne faze, podjela prema obliku kromatografske podloge i podjela ovisno o mehanizmu odjeljivanja. Kod podjele prema agregacijskom stanju mobilne faze kromatografiju dijelimo na plinsku kromatografiju (engl. *Gas Chromatography*, GC), tekućinsku kromatografiju (engl. *Liquid Chromatography*, LC) i tekućinsku kromatografiju pri superkričnim uvjetima. Kromatografske podloge mogu biti kolonske i plošne (poput papira ili nekog drugog tankog sloja) pa razlikujemo tehnike kolonske i plošne kromatografije. Kromatografske tehnike podijeljene prema mehanizmu odjeljivanja su: razdjelna kromatografija (engl. *Partition chromatography*), adsorpcijska kromatografija (engl. *Adsorption chromatography*), ionsko-izmenjivačka kromatografija (engl. *Ion-exchange chromatography*), kromatografija isključenjem (engl. *Exclusion chromatography*) i afinitetna kromatografija (engl. *Affinity chromatography*).⁹ Razdjelna kromatografija temelji se na razlici u topljivosti sastojaka analita u nepokretnoj i pokretnoj fazi u tekućinskoj kromatografiji, ili topljivosti sastojaka analita u nepokretnoj fazi u plinskoj kromatografiji. Adsorpcijska kromatografija temelji se na različitoj adsorpciji sastojaka analita na površini adsorbensa. Ionsko-izmenjivačka kromatografija temelji se na razlici u afinitetu sastojaka uzorka analita prema ionskoj izmjeni. Kromatografija isključenjem temelji se na razlici u veličini i/ili obliku sastojaka analita. Afinitetna kromatografija temelji se na odjeljivanju sastojaka analita pomoću specifičnih interakcija između analita i liganda na nepokretnoj

fazi.¹⁰ U Tablici 1 nalaze se vrste kromatografskih tehnika ovisno o vrsti faze te o mehanizmu odjeljivanja.

Tablica 1. Vrste kromatografskih tehnika

| Mehanizam odjeljivanja | Nepokretna faza | Pokretna faza | Metoda |
|------------------------|----------------------------|---------------------|-----------|
| Razdjeljenje | Tekućina na čvrstom nosaču | Plin | GSC |
| | | Tekućina | LSC |
| Adsorpcija | Krutina | Plin | GLC |
| | | Tekućina | LLC, HPLC |
| | | Superkritični fluid | SFC |
| Ionska izmjena | Krutina | Tekućina | IC |
| Isključenje | Krutina | Tekućina | SEC |
| Afinitetna | Ligand na čvrstom nosaču | Tekućina | CAC |

Kao što je već rečeno, do razdvajanja spojeva iz smjese dolazi prilikom raspodjele između pokretne i nepokretne faze. Razdvajanje ovisi o vrsti interakcija između analita i pokretne odnosno nepokretne faze. Ukoliko analit tvori bolje interakcije s nepokretnom fazom, snažnije se veže za nepokretnu fazu i zbog toga se dulje zadržava na koloni. Ukoliko je analit dobro topljiv u pokretnoj fazi, on će se puno kraće zadržavati na nepokretnoj fazi, te će prije biti detektiran. Ovisno o polarnosti pokretne i nepokretne faze, kromatografiju dijelimo na dvije vrste, kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. U kromatografiji normalnih faza pokretna faza je nepolarna dok je nepokretna faza polarna. Nepokretna faza je najčešće silikagel, dok se za pokretnu fazu upotrebljavaju otapala poput heksana i benzena. Kromatografija obrnutih faza sastoji se od polarne pokretne faze i nepolarne nepokretne faze. Nepokretna faza je silikagel koji na svojim silanolnim skupinama ima vezane alkilne lance poput oktadecilalkila, odnosno C18 lanca, zbog čega ima nepolarna svojstva. Pokretna faza je voda ili smjesa vode i organskog otapala.

2.2.1. Parametri kromatografije

Za uspješnost kromatografske metode postoje kromatografski parametri koji moraju biti optimizirani. Što su parametri bolje optimizirani, postiže se bolji rezultat. Najvažniji kromatografski parametri su: vrijeme zadržavanja, razlučivanje pikova, faktor simetrije i broj teorijskih tavana.

Vrijeme zadržavanja ili vrijeme retencije (t_R) je vrijeme koje analit provede u kromatografskoj koloni, a odgovara vremenu od injektiranja do detekcije. Vrijeme zadržavanja je različito za različite analite i daje kvalitativne informacije o analitu. Mrtvo vrijeme, odnosno vrijeme zadržavanja nezadržanog sastojka (t_m) je vrijeme koje je potrebno mobilnoj fazi da dođe do detektora. Pomoću ove dvije veličine može se izračunati faktor zadržavanja (k) koji predstavlja omjer vremena koji uzorak provede u nepokretnoj fazi i pokretnoj fazi. Ova veličina govori koliko se duže sastojak zadržava u koloni zbog interakcija analita s kolonom. Radi jednostavnosti, često se koristi i parametar prilagođeno vrijeme zadržavanja (t_R') koje se dobiva oduzimanjem vremena zadržavanja i mrtvog vremena. Faktor zadržavanja može se izračunati pomoću formule 1.

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

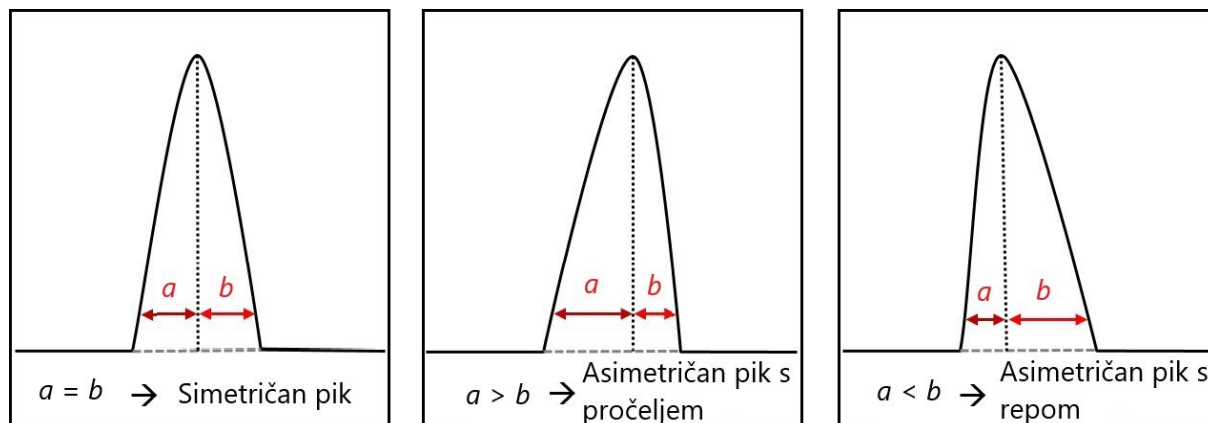
Faktor zadržavanja treba biti od 1 do 5. Ukoliko je faktor zadržavanja manji od 1, dolazi do prebrze elucije spojeva, zbog čega dolazi do spajanja pikova koji onemogućuju preciznu analizu. Ako je faktor zadržavanja veći od 20, spojevi se predugo zadržavaju u koloni, zbog čega je trajanje kromatografskog procesa predugo, što nije poželjno.^{10,11}

Ovisno o uvjetima kromatografije, dobivamo različite izgled kromatografskih pikova. Idealni uvjeti kromatografije prisutni su kada koncentracija analita ne utječe na faktor zadržavanja. Pri idealnim uvjetima dobivamo pravilne, odnosno simetrične pikove u kolonskoj kromatografiji. Pri neidealnim uvjetima, faktor zadržavanja ovisi o koncentraciji analita zbog čega nastaju asimetrični pikovi u kolonskoj kromatografiji. Stupanj asimetričnosti označavamo faktorom asimetrije (A_s). Faktor asimetrije računa se pomoću formule 2, u kojoj su a i b vršne polovice širina pika na 10% njegove visine.

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (2)$$

Simetričan pik označavamo sa faktorom asimetrije koji iznosi 1. Faktor simetrije utječe na razlučivanje na način da smanjuje razlučivanje, ukoliko je faktor asimetrije veći od 1.5.^{9,11}

Pojavu asimetričnih pikova rijetko je moguće izbjeći, a ona se najčešće javlja zbog: razgradnje uzorka, prevelike količine uzorka, jake apsorpcije analita na dio nepokretne faze ili prevelikog mrtvog volumena.

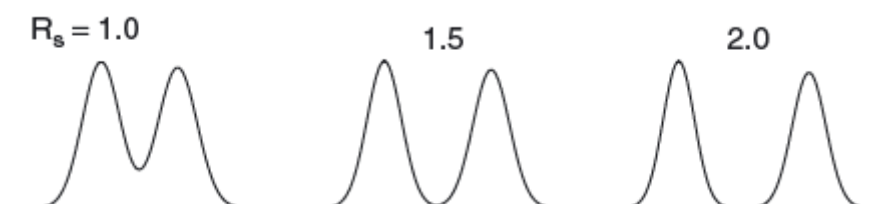


Slika 2. Izgled kromatografskih pikova⁹

Razlučivanje kromatografskih (R_s) pikova je mjera kojom opisujemo razdvajanje između dvaju pikova. Računa se pomoću jednadžbe (2) u kojoj je t_{R1} vrijeme zadržavanja prvog analita, dok je t_{R2} vrijeme zadržavanja drugog analita, a oznake w_{b1} i w_{b2} označavaju širinu prvog odnosno drugog pika pri osnovici.

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

Što je razlučivanje veće, to je separacija bolja. Poželjno je da je vrijednost razlučivanja veća od 1.5 jer tada nema preklapanja pikova.

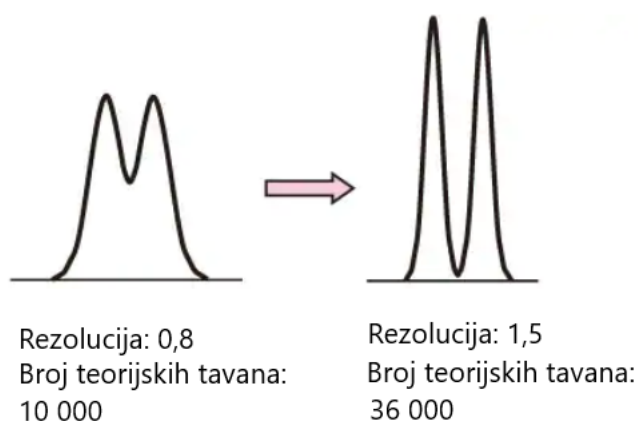


Slika 3. Izgled kromatograma pri različitim vrijednostima razlučivanja R_s ⁹

Brojem teorijskih tavana možemo opisati djelotvornost kolone. Broj teorijskih tavana računa se prema jednadžbi (3), u kojoj je t_R vrijeme retencije, w_b širina pika pri osnovici, L duljina kolone i H visina teoretskog tavana.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = \frac{L}{H} \quad (3)$$

Na djelotvornost kolone možemo utjecati tako da povećamo broj teorijskih tavana, odnosno da smanjimo visinu tavana. Povećanjem broja teorijskih tavana, dolazi do promjene izgleda kromatografskog pika. Što je veći broj teorijskih tavana to je uži pik.¹⁰

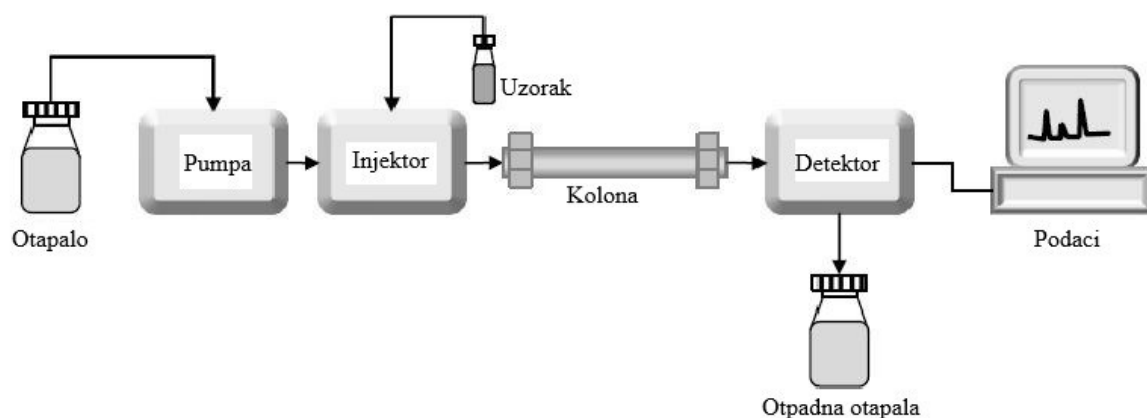


Slika 4. Utjecaj broja teorijskih tavana na razdvajanje dva sastojka smjese¹⁰

2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) jedna je od najšire korištenih kromatografskih tehnika zbog brzog odvajanja sastojaka analita i zbog vrlo niske granice detekcije. Ova tehnika često se koristi u farmaceutskoj industriji za preparativne i analitičke svrhe, u razvoju i proizvodnji lijekova. HPLC se temelji na razdvajanju sastojaka smjese između pokretne i nepokretne faza pri čemu tekuća pokretna faza prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom, čime je skraćeno vrijeme analize u odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju.¹¹

Instrument za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti sastoji se od: spremnika za pokretnu fazu, sustava pumpi pokretne faze, komore za miješanje uzoraka, sustava za unošenje uzorka (koji se sastoje od igle i injektora), predkolone, kolone, detektora, spremnika za otpadna otapala i računala za obradu podataka.



Slika 5. Shematski prikaz HPLC instrumenta³

Najčešće se koriste dvije vrste otapala od kojih je jedno organsko otapalo, a drugo voda, odnosno pufer. Otapala koja se koriste moraju biti visoke čistoće kako bi se izbjegao pozadinski šum i kako bi se očuvale pumpe i kolona.

Sustav za unošenje uzorka unosi određeni volumen uzorka u mobilnu fazu koja vodi uzorak do kolone, gdje dolazi do separacije sastojaka. Eluiranje, odnosno odjeljivanje dijelimo na dvije vrste, izokratano i gradijentno. U izokratnom eluiranju se ne mijenja sastav mobilne faze tijekom odjeljivanja, dok se pri gradijentnom eluiranju sastav mobilne faze, odnosno udio pojedinog otapala mijenja. Predkolona se stavlja u sustav ispred kolone. Služi

za uklanjanje onečišćenja koja se nalaze u pokretnoj fazi kako bi se očuvala kolona. Kolona se sastoji od metalnog kućišta oblika cijevi koje je ispunjeno sitnom sferičnom stacionarnom fazom. Postoji nekoliko tipova kolona, a odabir kolone ovisi o metodi. Tako postoje: kolone za kromatografiju normalne faze, kolone za kromatografiju obrnutih faza, za isključenje po veličini, za ionsku izmjenu, te za afinitetnu kromatografiju.³

Detektori koji se koriste u HPLC instrumentu mjere odvojene sastojke smjese po izlasku iz kolone. Osobine koje detektori moraju imati su: visoka osjetljivost, stabilnost, visoka pouzdanost, reproducibilnost, kratko vrijeme odaziva, te mogućnost mjerenja pri povišenim temperaturama. Primjeri detektora koji se koriste su: apsorpcijski, fluorimetrijski, elektrokemijski, detektor raspršenja svjetlosti, detektor indeksa loma te vezani sustavi. Jednostavni apsorpcijski detektori mjere apsorpciju odijeljenih sastojaka smjese u ultraljubičastom i vidljivom dijelu zračenja na točno određenoj valnoj duljini. Ukoliko se detektor sastoji od velikog niza dioda (engl. *diode array detector*, DAD) može se snimati cijeli apsorpcijski spektar od 190 nm do 900 nm. Detektori s nizom dioda upotrebljavaju se pri analizi spojeva koji apsorbiraju zračenje pri različitim valnim duljinama ili ako se spektri spojeva u vidljivom djelu preklapaju, pa se detektiraju preko ultraljubičastog područja.¹² Fluorimetrijski detektori koriste se ukoliko analit fluorescira. Prednost fluorimetrijskih detektora je veća osjetljivost od oko 1000 puta od apsorpcijskih detektora, ali je nedostatak to što analit mora fluorescirati da bi se mogao detektirati. Mogu se detektirati i spojevi koji ne fluoresciraju ako se prevedu u fluorescirajuće derivate.¹⁰ Elektrokemijski detektori mjere količinu električne energije koja teče između radne i pomoćne elektrode. Do promjene količine struje dolazi zbog oksidacije ili redukcije analita što se detektira. Detektori raspršenja svjetlosti koriste se ukoliko se ne mogu koristiti apsorpcijski detektori zbog male apsorpcije zračenja. Oni detektiraju razliku u raspršenju svjetlosti između analita i mobilne faze. Detektori indeksa loma mjere promjene indeksa loma u pokretnoj fazi. Do promjene indeksa loma dolazi prilikom izlaska analita iz kolone.¹¹ Vezani sustavi razvijeni su kako bi se poboljšala analiza. Sastoje se od kromatografa i spektrometra masa (engl. *Liquid chromatography – mass spectrometry*, LC-MS), infracrvenog spektroskopa (engl. *Liquid chromatography – infrared spectroscopy*, LC-IR) ili instrumenta za spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Liquid Chromatography – Nuclear Magnetic Resonance*, LC-NMR).

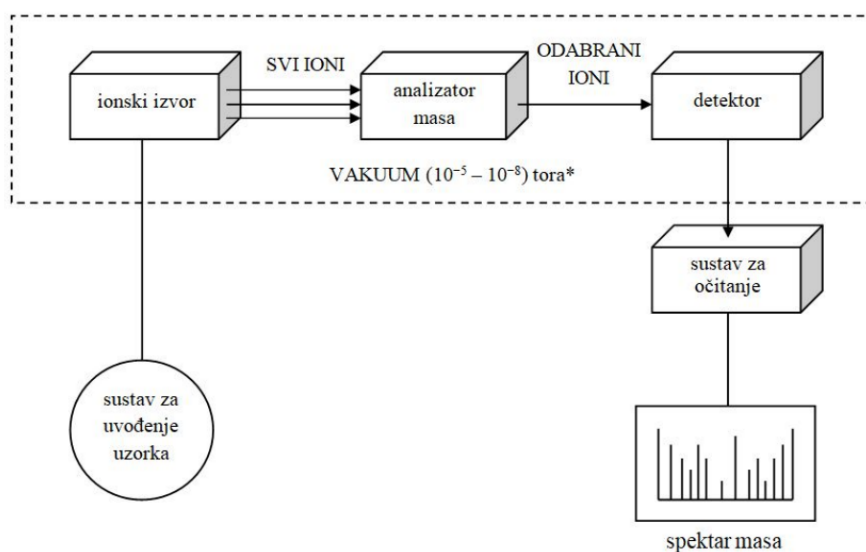
2.3.1. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) je tehnika slična tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti, ali se koriste kolone punjene znatno manjim česticama. Veličina čestica u UHPLC koloni je između 1,7 μm i 1,8 μm , dok je u HPLC kolonama veličina čestica između 3 μm i 10 μm . Zbog manje veličine čestica punila kolona za UHPLC tehniku postižu se tlakovi od 1000 bara, dok je vrijednost tlakova u HPLC instrument do 400 bara.⁹ Iako je primjena HPLC-a i UHPLC-a ista, pomoću UHPLC-a moguće je provesti bržu analizu uz bolje odvajanje sastojaka smjese.

2.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je jedna od mnogih analitičkih tehnika koja se koristi za identifikaciju spojeva. Analit se ionizira i odvajaju se ioni u plinskoj fazi, a onda detektiraju na temelju omjera mase i naboja (m/z).¹³

Spektrometar masa sastoji se od sustava za uvođenje uzorka, ionizacijske komore, analizatora masa, detektora te računala koje služi za obradu rezultata. Spektrometar masa nalazi se u vakuumu kako bi se spriječili sudari između molekula i iona zbog kojih može doći do nastanka neželjenih produkata ili do gubitka naboja na ionu koji se tada neće detektirati na detektoru. Sustav za uvođenje odabiremo ovisno o prirodi analita koji se želi analizirati ili o načinu ionizacije.¹³

Slika 6. Shematski prikaz spektrometra masa¹⁴

Postoji više načina ionizacije uzorka analita poput ionizacije elektronima (engl. *electron ionization*, EI), kemijske ionizacije (engl. *chemical ionization*, CI), ionizacije brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB), termoraspršenje (engl. *thermospray*, TS), elektroraspršenje (engl. *electrospray*, ES) i drugi. Ovisno o vrsti ionizacije koja se koristi, može se prenijeti veća ili manja količina energije. Suvišak energije uzrokuje jaku fragmentaciju zbog čega može izostati signal molekuskog iona. Ukoliko se koriste blage ionizacijske tehnike, u spektru će biti vidljiv signal molekuskog iona.¹³

Jedan od blagih načina ionizacije za male i velike molekule je tehnika ionizacije elektroraspršenjem. Mehanizam elektroraspršenja može se podijeliti na tri dijela: nastajanje kapljice, smanjenje kapljice te nastanak iona u plinovitoj fazi. Na otopinu u metalnoj kapilari primjenjuje se jako električno polje pri čemu dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja. Ukoliko je kapilara na pozitivnom kraju izvora, nastaju pozitivni ioni koji putuju prema negativnoj anodi. Nastaje Taylorov stožac u kojem dolazi do kontinuiranog nastanka pozitivno nabijenih iona. Tako mogu nastati višestruko nabijen ioni pomoću kojih možemo detektirati analite velikih molekulkih masa. Ukoliko bi brzina protoka otopine s uzorkom bila niska, došlo bi do stvaranja male kapljice koja bi se jako ionizirala te bi došlo do povećanja osjetljivosti metode. Kontrolom tlaka i promjenom potencijala, tako nastali ioni putuju prema analizatoru masa.¹⁵

Analizator masa razdvaja nastale ione ovisno o njihovom omjeru mase i naboja. Osnovne karakteristike analizatora masa su gornja granica masa, propusnost i razlučivanje.

Gornja granica predstavlja najveću vrijednost omjera mase i naboja koju analizator može detektirati, propusnost označava broj iona koji pređe put od izvora do detektora, a razlučivanje analizatora mase označava sposobnost razdvajanja dva signala koji imaju malu razliku u masama.¹⁴

Postoji pet osnovnih tipova analizatora mase, a to su: sektorski analizator mase (engl. *sector mass analyzer*, SMS), kvadrupolni analizator mase (engl. *quadrupole mass analyzer*, QMS), analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *time of flight*, TOF), ionska stupica (engl. *quadrupole ion trap*, QIT) i ionsko ciklotronska rezonancija (engl. *ion cyclotron resonance*, ICR).¹⁴

Kvadrupolni analizator masa odjeljuje ione prema omjeru m/z na način da promjenom električnog polja utječe na putanju iona prema detektoru. Sastoji se od četiri cilindrične elektrode koje su spojene u paru, kroz koje prolazi istosmjerni ili izmjenični potencijal. Električno polje koje nastane promjenom potencijala propušta samo ione određenog omjera m/z , tj. ione koji se gibaju stabilnom putanjom. Kvadrupolni analizator mase koristimo poput filtera jer pomoću njega možemo odabrati ione uskog raspona m/z .¹³

Analizator koji mjeri vrijeme leta mjeri vrijeme koje je potrebno ionima da prijeđu udaljenost od ionizacijskog izvora do detektora. Vrijeme koje je potrebno ionima da prijeđu udaljenost proporcionalno je omjeru mase i naboja. Problem kod mjerenja pomoću analizatora koji mjeri vrijeme leta je u lošem razlučivanju zbog relativno sličnog vremena dolaska molekula istog omjera mase i naboja, zbog čega se detektiraju kao jedan signal. Kako bi se taj nedostatak uklonio, koriste se instrumenti s ionskim zrcalima ili se koristi mjerenje pomoću pulsne ekstrakcije.¹³

Tandemna spektrometrija masa, odnosno MS/MS, je metoda koja podrazumijeva analizu mase koja se sastoji od barem dva koraka. Ukoliko se koriste dva analizatora, u prvom analizatoru dolazi do odabira iona prekursora prema m/z , odnosno omjeru mase i naboja. Nakon odabira iona prekursora dolazi do fragmentiranja iona koji se onda detektiraju u obliku iona ili radikala u drugom analizatoru masa. Tandemna spektrometrija mase može se provoditi na dva načina, u prostoru ili u vremenu. Tandemna spektrometrija masa koja se provodi u prostoru nastaje povezivanjem dva ili više uzastopnih analizatora mase. Tandemna spektrometrija mase koja se provodi u vremenu temelji se na analiziranju iona koji se nalaze u jednom analizatoru, a detektiraju se u različitim vremenima.¹⁵

2.5. Kvaliteta ugrađena u dizajn

Kvaliteta ugrađena u dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) je temeljan dio u modernom pristupu za kontrolu kvalitete lijeka. Ovaj pristup započinje s unaprijed definiranim ciljevima na temelju literaturnih podataka, te uz primjenu znanja o instrumentalnim metodama moguće je steći bolje razumijevanje i kontrolu. Klasičan pristup razvoja metoda je sporiji i nesigurniji zbog visokog broja varijabli koji se nalazi u svakoj fazi razvoja te se izvođenje metode ispituje i ocjenjuje tokom validacije iste.¹⁶ U klasičnom pristupu kvaliteta metode ovisi o rezultatima, dok kod QbD pristupa, kvaliteta metode je vidljiva iz kvalifikacije izvedbe. Što je bolja kvalifikacija izvedbe, to je metoda kvalitetnija. QbD dozvoljava dodatak novih parametara pri čemu se može poboljšati metoda, dok u klasičnom pristupu nije moguće poboljšati metodu zbog ograničenog razumijevanja analitičkih varijabli.

QbD metoda sastoji se od četiri ključne komponente:

- Definiranje dizajna proizvoda
- Procjena rizika
- Dizajn eksperimenta
- Strategija kontrole

U koraku procjene rizika ispituju se višedimenzijske kombinacije i interakcije atributa i procesnih parametara.^{16,17}

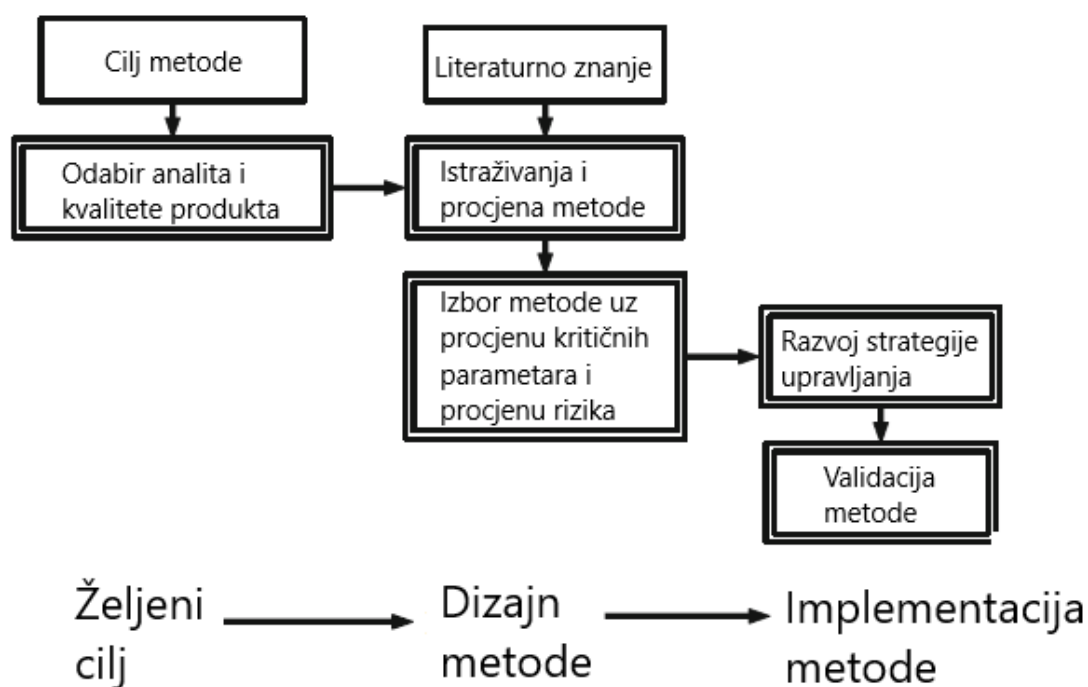
Prostor dizajna (Design space, DS) definiran je kao višedimenzionalna kombinacija parametara koji ukazuju na osiguravanje kvalitete razvojnog procesa. U farmaceutskim postupcima prilikom pripreme lijeka za prostor dizajna koristimo ulazni materijal, procesnu jedinicu i završni proizvod. U analitičkim metodama dolazi do redizajna prostora dizajna u koji se dodaju dodatni parametri kako bi se poboljšala kvaliteta podataka koji se dobivaju metodom. Svrha strategije kontrole je osiguranje završnog proizvoda, a dobiva se razumijevanjem procesa dobivenog preko prostora dizajna. Ona pokazuje načine pomoću kojih je osigurana kvaliteta proizvoda.¹⁸

QbD koncept sastoji se od četiri ključna koraka:

- Definiranje dizajna proizvoda

U ovom koraku određuju se ciljevi metode, te se ovisno o ciljevima razmatraju, određuju i identificiraju svi kritični parametri metode.

- Procjena rizika
U ovom koraku određuju se granice kako bi se osigurala kvaliteta metode, na način da se ispituju interakcije atributa i višedimenzijske kombinacije.
- Dizajn eksperimenta
U ovom koraku dolazi do provedbe eksperimenta na temelju poznatih varijabli dobivenih preko prva dva koraka. Nakon provedbe eksperimenta slijedi analiza dobivenih podataka.
- Strategija kontrole
Ovaj korak omogućuje cjeloviti pregled o načinu osiguravanja kvalitete proizvoda nakon čega slijedi validacija metode.



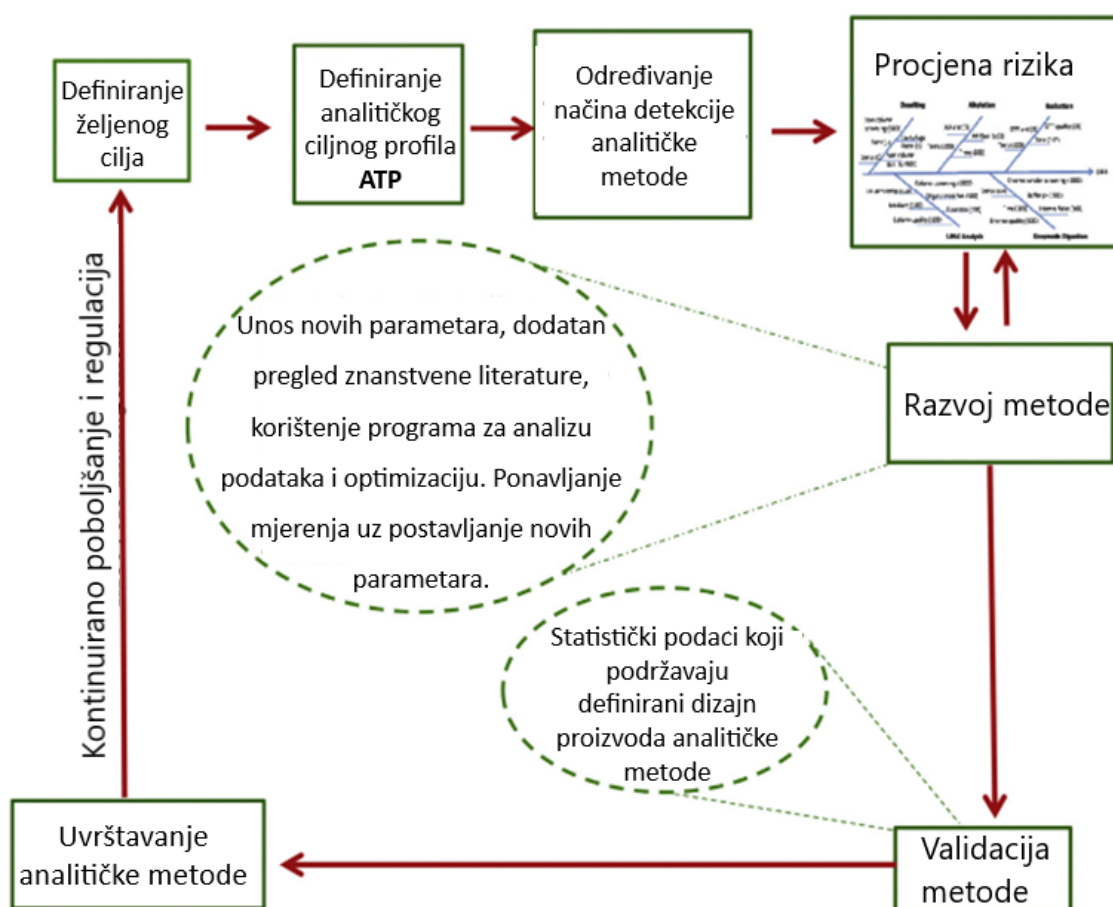
Slika 7. Shematski prikaz strategija razvoja metoda po načelu kvalitete ugrađene u dizajn¹⁶

2.5.1. Kvaliteta ugrađena u dizajn za razvoj analitičkih metoda

Analitička kvaliteta ugrađena u dizajn (engl. *Analytical Quality by Design*, AQbD) razvila se s istim namjerama kao i obična kvaliteta ugrađena u dizajn, odnosno da se za ispitivanje

kvalitete metoda prestane koristiti tradicionalan pristup koji se temelji na načelu pokušaja i pogrešaka.¹⁹ AQbD omogućuje razvoj jeftinih i robusnih metoda koje se mogu koristiti za analizu tijekom cijelog ciklusa pripreme lijeka. Jedan od najbitnijih dijelova razvojnog procesa pripreme lijeka je razvoj proizvodnog procesa u kojem je potrebno pratiti nečistoće koje nastaju tijekom ili nakon proizvodnje lijeka. Početak razvoja AQbD-a započinje definiranjem analitičkog ciljnog profila (*Analytical target profile*, ATP). Ovisno o svrsi eksperimenta definiraju se kriteriji učinka koji će se mjeriti. Nakon odabira cilja slijedi odabir analitičke tehnike za provedbu metode. HPLC tehnika smatra se jednim od najrelevantnijim metoda zbog velike količine radnih varijabli koje je moguće mijenjati kako bi se dobili optimalni rezultati. Nakon odabira tehnike slijedi odabir kritičnih atributa (engl. *Critical material attributes*, CMA) u svrhu kontrole izvedbe.²⁰ CMA ovisi o vrsti tehnike, a služi za povezivanje cilja metode sa standardima kvalitete poput specifičnosti, preciznosti, linearnosti, kvantitativnog određivanja i granica detekcije. U slučaju tehnike HPLC, zbog velike količine parametara, razvoj metode može biti zahtjevan. Zahtjevnost tehnike moguće je smanjiti na način identificiranja i uklanjanja parametra visokog rizika prilikom odabira kritičnih atributa.

16,18



Slika 8. Dijagram razvoja analitičkih metoda korištenjem načela kvalitete ugrađene u dizajn²⁰

Razvoj analitičke metode korištenjem načela kvalitete ugrađene u dizajn provodi se u dvije faze. U prvoj fazi odabire se najučinkovitija kolona, dok se u drugoj fazi provode eksperimenti s varirajućim ostalim kromatografskim parametrima. Dobiveni podaci analiziraju se računalnim programima poput programa DryLab[®] i Fusion AE[™] pomoću kojih je moguće detaljnije obraditi i optimizirati metode.

2.6. DryLab®

DryLab® je softver za razvoj i optimizaciju HPLC metode koji su razvili Lloyd Snyder i njegov tim kolega istraživača. To je program koji predviđa kromatograme pod mnogo širim rasponom eksperimentalnih uvjeta nego što bi ikada bilo moguće postići u laboratoriju. Uz DryLab moguće je brzo i jednostavno odrediti kako će se mijenjati razdvajanja analita prilikom kromatografije pri čemu je moguće istovremeno mijenjati više parametara kromatografske metode poput pH-vrijednosti, temperature, koncentracija pufera i druge.⁵

DryLab® koristi stvarne podatke dobivene eksperimentima te pomoću njih konstruira područja označena različitim bojama. Odabirom jednog područja, program predviđa izgled kromatograma za dane parametre, pri čemu je vidljiv izgled kromatograma ovisno o predviđenim eksperimentalnim uvjetima. Osim vizualizacije interakcije ovih parametara, moguće je također predvidjeti izgled kromatograma kada se promjene parametri metode, kao što su dimenzije kolone, brzina protoka, gradijent elucije, parametri instrumenta i još mnogo toga. Svaka točka unutar područja odgovara jedinstvenom kromatogramu, prikazanom neposredno ispod područja rezolucije, a može se pratiti promjene rezolucije prilikom promijene parametara kromatografske metode. Mogući su i mnogi modeli za kromatografiju obrnutih faza.⁵

Jedna od glavnih opcija u programu DryLab® je opcija Dizajn eksperimenta (engl. *Design of experiment*, DoE), u kojoj je moguće odabrati sljedeće parametre ovisno o željenom eksperimentu:

- Vrijeme gradijentnog eluiranja
- Temperatura
- pH-vrijednost
- Udio organske faze pri izokratnom eluiranju
- Ionska jakost
- Trostruki sastav eluenta
- Koncentracija aditiva
- Koncentracija pufera

Modeliranjem razlučivanja s programom DryLab® moguće je brzo pronaći optimalne uvjete odvajanja i postići transparentnost, razumijevanje i kontrolu željene metode.²²

Programska opcija DryLab[®] kocka (engl. *DryLab's Cube*) proširuje dvodimenzionalno područje u trodimenzionalno područje pomoću opcije za uređenje metode eksperimentalnog područja (engl. *Method Operable Design Region*, MODR) koji se sastoji od tri parametra u kojima je moguće vizualizirati područje u kojima je moguće varirati tri parametra za robusne HPLC uvjete.⁵ Osim toga, moguće je modelirati do 8 drugih parametara, uključujući dimenzije stupaca, protok, postotak gradijenta i parametre instrumenata. DryLab[®] kocka daje eksponencijalno više uvjeta u kojima moguće modelirati željenu metodu te nudi intuitivan prikaz kako istovremene promjene više parametara metode utječu na kritičnu rezoluciju i selektivnost razlučivanja. Poseban prikaz prikazuje 3D regije koje ispunjavaju zadane zahtjeve rezolucije (na primjer, osnovno odvajanje svih pikova). Moguće je odabrati točno određeno područje kocke, ili se pomicati po osima kocke kako bi se vidjeli kromatogrami koji odgovaraju određenoj kombinaciji zadanih parametara kromatografske metode.²³

2.7. Genotoksična onečišćenja

Onečišćenje prilikom pripreve ljekovite tvari se definira kao bilo koja komponenta koja nije kemijski definirana kao nova ljekovita tvar. Onečišćenje može nastati iz polaznih materijala, prilikom proizvodnje lijeka, pakiranja lijeka ili kao razgradni produkt lijeka.

Genotoksična onečišćenja su onečišćenja koja uzrokuju sve vrste oštećenja DNA ili kromosoma. Oštećenja koja se mogu dogoditi su: stvaranje adukata, lomovi, aberacije kromosoma i mutacije. U ljudskom organizmu postoji sustav popravka DNA, ukoliko dođe do oštećenja, čiji je cilj održati stanicu na životu. Kapacitet popravka DNA je moguće nadvladati ukoliko je organizam često izložen genotoksičnim agensima.²⁴ Kako bi se odredila količina genotoksičnih onečišćenja potrebno je provoditi analize koje mogu detektirati vrlo niske koncentracije genotoksičnih onečišćenja od 1 do 10 ppm (engl. *Parts Per Million*).

Genotoksična onečišćenja koja su korištena u ovom radu određena su pomoću programa DEREK Nexus[®]. To je program koji simulacijom može predvidjeti toksičnost spoja ovisno o njegovoj strukturi te dati detaljno objašnjenje zašto je spoj toksičan. Za rad programa nije potreban poznavati sintetski put dobivanja spoja. Na temelju dobivenih rezultata simulacije, odabrana su tri onečišćenja koja su korištena u ovom diplomskom radu, a to su:

- 2-*tert*-butoksikarbonil-(2*S*,3*R*)-3-hidroksi-4-(*N*-izobutil-4-nitrofenilsulfonamido)-1-fenilbutan skraćenog naziva BOC NAMP

- {[[(2*R*)-1-[*N*-(2-metilpropil)-4-nitrobenzensulfonamido]-3-({[(3*S*)-oksolan-3-iloksi]karbonil}amino)-4-fenilbutan-2-il]oksi} fosfonska kiselina skraćenog naziva NFOS
- *N*-((2*R*,3*S*)-3-amino-2-hidroksi-4-fenilbutil)-*N*-izobutil-4-nitrobenzensulfonamid skraćenog naziva NAM FOS

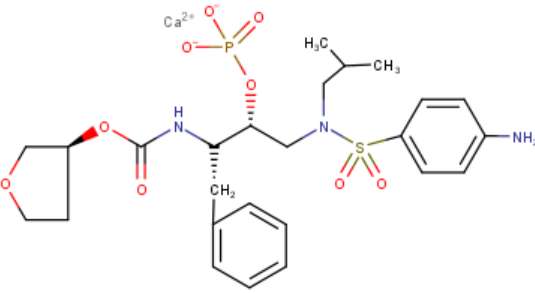
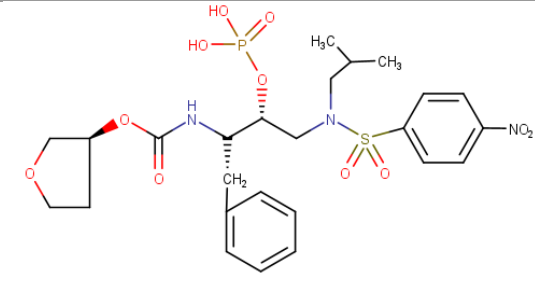
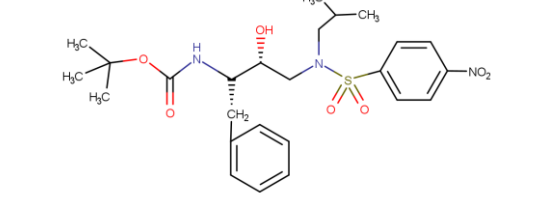
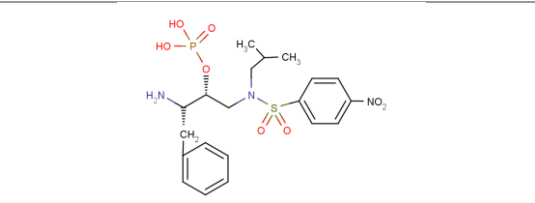
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Fosamprenavir i onečišćenja

U tablici 2 navedeni su podaci o korištenim i analiziranim spojevima.

Tablica 2. Oznake i strukture fosamprenavira i njegovih onečišćenja

| Oznaka uzorka | Struktura | Molarna masa / g mol^{-1} | Formula | Proizvođač |
|---------------|---|------------------------------------|--|---------------------|
| FSM |  | 623,67 | $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_9\text{PSCa}$ | TAPI Pliva Hrvatska |
| NFOS |  | 615,59 | $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{PS}$ | TAPI India |
| BOC NAMP |  | 521,63 | $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ | TAPI India |
| NAM FOS |  | 501,49 | $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{PS}$ | TAPI India |

3.1.2. Kemikalije

Popis korištenih kemikalija nalazi se u tablici

Tablica 3. Korištene kemikalije

| Kemikalija | Proizvođač | Čistoća |
|-------------------|----------------------|---------|
| Acetonitril | VWR Chemicals BDH | 99,95% |
| Amonijev acetat | Honeywell Fluka | 99% |
| Amonijev formijat | Honeywell Fluka | 99% |
| Mravlja kiselina | Biosolve Chimie | 99,5% |
| Octena kiselina | Biosolve Chimie | 99,5% |

3.2. Instrumenti

U nastavku slijedi popis korištenih instrumenata uz pripadajuće slike za svaki instrument.

Tehnička vaga EX 224 proizvođača Ohaus Explorer mjernog područja od 500 mg do 2500 g.



Slika 9. Tehnička vaga

Analitička mikrovaga UMX2 proizvođača Mettler Toledo mjernog područja od 1 µg do 2,1 mg.



Slika 10. Analitička mikrovaga

Uređaj za visokopročišćenu vodu MilliQ proizvođača Merck.



Slika 11. Uređaj za visokopročišćenu vodu

Ultrazvučna kupelj Sonorex Digitec proizvođača Bandelin.



Slika 12. Ultrazvučna kupelj

pH-metar 781 proizvođača Metrohm.



Slika 13. pH-metar

UHPLC Agilent Technologies Infinity 1290 II s binarnom pumpom.



Slika 14. UHPLC instrument

UHPLC-MS instrument proizvođača Waters koji se sastoji od Acquity UPLC dijela koji služi za kromatografsko odjeljivanje i Acquity QDa Detector dijela koji služi za detekciju spojeva na temelju snimanja spektara masa.



Slika 15. UHPLC-MS instrument

3.3. Metoda rada

3.3.1. Priprema mobilnih faza i diluenta

Za mobilnu fazu A (vodenu fazu) pripremljene su pufer otopine amonijevog formijata (NH_4HCO_2) i otopine amonijeva acetata ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$). Za pripremu 1 L 10 mmol/L otopine amonijeva formijata odvagano je 0,63 g amonijevog formijata na tehničkoj vagi Ohaus Explorer, u odmjernu tikvicu i nadopunjeno do oznake visokopročišćenom MilliQ vodom proizvođača Merck. Pripremljena otopina stavljena je na ultrazvučnu kupelj na Sonorex Digitec radi boljeg otapanja soli. Nakon otapanja uslijedilo je podešavanje pH-vrijednosti

pomoću razrijeđene otopine mravlje kiseline. pH-vrijednosti prve otopine podešena je na pH 2,81, a pH-vrijednost druge otopine podešena je na 4,01. Za pripremu 1L 10 mmol/L otopine amonijeva acetata odvagano je 0,77 g amonijevog acetata na tehničkoj vagi Ohaus Explorer, u odmjernu tikvicu i nadopunjeno do oznake visokopročišćenom MilliQ vodom proizvođača Merck. Pripremljena otopina stavljena je na ultrazvučnu kupelj na Sonorex Digitec radi boljeg otapanja soli. Nakon otapanja uslijedilo je podešavanje pH-vrijednosti pomoću razrijeđene otopine octene kiseline. pH-vrijednost otopine podešena je na pH 5.18.

Korišteno je gradijentno eluiranje pri čemu su bili korišteni gore navedeni puferi kao mobilna faza A i acetonitril kao mobilna faza B pri različitim omjerima ovisno o eksperimentu.

Kao diluent, odnosno otapalo za uzorke, korištena je smjesa acetonitrila i visokopročišćene MilliQ vode u omjeru 50:50 uz dodatak 0.1% mravlje kiseline.

3.3.2. Priprema standardnih otopina fosamprenavira i onečišćenja

Za razvoj i optimizaciju metode korištena je otopina smjese fosamprenavira i njegovih onečišćenja tako što je izvagano 10 mg fosamprenavira i 10 mg tri njegova onečišćenja na analitičkoj vagi Mettler Toledo. Svaki od uzoraka otopljen je u odmjernoj tikvici od 10 mL te nadopunjen diluentom do oznake. Za svrhe eksperimenta uzeto je po 1 mL otopina u zasebne spremnike za analizu uzoraka.

Za pripremu otopina za određivanje rezolucije izvagano je 50 mg fosamprenavira, 25 mg onečišćenja BOC NAMP, 12.5 mg onečišćenja NAM FOS i 6 mg onečišćenja NFOS u tikvicu od 25 mL. Tikvica je nadopunjena do oznake s diluentom te je stavljena u ultrazvučnu kupelj na petnaest minuta.

Za određivanja praga toksikološke zabrinutosti (engl. *threshold of toxicological concern*, TTC) potrebno postići koncentracije od 1 ppm, odnosno koncentracije od 0,001 mg/mL. Otopine su pripremljene tako što je izvagano 10 mg onečišćenja NFOS, BOC NAMP i NAM FOS u zasebne tikvice od 10 mL koje su potom nadopunjene do oznake. Dobivena koncentracija onečišćenja iznosila je 1 mg/mL. Iz dobivenih otopina uzet je 1 mL otopine te razrijeđen u tikvici od 10 mL s diluentom pri čemu su dobivene otopine c_1 koncentracije vrijednosti 0,1 mg/mL. Iz novonastale otopine c_1 uzet je 1 mL otopine te razrijeđen u tikvici od 10 mL s diluentom pri čemu su dobivene otopine c_2 koncentracije vrijednosti 0,01 mg/mL. Iz novonastale otopine c_3 uzet je 1 mL otopine te razrijeđen u tikvici od 10 mL s diluentom

pri čemu su dobivene otopine c_3 koncentracije vrijednosti 0,001 mg/mL. Dobivene otopine c_3 korištene su kao standardne otopine za određivanje praga toksikološke zabrinutosti. Otopine fosamprenavira različitih šarži pripremljene su tako što se otopilo 10 mg uzorka svake šarže u mililitru diluenta. Šarže fosamprenavira koje su analizirane: FSM-Š-1-5h, FSM-Š-1-9h, FSM-Š-1-12h, FSM-Š-1-16h, FSM-Š-1-18h, FSM-Š-1-21h, FSM-Š-1-27h, FSM-Š-1-33h, FSM-Š-1-39h.

3.3.3. Razvoj i optimiziranje metode

Za razvoj i optimiziranje metode korištene su otopine opisane u poglavlju 3.2.2. Otopine su prebačene u spremnik za analizu uzorka od 1 mL te postavljene u UHPLC instrument, *Agilent Technologies 1290 Infinity II* s binarnom pumpom. Korištena je *ACQUITY UPLC® BEH C18* kolona 130Å, 1.7 μm, 2,1 mm X 100 mm. Tijekom eksperimenta mijenjali su se sljedeći uvjeti: pH-vrijednost pokretne faze, gradijent i temperatura kolone.

Eksperimentalni uvjeti kromatografske analize fosamprenavira i njegovih onečišćenja prikazani su u sljedećim tablicama.

Tablica 4. Kromatografski parametri za prvu UHPLC analizu u trajanju od 15 min, pri pH = 2,81 i temperaturi kolone od 35 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 10,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 15,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 μL | | | |
| 0,5 mL/min | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 35 °C | | | |

Tablica 5. Kromatografski parametri za drugu UHPLC analizu u trajanju od 25 min, pri pH = 2,81 i temperaturi kolone od 35 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 20,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 25,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 35 °C | | | |

Tablica 6. Kromatografski parametri za treću UHPLC analizu u trajanju od 15 min, pri pH = 2,81 i temperaturi kolone od 60 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 10,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 15,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 60 °C | | | |

Tablica 7. Kromatografski parametri za četvrtu UHPLC analizu u trajanju od 25 min, pri pH = 2,81 i temperaturi kolone od 60 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 2,81 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 20,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 25,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 60 °C | | | |

Tablica 8. Kromatografski parametri za petu UHPLC analizu u trajanju od 15 min, pri pH = 4,00 i temperaturi kolone od 35 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 10,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 15,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 35 °C | | | |

Tablica 9. Kromatografski parametri za šestu UHPLC analizu u trajanju od 25 min, pri pH = 4,00 i temperaturi kolone od 35 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 20,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 25,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 35 °C | | | |

Tablica 10. Kromatografski parametri za sedmu UHPLC analizu u trajanju od 15 min, pri pH = 4,00 i temperaturi kolone od 60 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 10,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 15,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 60 °C | | | |

Tablica 11. Kromatografski parametri za osmu UHPLC analizu u trajanju od 25 min, pri pH = 4,00 i temperaturi kolone od 60 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH_4HCO_2) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH_4HCO_2) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 20,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 25,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 μL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 60 °C | | | |

Tablica 12. Kromatografski parametri za devetu UHPLC analizu u trajanju od 15 min, pri pH = 5,18 i temperaturi kolone od 35 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 10,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 15,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 μL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 35 °C | | | |

Tablica 13. Kromatografski parametri za desetu UHPLC analizu u trajanju od 25 min, pri pH = 5,18 i temperaturi kolone od 35 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev acetat (CH ₃ COONH ₄) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev acetat (CH ₃ COONH ₄) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 20,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 22,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 25,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 35 °C | | | |

Tablica 14. Kromatografski parametri za jedanaestu UHPLC analizu u trajanju od 15 min, pri pH = 5,18 i temperaturi kolone od 60 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev acetat (CH ₃ COONH ₄) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev acetat (CH ₃ COONH ₄) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 10,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 15,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 60 °C | | | |

Tablica 15. Kromatografski parametri za dvanaestu UHPLC analizu u trajanju od 25 min, pri pH = 5,18 i temperaturi kolone od 60 °C.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev acetat (CH ₃ COONH ₄) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev acetat (CH ₃ COONH ₄) pH = 5,18 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 10,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 12,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 15,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 60 °C | | | |

Nakon provedbe eksperimenata slijedi ponavljanje eksperimenta pri optimalnim uvjetima koji su dobiveni programom DryLab.

3.3.4. Program DryLab®

Nakon provedenih prvih UHPLC analiza, rezultati su integrirani i obrađeni u programu DryLab®. Pomoću programa DryLab® dobiven je 3D prikaz koji se sastoji od tri parametra, a to su pH-vrijednost pufera, temperatura kolone i vrijeme gradijentnog eluiranja. Analizom 3D prostora moguće je dobiti optimalne uvijete za kromatografsku analizu fosamprenavira i njegovih onečišćenja na način da se promatra ovisnost jednog parametra o druga dva. Na temelju dobivenih optimalnih uvjeta, ponovljena je UHPLC analiza s istim eksperimentalnim uvjetima, pH-vrijednostima 2,81, 4,00 i 5,18, temperaturama od 35°C i 60°C te vremenu gradijentnog eluiranja u trajanju do 15 minuta ili 25 minuta na koloni ACQUITY UPLC® BEH C18.

3.3.5. Određivanje koncentracije genotoksičnih onečišćenja

Prag toksične zabrinutosti (engl. *threshold of toxicological concern*, TTC) je načelo koje se odnosi na mogućnosti da se utvrdi koja je minimalna koncentracija nekog spoja kojoj čovjek

može biti izložen, a da nema nikakvog značajnog rizika za ljudsko zdravlje. On je različit za svaki spoj, a povezan je s maksimalnom dnevnom dozom (engl. *maximum daily dosage*, MDD) za aktivne tvari. TTC se računa na način da se podijeli prag tolerancije s maksimalnom dnevnom dozom. U slučaju fosamprenavira prag tolerancije iznosi 1,5 µg, a maksimalna dnevna doza iznosi 2,8 g, iz čega se dolazi do vrijednosti praga toksične zabrinutosti koja iznosi 0,553 ppm.

Za određivanje koncentracije genotoksičnih onečišćenja, odnosno genotoksika u različitim šaržama fosamprenavira korišten je instrument UHPLC-MS pri optimalnim uvjetima određenim programom DryLab[®]. Koncentracija genotoksika odredila se usporedbom odziva detektora za uzorak šarže fosamprenavira i odziva detektora za standardnu otopinu onečišćenja.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati UHPLC analize

4.1.1. Odabir pH-vrijednosti mobilnih faza

Za odabir pH-vrijednosti mobilnih faza korišten je program Marvin® u kojemu je moguće nacrtati strukture kemijskih spojeva te napisati kemijske reakcije. Na temelju nacrtanih struktura i poznatih pK_a vrijednosti program računa distribuciju specija pripadne tvari u ovisnosti o pH. Nadalje, program može izračunati i logaritamsku vrijednost koeficijenta distribucije ($\log D$) koji predstavlja raspodjelu svih specija, ioniziranih i neioniziranih, između organskog otapala i pufera. Dobiveni podaci za fosamprenavir i njegova onečišćenja prikazani su na slikama D1-D8 u prilogu. Pomoću grafičkih prikaza odabrano je optimalno područje pH za mobilne faze pri analizi fosamprenavira i njegovih onečišćenja.

Tablica 16. Optimalno pH područje pojedine specije fosamprenavira i njegovih onečišćenja

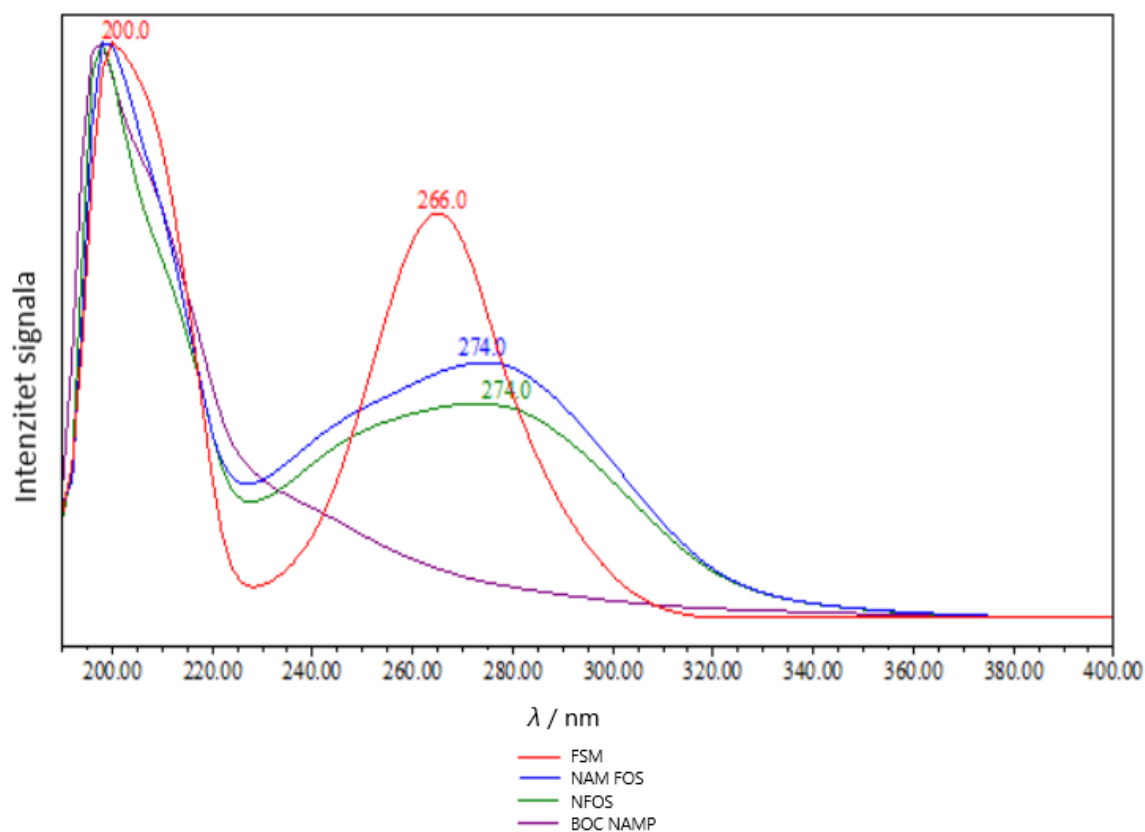
| Uzorak | Optimalno područje pH-vrijednosti | | | |
|----------|-----------------------------------|-----------|-----------|------------|
| FSM | 0,00-1,20 | 1,30-2,50 | 2,50-6,30 | 6,30-13,80 |
| NAM FOS | 0,00-1,20 | 1,20-6,40 | | 6,40-13,40 |
| NFOS | 0,00-1,20 | 1,20-6,40 | | 6,40-13,40 |
| BOC NAMP | 0,00-13,60 | | | |

Potrebno je pronaći točne pH-vrijednosti koje odgovaraju svih analiziranim spojevima. Ukoliko se ne koristi odgovarajuća pH-vrijednost, može doći do promjene u stupnju ionizacije analita, a time i do promjene interakcije između analita i stacionarne faze, što rezultira promjenom vremena zadržavanja. Ionizirani analit će se ranije eluirati, dok će se neionizirani analit dulje zadržati na koloni. U ovom radu odabrane su pH-vrijednosti 2,80; 4,00 i 5,20 koje odgovaraju neioniziranom fosamprenaviru i njegovim onečišćenjima.

4.1.2. Odabir valne duljine

Kako bi se odredila valna duljina za detekciju odijeljenih spojeva, snimljen je UV spektar otopine fosamprenavira i njegovih onečišćenja. Eksperiment je proveden pri pH-vrijednosti od 2,18 uz temperaturu kolone od 35 °C u trajanju od 15 minuta. Dobiveni UV spektri su

prikazani na slici 16. Usporedbom UV spektara odlučeno je da će se za detekciju analita u daljnjim eksperimentima koristiti valna duljina od 254 nm.

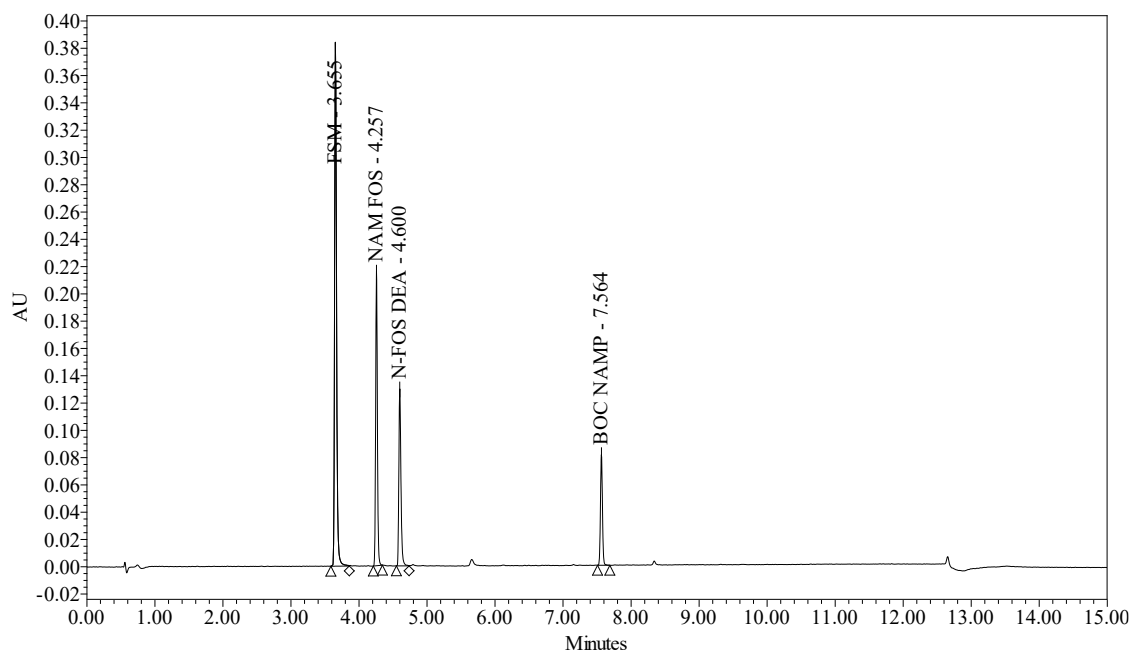


Slika 16. Ultraljubičasti spektar fosamprenavira i njegovih onečišćenja.

Vrijeme analize 15 minuta, pH = 2,18 i temperatura kolone 35 °C.

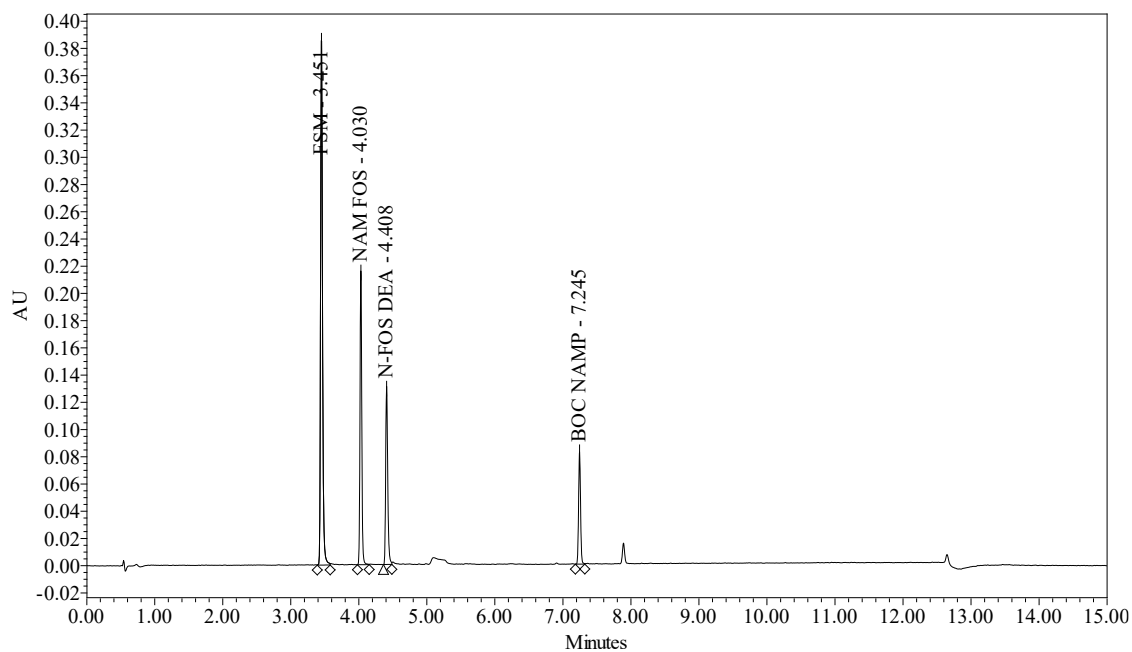
4.1.3. Rezultati eksperimenata prije optimizacije

S odabranim pH-vrijednostima i određenom valnom duljinom detekcije dobiveni su rezultati početnih eksperimenata. Eksperimenti su provedeni na koloni *ACQUITY UPLC[®] BEH C18*. Eksperimentalni parametri koji su mijenjani bili su pH-vrijednost (2,81, 4,00 i 5,18), temperatura u vrijednostima od 35 °C i 60 °C te vrijeme gradijentnog eluiranja u trajanju do 15 ili 25 minuta.



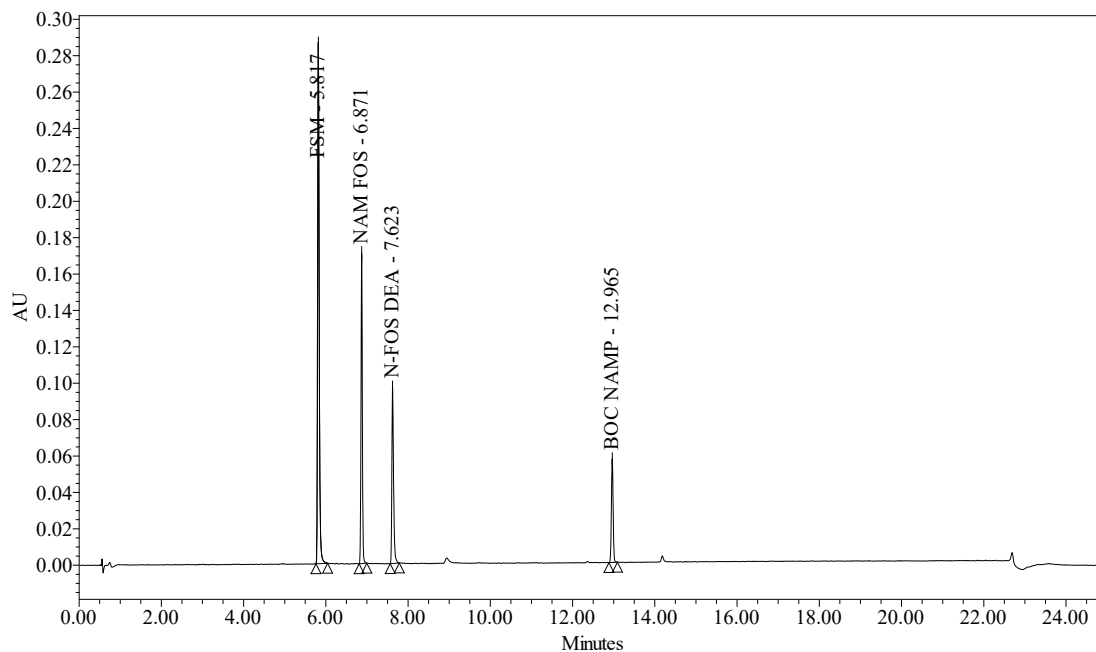
Slika 17. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.

Vrijeme analize 15 min, pH = 2,82 i temperatura kolone 35 °C.

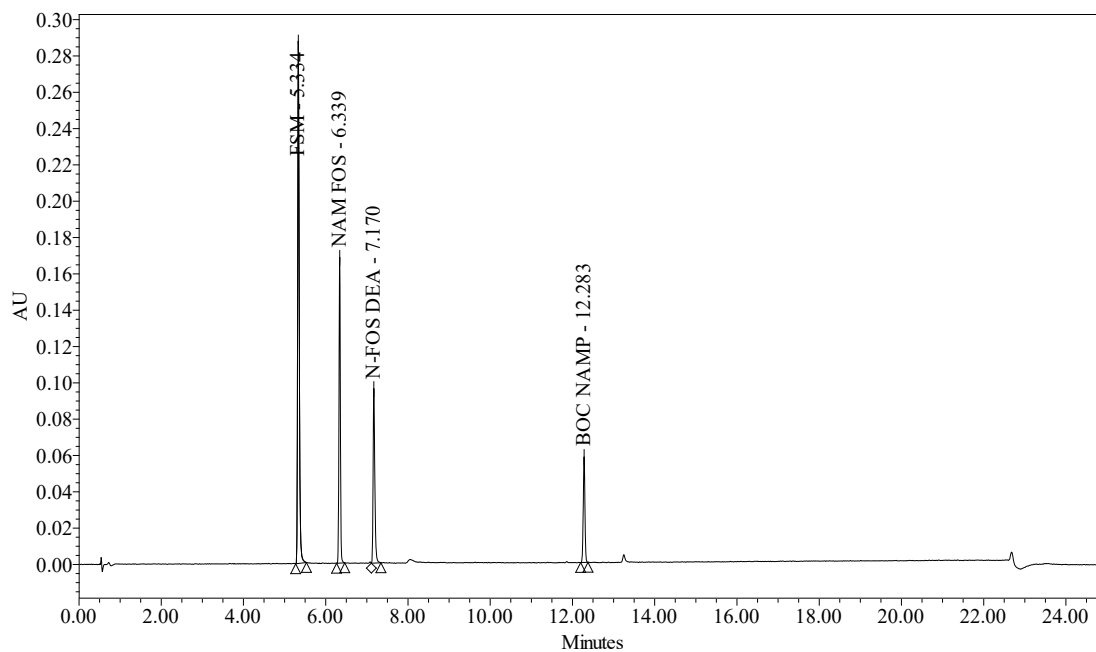


Slika 18: Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.

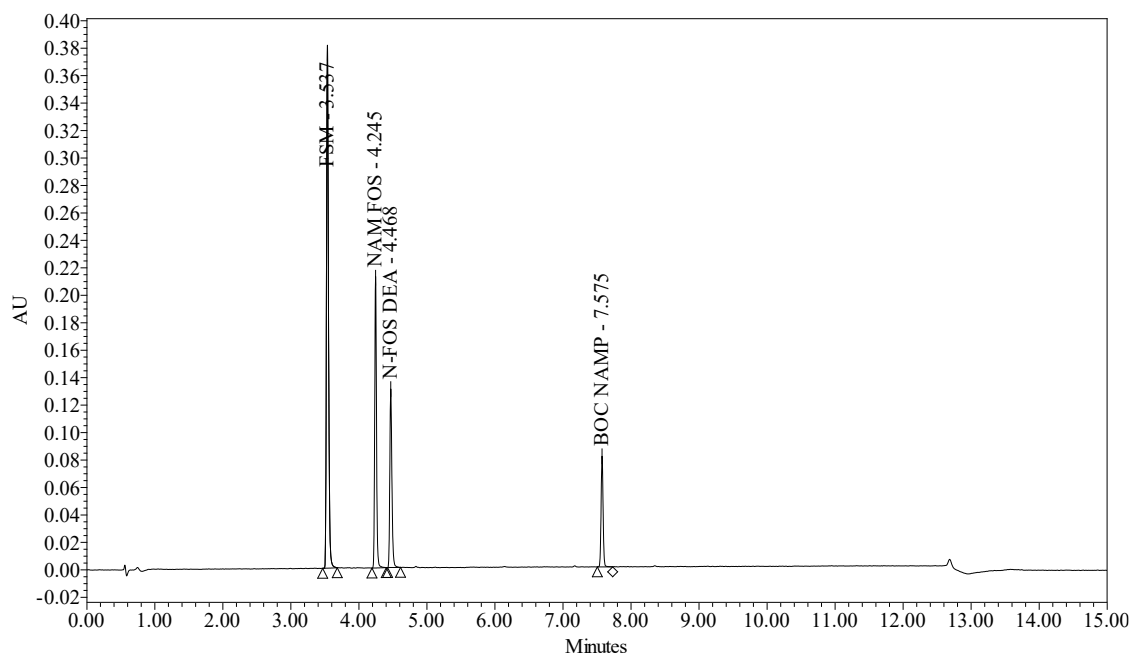
Vrijeme analize 15 min, pH = 2,82 i temperaturi kolone 60 °C.



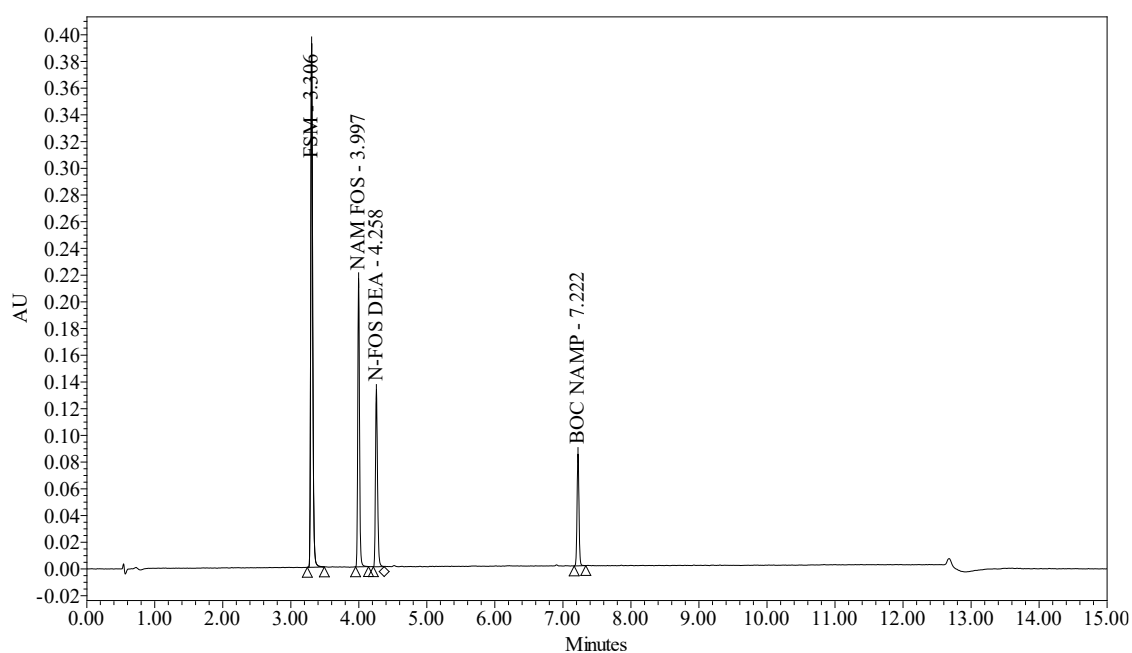
Slika 19. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 25 min, pH = 2,82 i temperaturi kolone 35 °C.



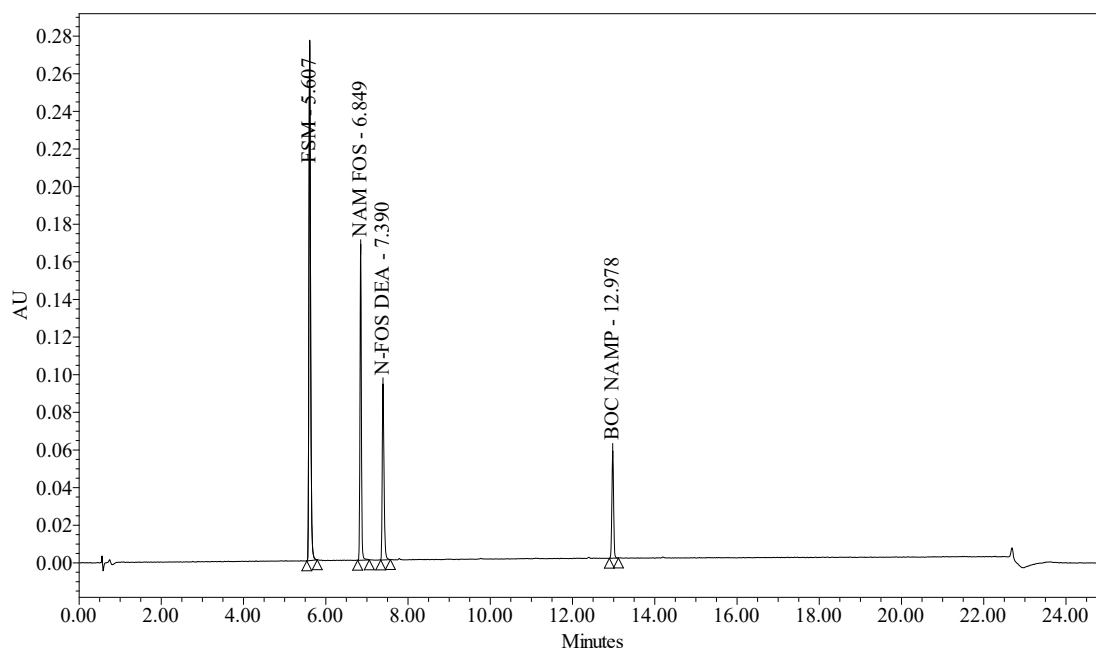
Slika 20. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 25 min, pH = 2,82 i temperaturi kolone 60 °C.



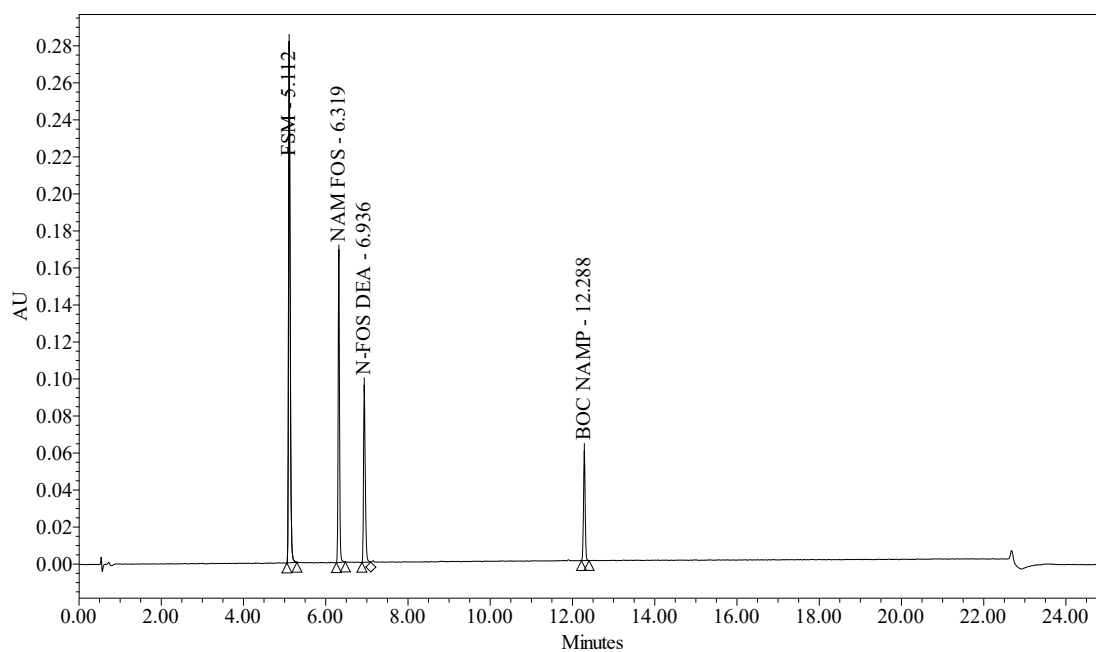
Slika 21. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 15 min, pH = 4,00 i temperaturi kolone 35 °C.



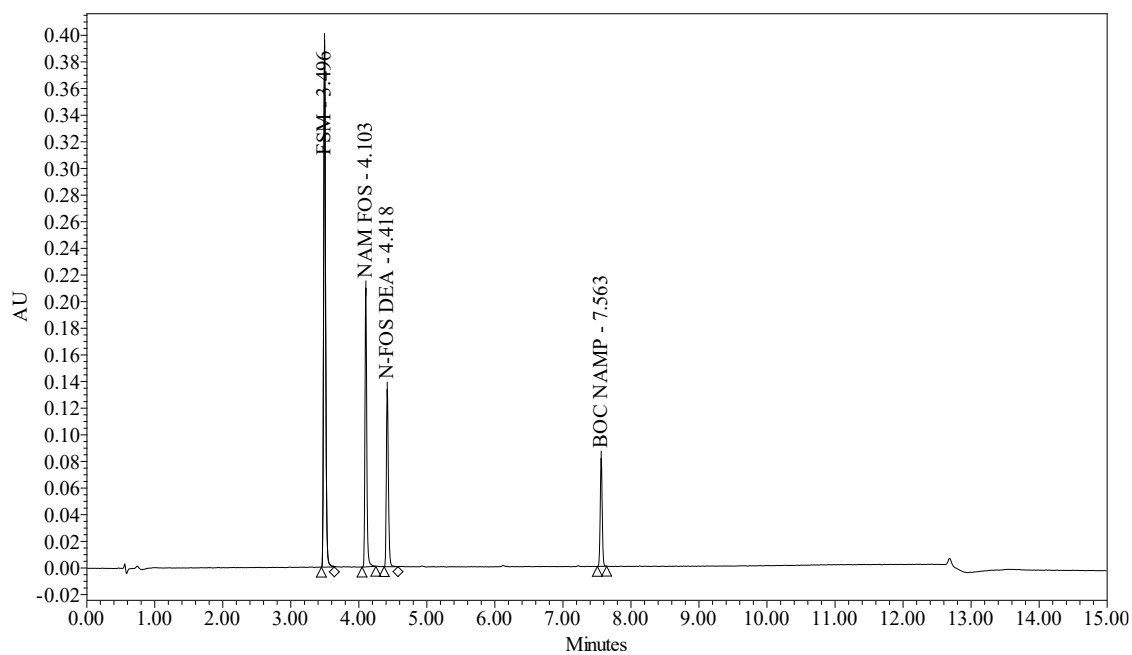
Slika 22. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 15 min, pH = 4,00 i temperaturi kolone 60 °C.



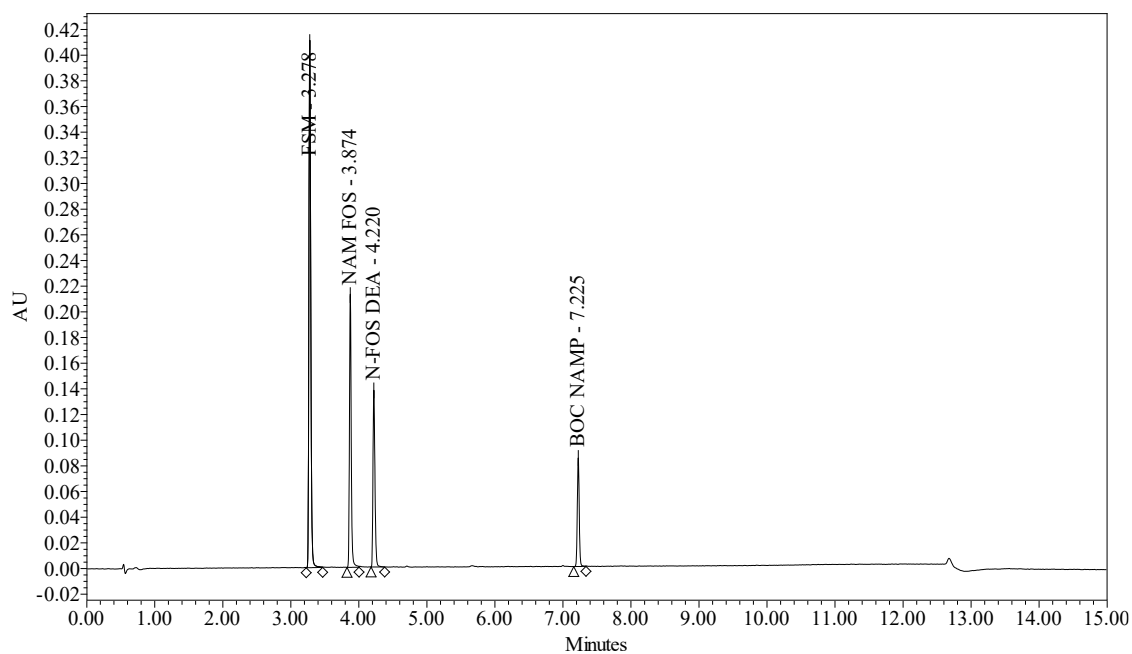
Slika 23. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 25 min, pH = 4,00 i temperaturi kolone 35 °C.



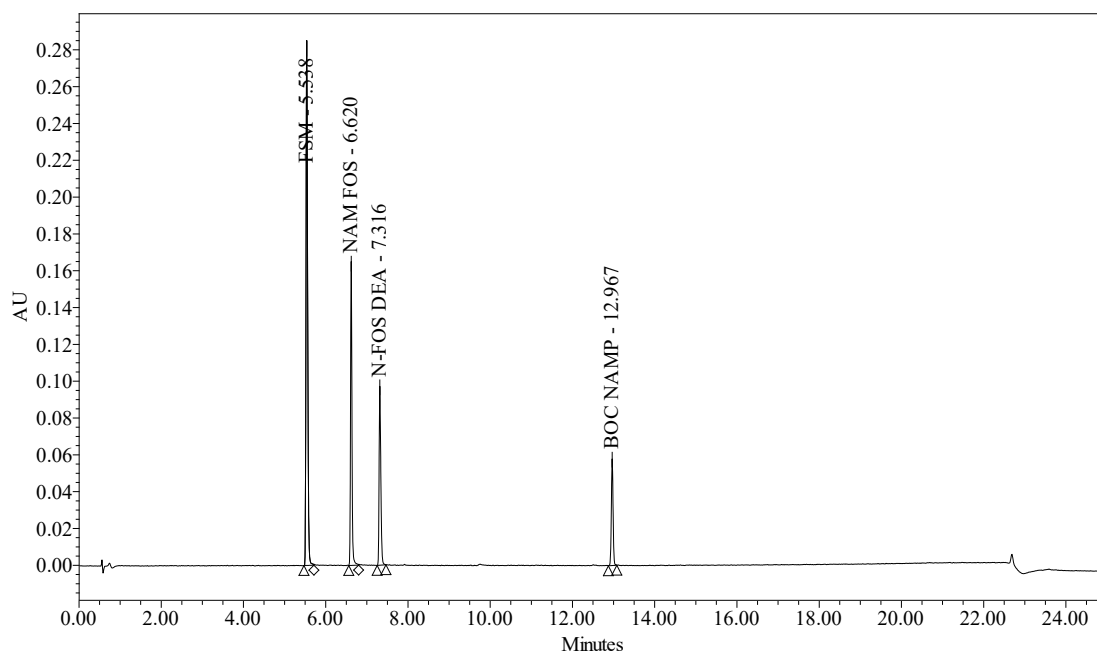
Slika 24. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 25 min, pH = 4,00 i temperaturi kolone 60 °C.



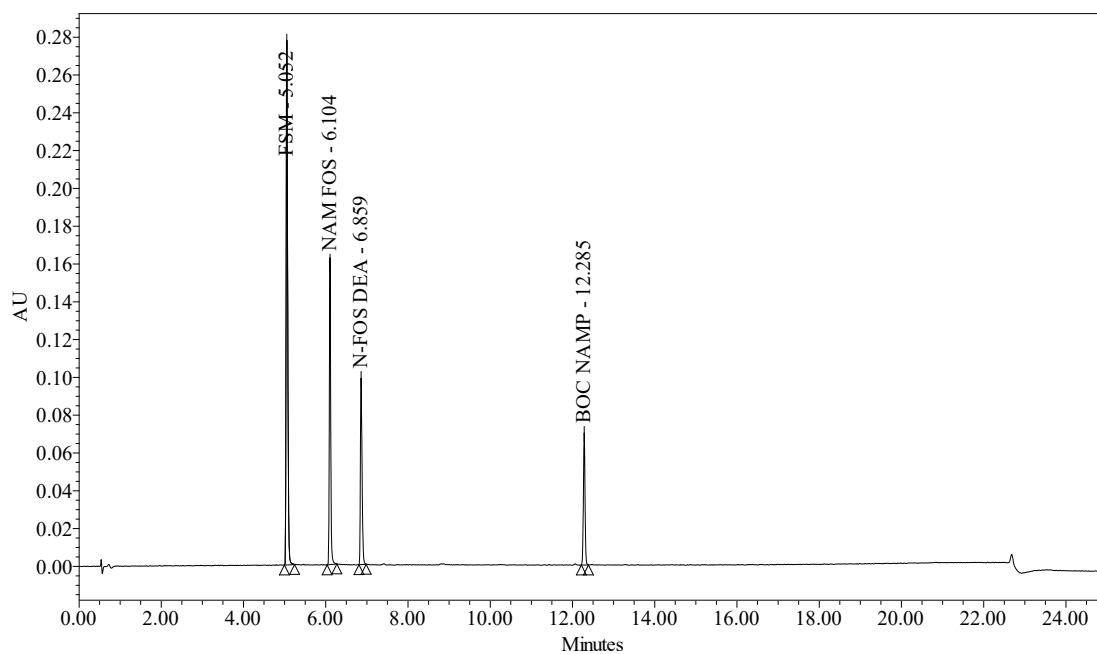
Slika 25. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 15 min, pH = 5,18 i temperaturi kolone 35 °C.



Slika 26. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 15 min, pH = 5,18 i temperaturi kolone 60 °C.



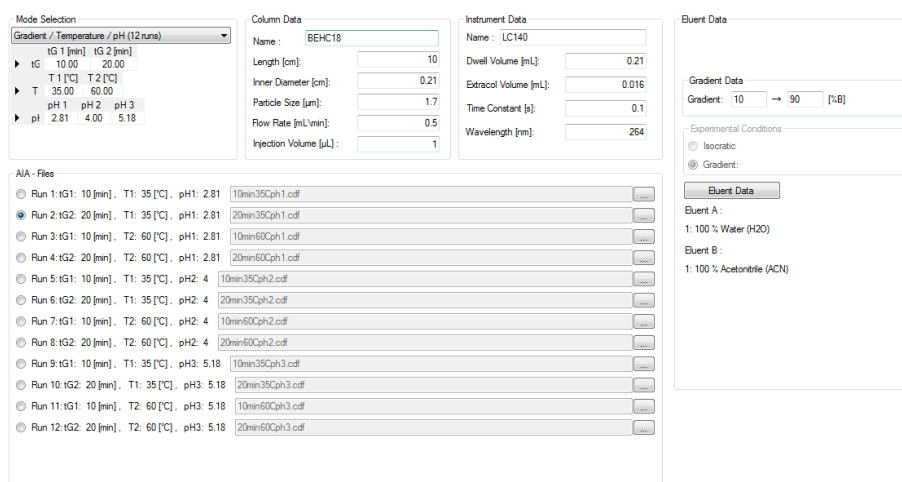
Slika 27. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 25 min, pH = 5,18 i temperaturi kolone 35 °C.



Slika 28. Kromatogram smjese fosamprenavira i onečišćenja.
Vrijeme analize 25 min, pH = 5,18 i temperaturi kolone 60 °C.

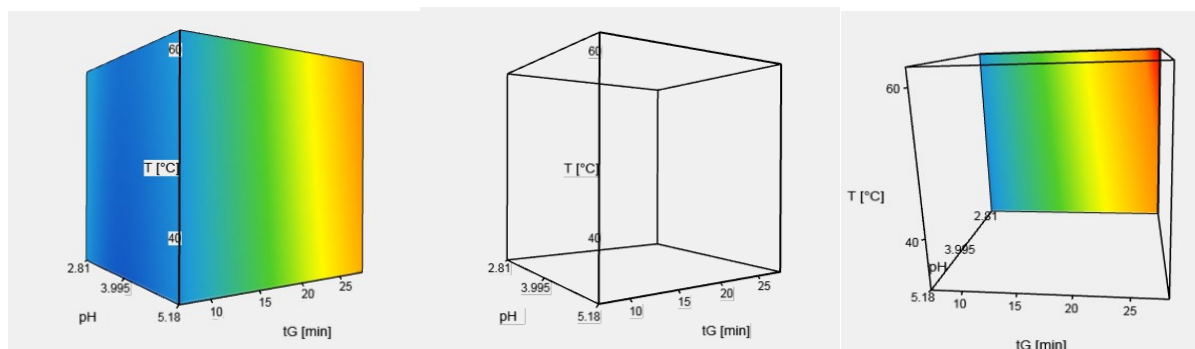
4.2. Razvoj metode u programu DryLab®

Rezultati dobivenih UHPLC analizom na koloni analizirani su u programu DryLab® kako bi se provela simulacija kromatografskog procesa pri nekim drugim eksperimentalnim uvjetima. Postavke za program DryLab® prikazane su na slici 29. U postavkama su postavljeni eksperimentalni uvjeti iz prve provedene analize poput pH-vrijednosti, temperature kolone, vremena gradijentnog eluiranja i korištenih mobilnih faza. Tim postavkama pridruženi su podaci dobiveni provedenim UHPLC analizama, na temelju kojih program računa izgled kromatograma pri drugim uvjetima. Dodani su podaci o punilu kolone te podaci koji opisuju instrumentalne uvjete.



Slika 29. Korisničko sučelje programa DryLab® za simulaciju kromatografije

U sljedećem koraku su analizirani dobiveni rezultati simulacije. Dobiveni rezultati prikazani su 3D modelom. Na osima su navdene pH-vrijednost, temperatura kolone i vrijeme gradijentnog eluiranja. Za svaki uvjet mogu se zasebno promatrati 2D sustavi uz koje su vidljivi teoretski kromatogrami.



Slika 30: 3D prikaz rezultata dobivenih pomoću programa DryLab®

U nastavku rada u programu DryLab[®] koristila se opcija Uređivanje gradijenta (engl. *Gradient editor*) kojom se prikazuje izgled kromatograma prilikom promjene gradijenta eluiranja. Početni eksperimentalni uvjeti bili su pH 4,00, temperatura kolone 45 °C, a program je varirao vremena gradijetnog eluiranja. Nakon toga provedeni su eksperimenti na koloni *ACQUITY UPLC[®] BEH C18*. Pojedina analiza provedena je dva puta, uz ispiranje od dvije minute između injektirana pri početnim uvjetima. Na slici 31 može se vidjeti usporedba dobivenih DryLab modela za provedene eksperimente označeno zelenim bojama s dobivenim eksperimentalnim rezultatima, označeno rožom bojom.



Slika 31: Usporedba kromatograma dobivenih DryLab modelom (zeleno) i eksperimentalnim putem (roza)

Tablica 17: Kromatografski parametri za prvu UHPLC analizu dobivenu uređivanjem gradijenta iz programa DryLab®.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 78,00 | 22,00 | 1100,00 |
| | 2,50 | 60,00 | 40,00 | 1100,00 |
| | 2,75 | 25,00 | 75,00 | 1100,00 |
| | 4,00 | 15,00 | 85,00 | 1100,00 |
| | 4,01 | 78,00 | 22,00 | 1100,00 |
| | 6,01 | 78,00 | 22,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 45 °C | | | |

Tablica 18: Kromatografski parametri za drugu UHPLC analizu dobivenu uređivanjem gradijenta iz programa DryLab®.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 80,00 | 20,00 | 1100,00 |
| | 3,25 | 65,00 | 35,00 | 1100,00 |
| | 3,75 | 25,00 | 75,00 | 1100,00 |
| | 5,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 45 °C | | | |

Tablica 19: Kromatografski parametri za treću UHPLC analizu dobivenu uređivanjem gradijenta iz programa DryLab®.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 3,70 | 60,00 | 40,00 | 1100,00 |
| | 3,90 | 20,00 | 80,00 | 1100,00 |
| | 5,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 5,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| | 7,01 | 90,00 | 10,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 45 °C | | | |

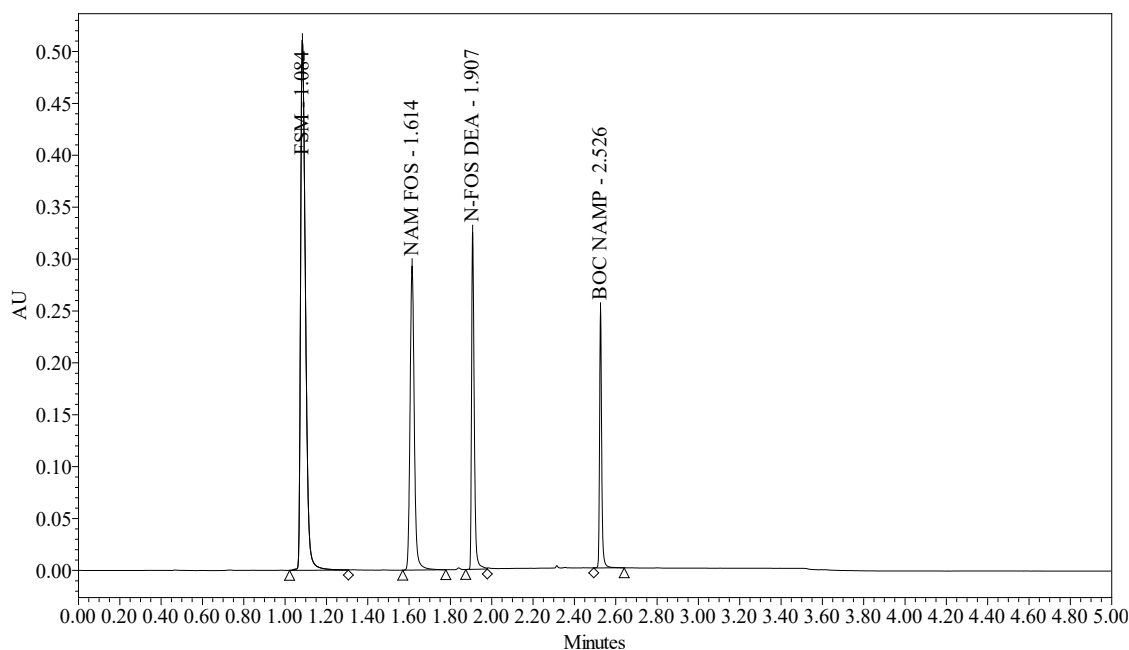
Tablica 20: Kromatografski parametri za četvrtu UHPLC analizu dobivenu uređivanjem gradijenta iz programa DryLab®.

| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 70,00 | 30,00 | 1100,00 |
| | 1,20 | 63,00 | 37,00 | 1100,00 |
| | 1,90 | 20,00 | 80,00 | 1100,00 |
| | 3,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| | 3,01 | 70,00 | 30,00 | 1100,00 |
| | 5,01 | 70,00 | 30,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 45 °C | | | |

Svaki od ova četiri eksperimenta daje zadovoljavajuće kromatograme u kojima dolazi do uspješnog odvajanja. Metoda koja je izabrana za daljnje istraživanje bila je četvrta metoda, zbog kraćeg vremena eluiranja, zbog čega je potrebna manja količina otapala. Navedena metoda dodatno je ubrzana kako ne bi došlo do preopterećivanja HPLC-MS instrumenta zbog visokog tlaka. Ukoliko se povisi temperature kolone u instrumentu, moguće je koristiti niži tlak. Metoda je ubrzana na način da je ponovljen eksperiment s istim eksperimentalnim uvjetima osim temperature kolone koja je povišena s 45 °C na 60 °C.

Tablica 21. Kromatografski parametri za optimiziranu UHPLC analizu dobivenu programa DryLab[®].

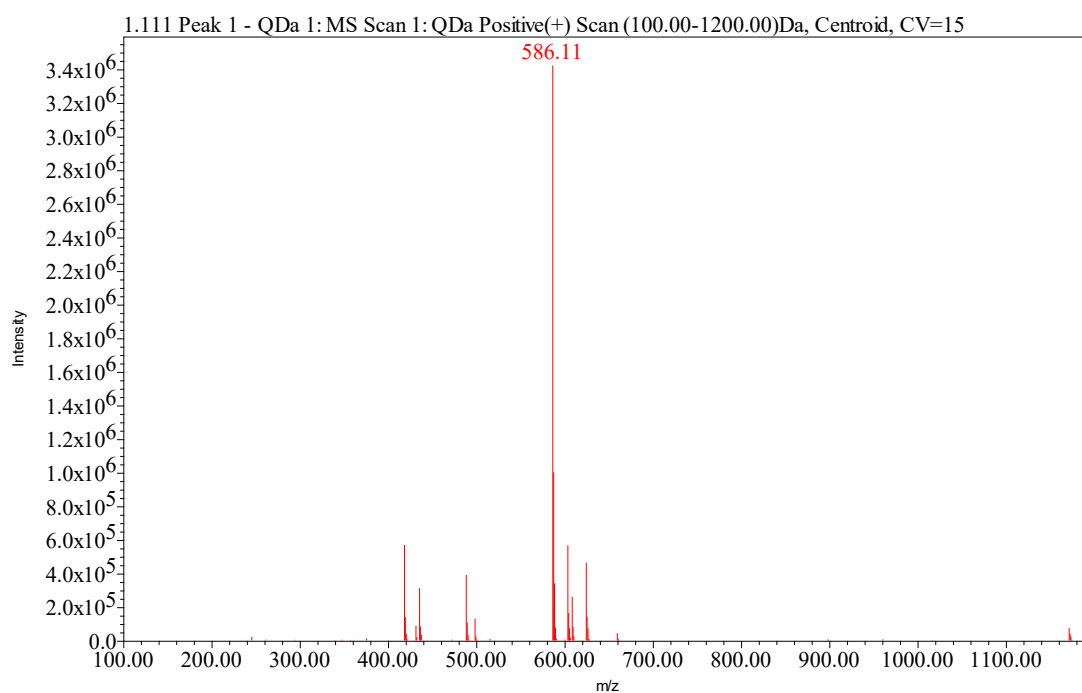
| | | | | |
|----------------------|---|--------------|--------------|---------------------|
| Pufer | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza A | 10 mM amonijev formijat (NH ₄ HCO ₂) pH = 4,00 | | | |
| Mobilna faza B | Acetonitril | | | |
| Gradijent | Vrijeme /min | Eluens A / % | Eluens B / % | Granica tlaka / bar |
| | 0,00 | 70,00 | 30,00 | 1100,00 |
| | 1,20 | 63,00 | 37,00 | 1100,00 |
| | 1,90 | 20,00 | 80,00 | 1100,00 |
| | 3,00 | 10,00 | 90,00 | 1100,00 |
| Volumen injektiranja | 1 µL | | | |
| Protok | 0,5 mL/min | | | |
| Detektor | 254 nm | | | |
| Temperatura kolone | 60 °C | | | |



Slika 32. Kromatogram fosamprenavira i onečišćenja dobiven pri odabranim optimiziranim uvjetima u trajanju od 5 min, pri pH = 4,00 i temperaturi kolone od 60 °C.

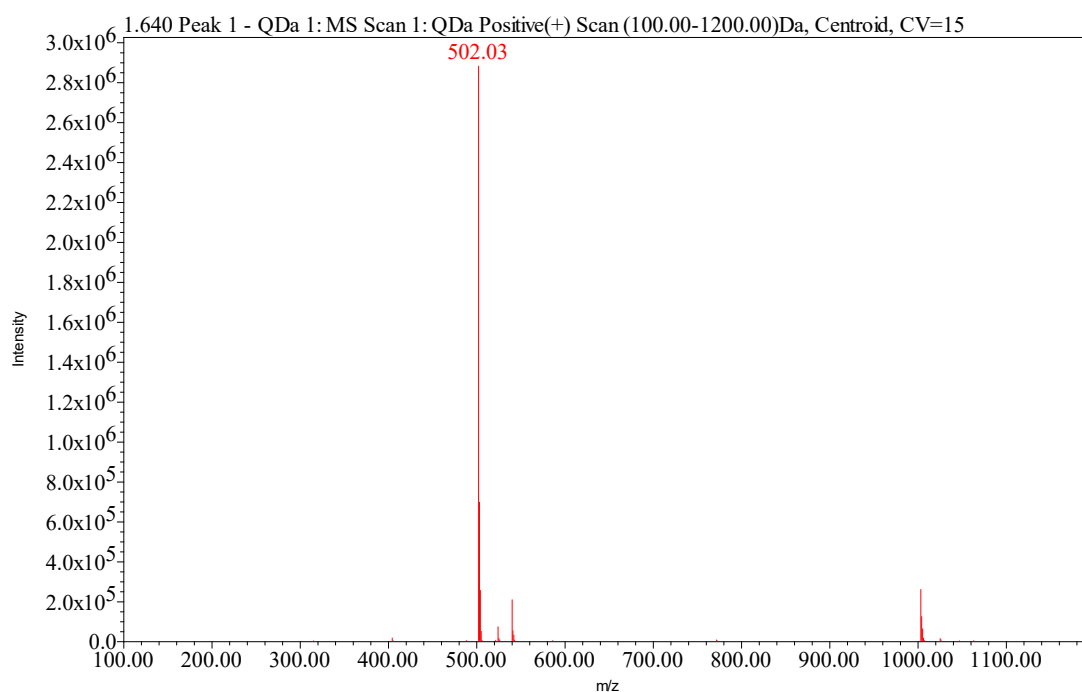
4.3. Rezultati HPLC-MS analize

Za određivanje koncentracije genotoksičnih onečišćenja u šaržama fosamprenavira korištena je tehnika HPLC-MS analize pomoću instrumenta Acquity UHPLC-MS. Eksperimentalni uvjeti koji su se koristi za analizu bili su jednaki uvjetima za ubrzanu optimiziranu četvrtu metodu dobivenu pomoću uređivanja gradijenta iz programa DryLab[®]. Analizirane otopine bile su standardne otopine fosamprenavira i njegovih genotoksičnih onečišćenja koncentracije 1 ppm i otopine uzoraka različitih šarža lijeka fosamprenavira. U spektrima masa standardnih otopina fosamprenavira i njegovih onečišćenja vrlo su lako uočljivi osnovni odnosno bazni signali za svaki analit.



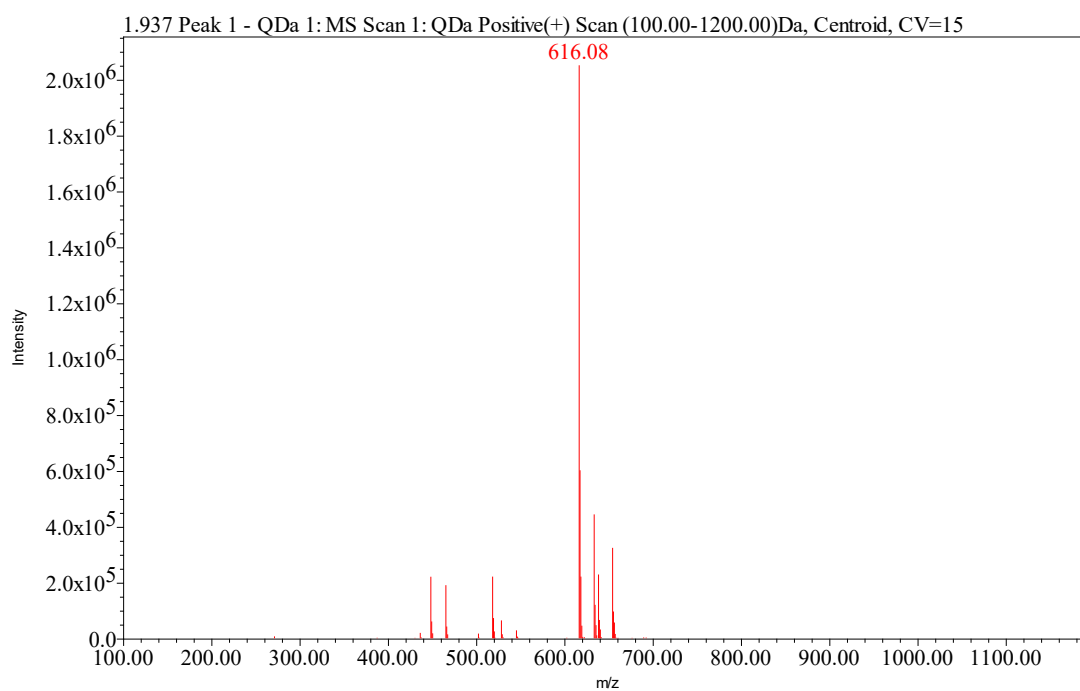
Slika 33. Spektar masa uzoraka fosamprenavira dobiven HPLC-MS analizom.

$\gamma = 1$ ppm, pH = 4,00, temperatura kolone 60 °C, trajanje analize 5 min.



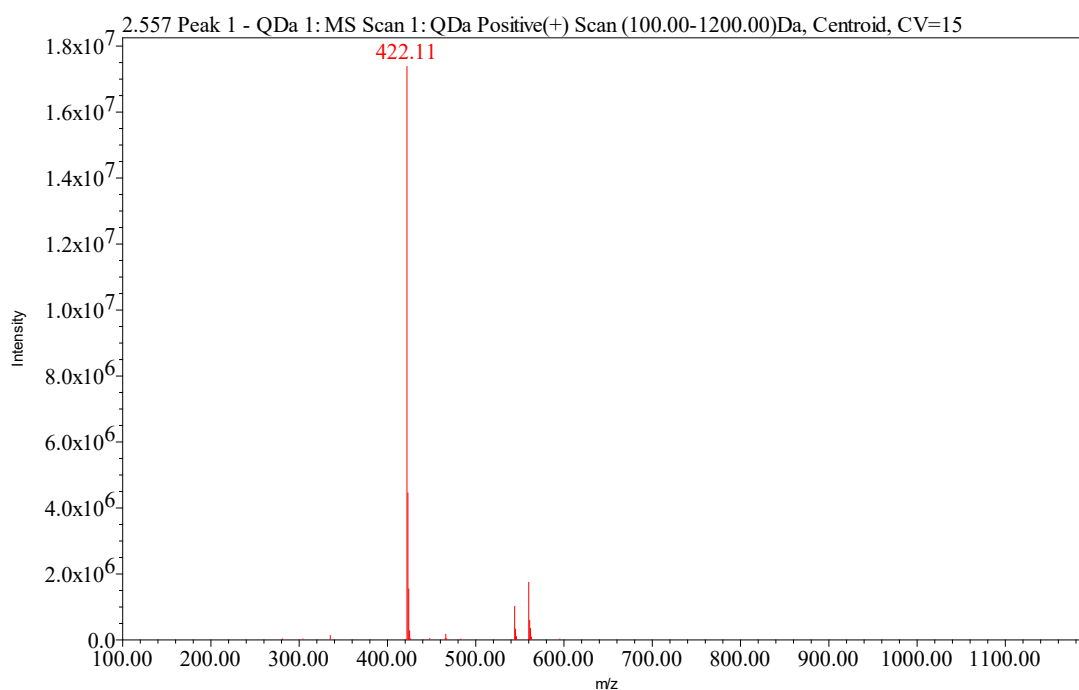
Slika 34. Spektar masa uzorka NAM FOS dobiven HPLC-MS analizom.

$\gamma = 1$ ppm, pH = 4,00, temperatura kolone 60 °C, trajanje analize 5 min.



Slika 35. Spektar masa uzorka NFOS dobiven HPLC-MS analizom.

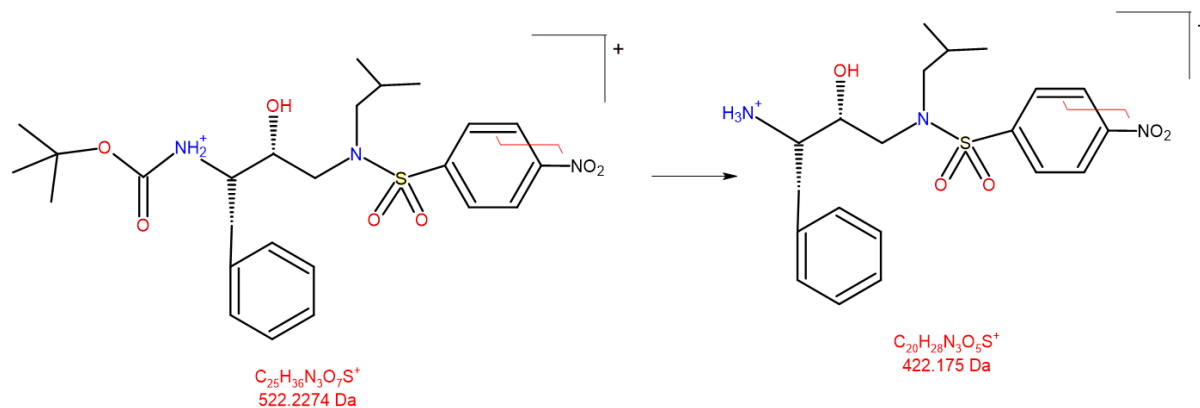
$\gamma = 1$ ppm, pH = 4,00, temperatura kolone 60 °C, trajanje analize 5 min



Slika 36. Spektar masa uzorka BOC NAMP dobiven HPLC-MS analizom.

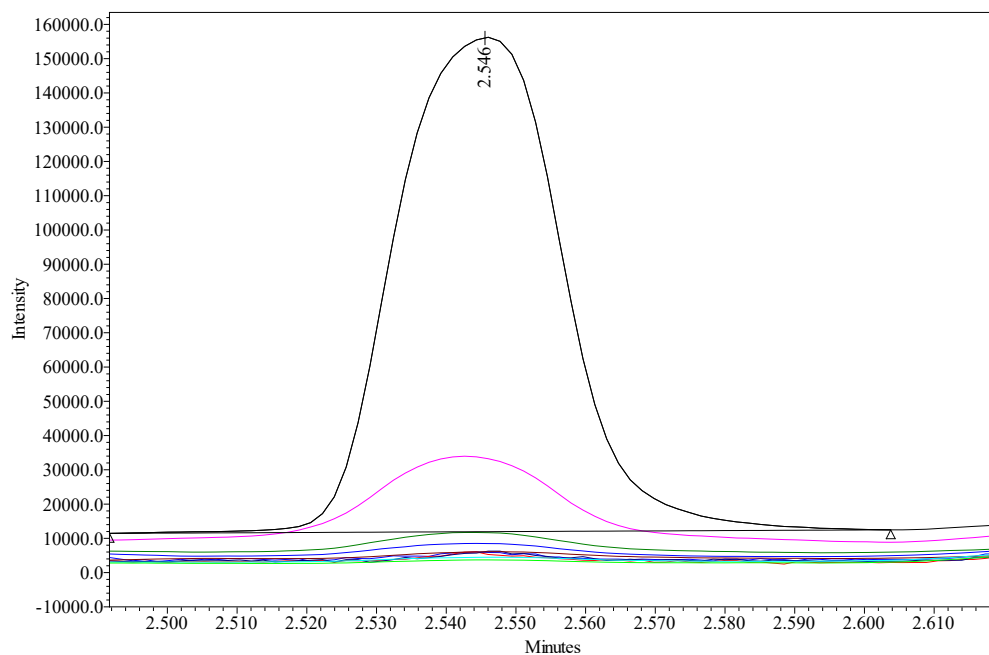
$\gamma = 1$ ppm, pH = 4,00, temperatura kolone 60 °C, trajanje analize 5 min

Osnovni signal u spektru masa fosamprenavira je pri m/z 586,11; NAM FOS pri m/z 502,03; NFOS pri m/z 616,08; a BOC NAMP pri 422,11 što ukazuje da je prilikom ionizacije došlo do fragmentacije analita. U protivnom, bazni signal bi bio pri m/z 522,22. Razlika u masi između ta dva signala iznosi 100,11, što znači da je došlo do izlaska *tert*-butoksikarbonilne grupe koja se koristi kao zaštitna skupina prilikom sinteze.

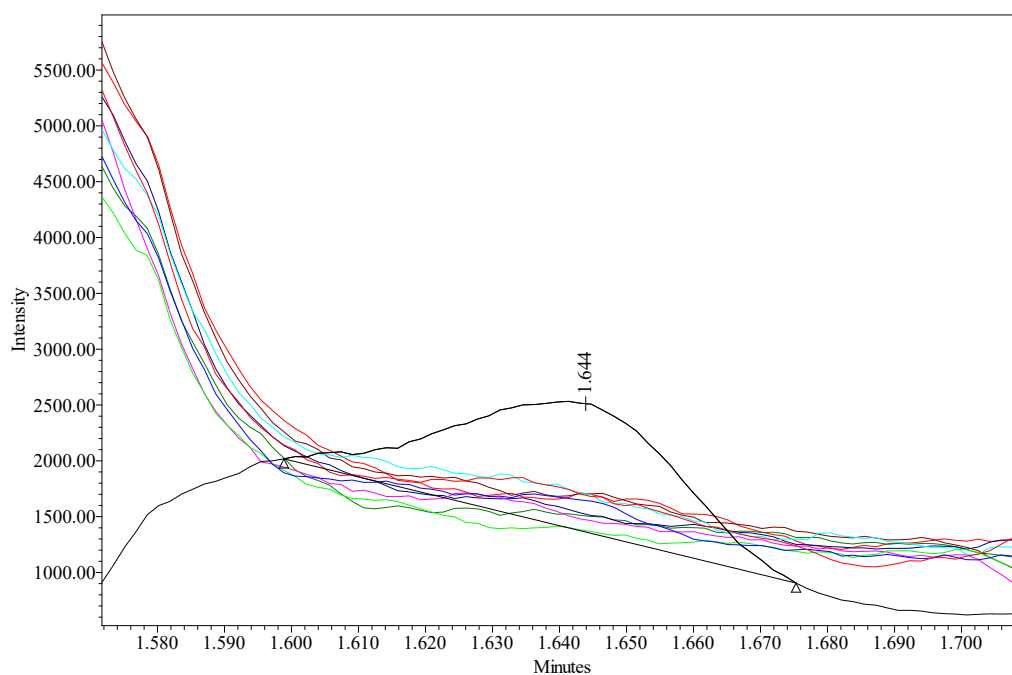


Slika 37. Nastank fragmenta m/z 422 iz molekuskog iona BOC NAMP m/z 522 uslijed izlaska *tert*-butoksikarbonilne grupe.

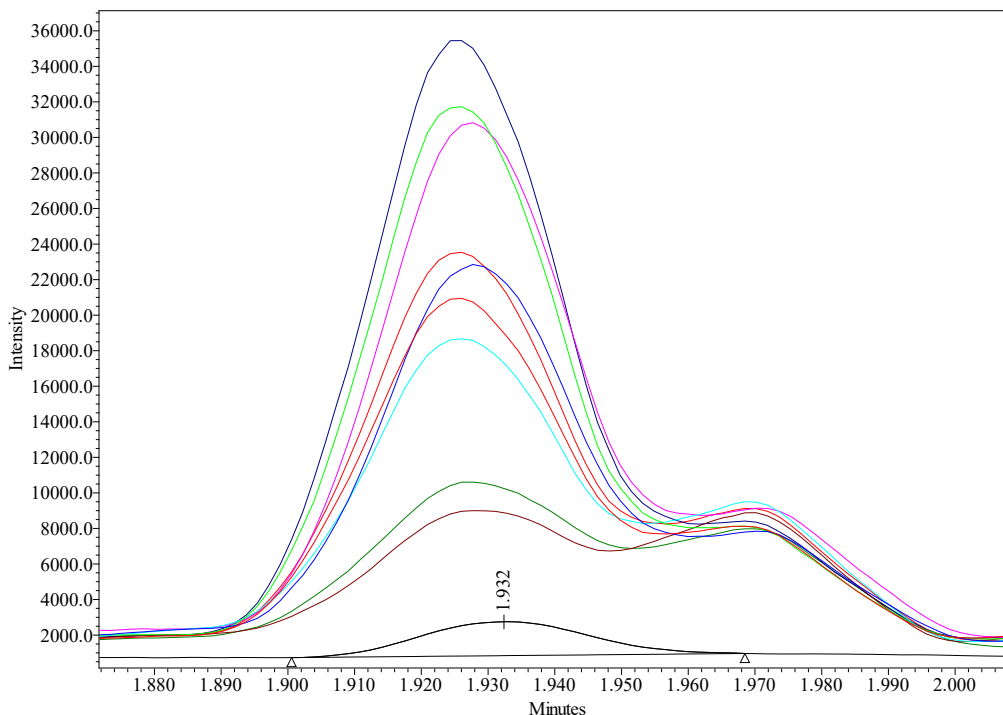
Pri istim eksperimentalnim uvjetima snimljeni su i uzorci različitih šarži fosamprenavira. Za određivanje koncentracije genotoksičnih onečišćenja u šaržama, uspoređeni su rezultati šarže s rezultatima standarda genotoksika, na način usporedba površina signala. Rezultati su bili promatrani pri signalu karakterističnom za svako genotoksično onečišćenje, odnosno pri m/z 502,03 za NAM FOS, pri m/z 616,08 za NFOS i pri m/z 422,11 za BOC NAMP. Koncentracija standarda iznosila je 1 ppm. Granica kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost (engl. quantification limit, *QL*). Za vrijednost granice kvantifikacije uzeta je vrijednost od 0,1 ppm jer je ta vrijednost jednaka desetini koncentracije pripremljenih standarda.



Slika 38. Grafički prikaz usporedbi kromatograma dobivenih HPLC-MS analizom pri m/z 422,11 za standard BOC NAMP i različite šarže fosamprenavira



Slika 39. Grafički prikaz usporedbi kromatograma dobivenih HPLC-MS analizom pri m/z 502,03 za standard NAM FOS i različite šarže fosamprenavira



Slika 40. Grafički prikaz usporedbe kromatograma dobivenih HPLC-MS analizom pri m/z 616,08 za standard NFOS i različite šarže fosamprenavira

Uspoređujući dobivene kromatograme, pri m/z standarda, različitih šarži fosamprenavira i standarda, moguće je odrediti koncentraciju genotoksičnog onečišćenja u svakom uzorku.

Analizom rezultata za BOC NAMP i uzorke fosamprenavira može se zaključiti da se u uzorcima fosamprenavira koncentracija genotoksika BOC NAMP nalazi u količinama manjim od 0,1 ppm, osim za uzorak šarže FSM-Š-1-21h u kojem se nalazi koncentracija BOC NAMP-a jednaka 0,1 ppm.

Analizom rezultata za NAM FOS i uzorke fosamprenavira može se zaključiti da se u uzorcima fosamprenavira koncentracija genotoksika NAM FOS nalazi u količinama manjim od 0,1 ppm.

Analizom rezultata za NFOS i uzorke fosamprenavira može se zaključiti da se u uzorcima fosamprenavira koncentracija genotoksika NFOS nalazi u većim količinama nego u prethodna dva genotoksika. Površina uzorka standarda genotoksika NFOS iznosila je 3378.

Tablica 22. Rezultati analize genotoksika NFOS i uzoraka fosamprenavira različitih šarži za određivanje koncentracije genotoksika u pojedinim šaržama fosamprenavira

| Uzorak | Površina uzorka / % | FSM-Š-Xh/NFOS / ppm |
|-----------|---------------------|---------------------|
| FSM-Š-5h | 15500 | 4,59 |
| FSM-Š-9h | 20400 | 6,04 |
| FSM-Š-12h | 36500 | 10,81 |
| FSM-Š-15h | 45400 | 13,44 |
| FSM-Š-18h | 46300 | 13,71 |
| FSM-Š-21h | 61000 | 18,06 |
| FSM-Š-27h | 41400 | 12,25 |
| FSM-Š-33h | 63000 | 18,65 |
| FSM-Š-39h | 71300 | 21,10 |

§ 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je razviti i optimizirati učinkovitu metodu za analizu lijeka fosamprenavira i njegovih genotoksičnih onečišćenja. Instrument za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti koristio se za razdvajanje i određivanje onečišćenja, a za određivanje koncentracije po načelu praga toksične zabrinutosti koristila se sprega tekućinskog kromatografa ultravisoke djelotvornosti i spektrometra mase.

Pomoću računalnog programa DryLab[®] obrađeni su podaci dobiveni UHPLC analizom kako bi se optimizirali eksperimentalni uvjeti. Za optimizaciju su korišteni početni uvjeti pH-vrijednosti mobilne faze 4,00 i temperatura kolone 45 °C dok se je na vrijeme gradijentnog eluiranja utjecalo pomoću programske opcije uređivanja gradijenta. Dobivena su četiri kromatograma za optimizirane eksperimentalne uvjete. Sva četiri rezultata su valjana te se mogu primijeniti za analizu, a odabrana je najkraća metoda uz sljedeće eksperimentalne uvjete: pH-vrijednost mobilne faze 4,00, temperatura kolone 45 °C i vrijeme gradijentnog eluiranja od 3 minute. Dobivena optimizirana metoda je dodatno prilagođena za rad na UHPLC-MS instrumentu, te su krajnji eksperimentalni uvjeti iznosili: pH vrijednost mobilne faze 4,00, temperatura kolone 60 °C i vrijeme gradijentnog eluiranja od 3 minute.

Za određivanje koncentracija genotoksičnih onečišćenja u različitim šaržama fosamprenavira, prema načelu praga toksične zabrinutosti, korištena je tehnika UHPLC-MS analize uz eksperimentalne uvjete dobivene ubrzanjem optimizirane metode.

Uspoređivanjem dobivenih rezultata zaključeno je da se koncentracija genotoksičnog onečišćenja NAM FOS, u uzorcima različitih šarža fosamprenavira, nalazi u vrijednostima manjim od 0,1 ppm.

Uspoređivanjem dobivenih rezultata zaključeno je da se koncentracija genotoksičnog onečišćenja BOC NAMP, u uzorcima različitih šarža fosamprenavira, nalazi u vrijednostima manjim od 0,1 ppm osim za uzorak FSM-Š-9h u kojem se nalazi u koncentraciji od 0,1 ppm.

Uspoređivanjem dobivenih rezultata zaključeno je da se koncentracija genotoksičnog onečišćenja NFOS, u uzorcima različitih šarža fosamprenavira, nalazi u vrijednostima većim od 1 ppm.

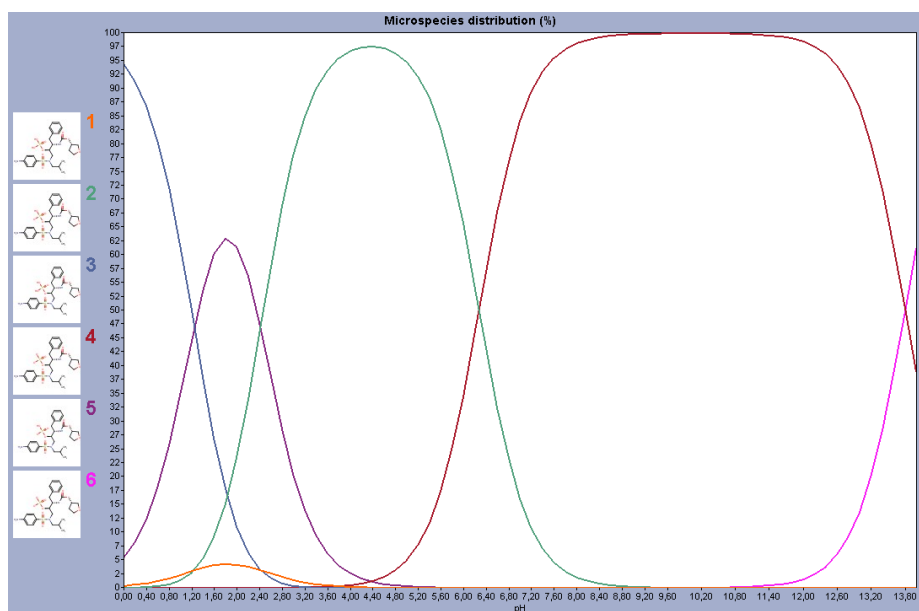
§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/telzir> (datum pristupa 10. svibnja 2022.)
2. T. M. Chapman, G. L. Plosker, C. M. Perry, *Drugs* **64** (2004) 2102–2115.
3. Y. Kazakevich, R. LoBrutto, John Wiley & Sons, New Jersey, 2006, str 10–30.
4. A. Horvatić, M. Cindrić, *Medicina* **45** (2008) 258–263.
5. <https://molnar-institute.com/drylab/> (datum pristupa 06. lipnja 2022.)
6. H. Ouyang, *Biotechnol.: Pharm. Aspects* **5** (2007) 543–547.
7. V. K. Redasani, S. B. Bari, Prodrug Design, Academic Press, 2015, str. 63–67.
8. B. Masquelier, et al. *J. Antimicrob. Chemother.* **61** (2008) 1362–1368
9. C. F. Poole, S. K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier Academic press, New York, 1991, str. 1–507.
10. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2010, str. 1–80.
11. Y. Kazakevich, R. Lohrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, New Jersey 2007, str. 1–57
12. S. Ahuja, M.W. Dong, *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC:*, Elsevier Academic Press; 2005. str. 26–30
13. Nives Galić, *Spektrometrija masa*, Interna skripta, Zagreb, 2004.
14. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, New Jersey, 2007, str.12–57.
15. S. Šarić, *Identifikacija kompleksnih spojeva lantanoida i aromatskih hidrazona spektrometrijom masa*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
16. R. A. Lionberger, S. L. Lee, L. M. Lee, A. Raw, L. X. Yu, *AAPS J.* **10** (2008) 268–275.
17. L. X. Yu, G. Amidon, M. A. Khan, S W. Hoag, J. Polli, G. K. Raju, J. Woodcock, *AAPS J.* **16** (2014) 771–778.
18. J. N. Sangshetti, M. Deshpande, R. Arote, Z. Zaheer, D. B. Shinde, *Arabian J. Chem.* **10** (2014), 3–12.
19. A. S. Rathore, H. Winkle, *Nat. Biotechnol.* **27** (2009) 26–34.

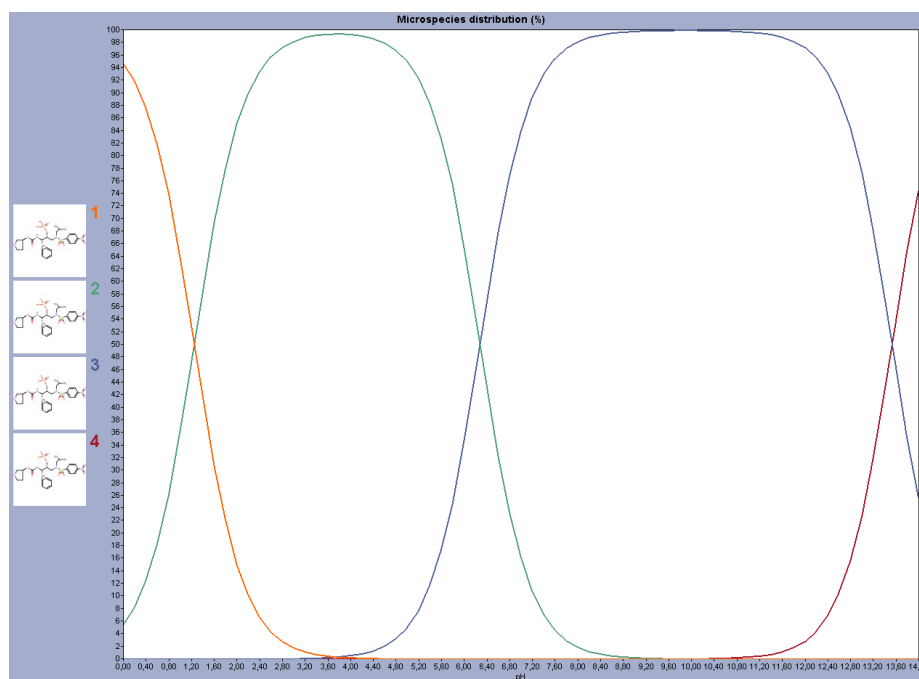
20. F. G. Vogt A. S. Kord, *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 797–810.
21. L. X. Yu, *Phr. Res.* **25** (2008) 781–791.
22. J. W. Dolan, D. C. Lommen, L. R. Snyder, *J. Chromatogr. A* **27** (1989) 91–112.
23. R. Hanafi, S. Mosad, K. Abouzid, R. Nieß, H. Spahn-Langguth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56** (2011) 569–576.
24. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-limits-genotoxic-impurities_en.pdf (datum pristupa 7. svibnja 2022.)

§ 7. DODATAK

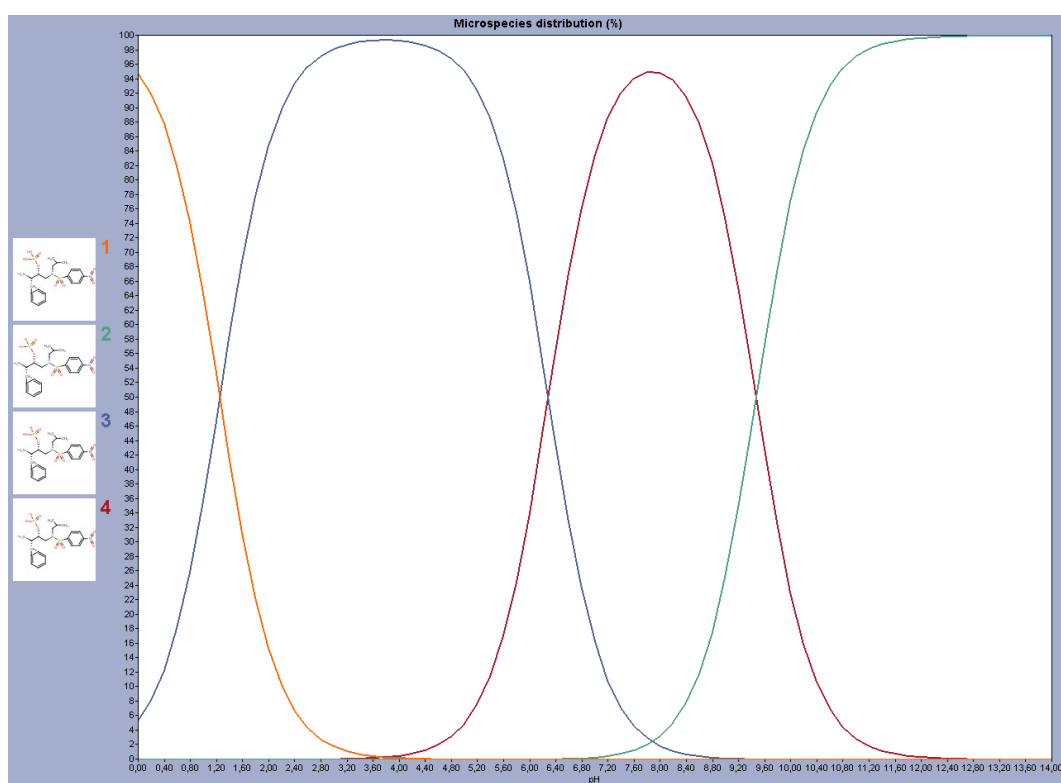
7.1. Distribucija specija ovisno o pH i pKa vrijednostima



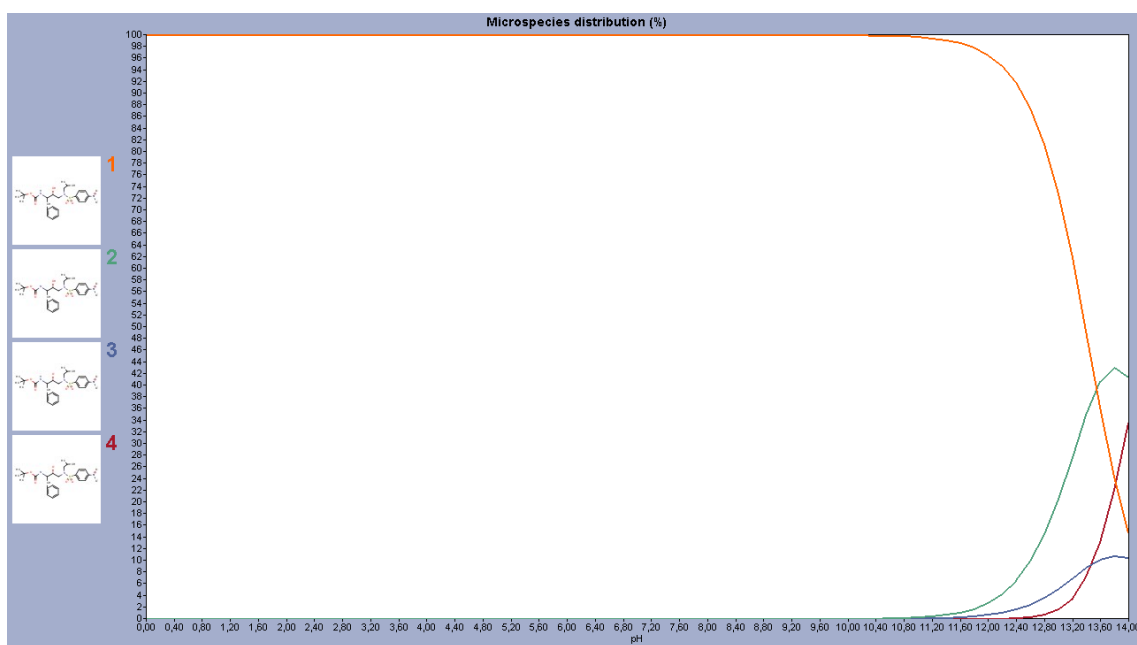
Slika D1. Distribucija specija fosamprenavira u ovisnosti o pH.



Slika D2. Distribucija specija NFOS u ovisnosti o pH.

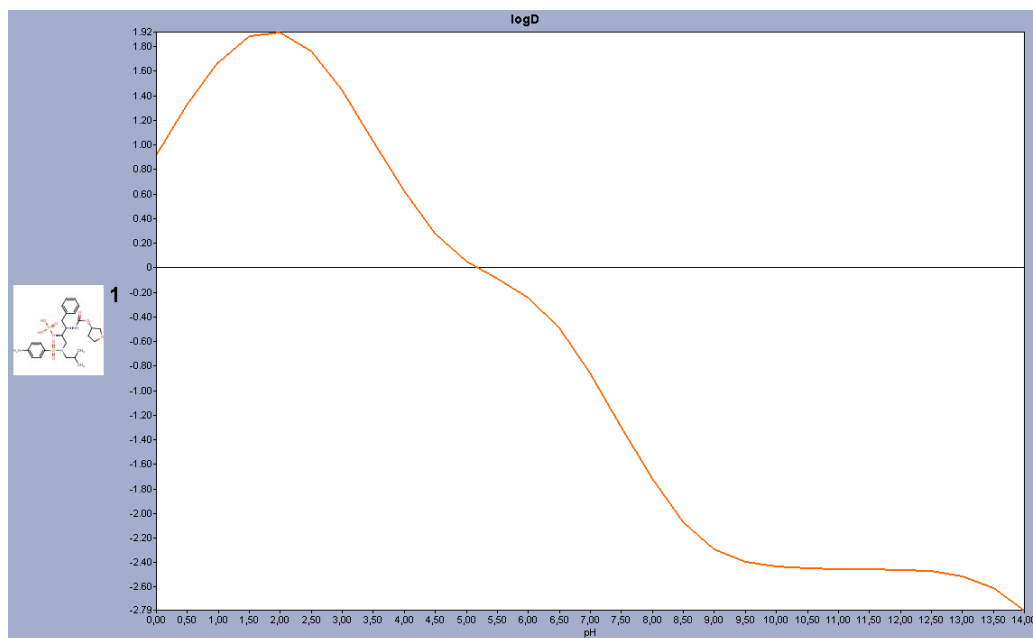


Slika D3. Distribucija specija NAM FOS u ovisnosti o pH.

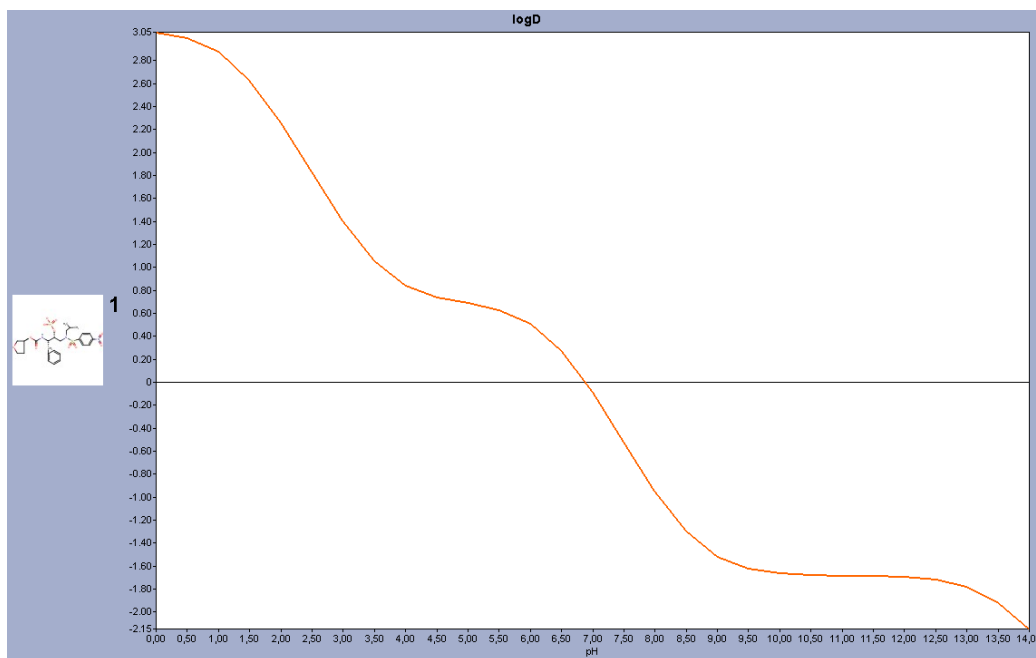


Slika D4. Distribucija specija BOC NAMP u ovisnosti o pH.

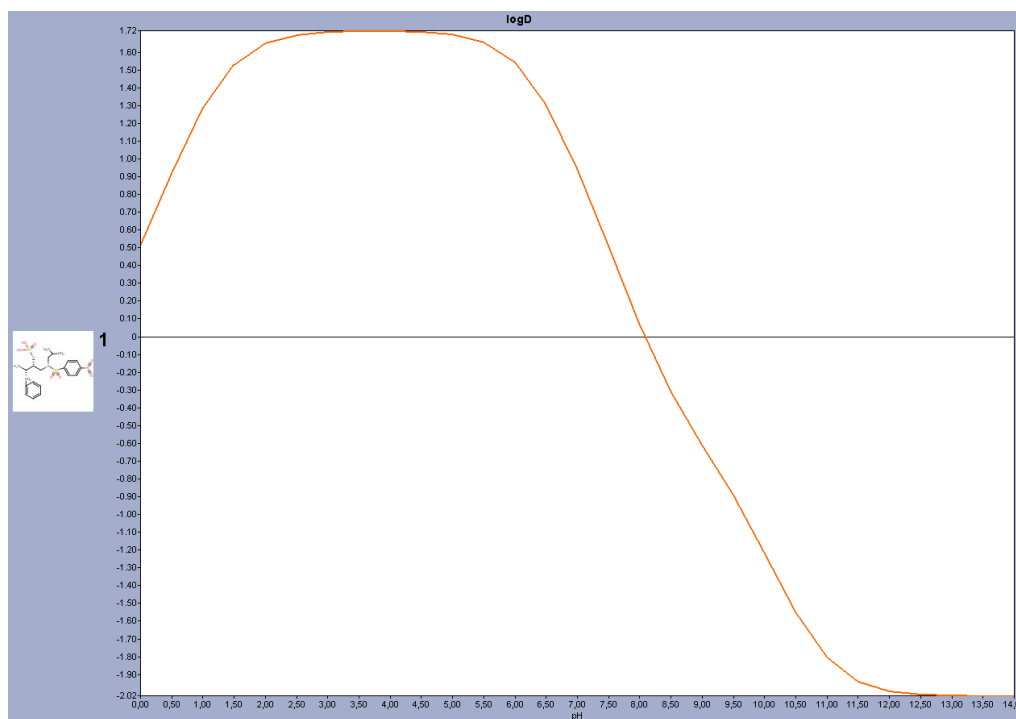
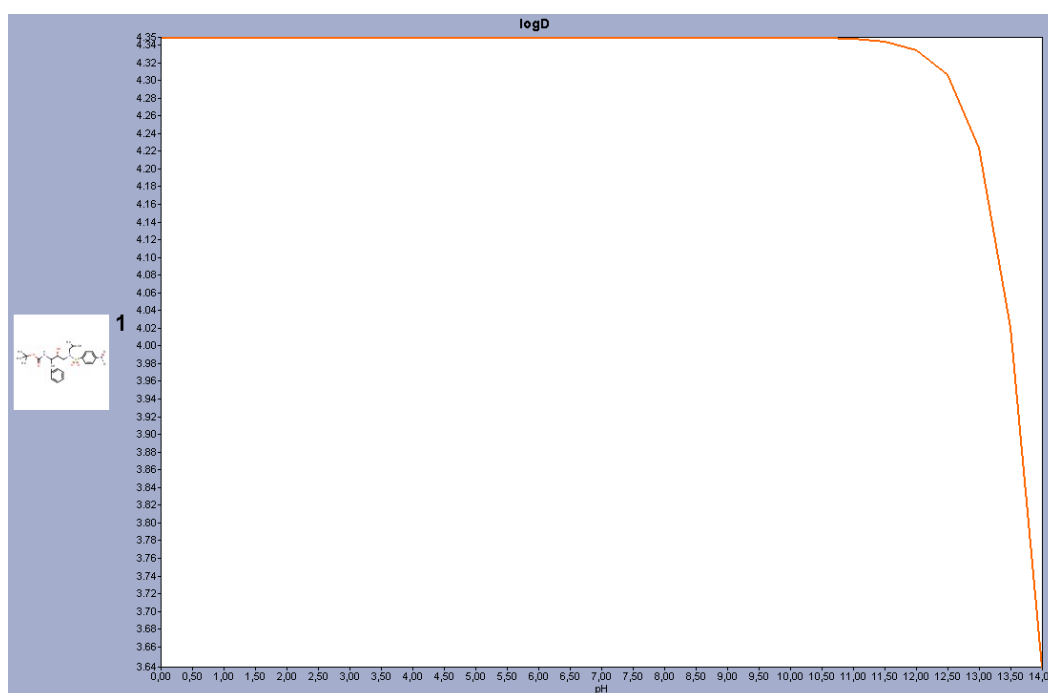
7.2. Ovisnost vrijednosti $\log D$ o pH-vrijednosti



Slika D5. Ovisnosti pH- $\log D$ za fosamprenavir



Slika D6. Ovisnosti pH- $\log D$ za NFOS

Slika D7. Ovisnosti pH- $\log D$ za NAM FOSSlika D8. Ovisnosti pH- $\log D$ za BOC NAMP

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Roberto Biškupić

Datum rođenja: 26.02.1998.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2005.–2013. Osnovna škola Vrbani, Zagreb

2013.–2017. Srednja škola Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb

2017.–2020. Sveučilišni preddiplomski studij kemija, Prirodoslovno-Matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020.-2022. Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanje u popularizaciji znanosti

2017. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska