

# Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za određivanje onečišćenja u ceritinibu

---

**Mašić, Borna**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:217:853147>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-17**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Borna Mašić

**Razvoj metode tekućinske kromatografije  
ultravisoke djelotvornosti za određivanje  
onečišćenja u ceritinibu**

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2018. godina.



Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Analitike istraživanja i razvoja u Pliva Hrvatska d.o.o. , pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim vodstvom Mislava Runje, dipl.chem.ing. u sklopu Sveučilišnog diplomskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



## Zahvale

*Hvala mentorici prof. dr. sc. Nives Galić, na prihvaćanju mojih želja, stručnim savjetima i brzim odgovorima na sva moja pitanja. Hvala Vam na razumijevanju i strpljenju.*

*Hvala neposrednom voditelju dipl. chem. ing. Mislavu Runji, na pruženoj prilici, svakom prijedlogu i uvažavanju mojih želja. Hvala na iznimnoj pomoći i savjetima za pisanje ovog rada.*

*Hvala svima iz Analitike, najviše kolegici Miji koja je bila cijelo vrijeme tu za mene, i pomagala mi u mome eksperimentalnom radu.*

*Hvala mojim roditeljima, Mami i Tati što ste bili uvijek uz mene, vjerovali ste u mene, čak i kad sam nisam. Hvala što ste me naučili cijeniti sitnice i kako uvijek biti prijatelj.*

*Hvala mojoj braći, Daliboru i Porinu što ste me cijelo ovo vrijeme trpjeli, voljeli i pazili. Nije Vam sigurno bilo lako, ali nadam se da je vrijedilo.*

*Hvala Dinku i Igoru što ste uvijek našli vremena da me saslušate, savjetujete i na svoj podršci kroz sve ove godine. Veliko hvala što ste uvijek uz mene.*

*Hvala mojoj prijateljici, mogu reći nesuđenoj sestri, Mariji što si moja istinska motivacija i doživotni prijatelji. Hvala što si uvijek uz mene.*

*Hvala mojoj labradorici Bonnie koja mi je olakšala cijeli period prilagodbe kada mi je dijagnosticiran dijabetes. Veselje, radost i sreća koju mi prenosi neizmjerno mi znači i svaki dan čini lakšim.*

*Hvala svim kolegama u Zagrebu, učinili ste da svaki ispit bude lakši, i da studentski dani uistinu postanu najljepša uspomena. Posebno hvala Lori, Ivani, Katarini, Ani i Martini.*

*Hvala svim mojim prijateljima, na podršci, slušanju i razumijevanju.*



# Sadržaj

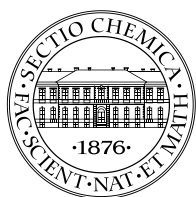
<b>SAŽETAK.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Ceritinib .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Tekućinska kromatografija.....</b>	<b>3</b>
<i>2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....</i>	<i>5</i>
<b>2.3. Spektrometrija masa.....</b>	<b>7</b>
<i>2.3.1. Dijelovi spektrometra masa .....</i>	<i>8</i>
<b>2.4. Validacija .....</b>	<b>11</b>
<i>2.4.1. Linearnost .....</i>	<i>11</i>
<i>2.4.2. Točnost.....</i>	<i>12</i>
<i>2.4.3. Granica kvantifikacije.....</i>	<i>12</i>
<b>2.5. DryLab .....</b>	<b>12</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Opis polaznog materijala.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Oprema i instrumenti .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Kemikalije.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Priprema pokretnih faza i otapala.....</b>	<b>16</b>
<i>3.4.1. Priprema vodenih pokretnih faza.....</i>	<i>16</i>
<i>3.4.2. Priprema otapala/diluenta.....</i>	<i>16</i>
<b>3.5. Priprema pufera .....</b>	<b>17</b>
<b>3.6. Priprema otopina uzoraka za validiranje metode.....</b>	<b>17</b>
<b>3.7. Parametri UHPLC metode.....</b>	<b>18</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Rezultati UHPLC analize .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Linearnost .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Analitički povrat .....</b>	<b>33</b>
<b>4.4. Granica kvantifikacije .....</b>	<b>34</b>
<b>4.5. LC-MS analiza.....</b>	<b>35</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>40</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>41</b>



---

§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	42
§ 8. ŽIVOTOPIS .....	XLV





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### RAZVOJ METODE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI ZA ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U CERITINIBU

Borna Mašić

U okviru diplomskog rada razvijena je metoda za kvantitativno određivanje onečišćenja ceritiniba primjenom kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz korištenje programa Drylab za optimizaciju parametara. Konačna metoda prilagođena je vezanom sustavu kromatografije visoke djelotvornosti spregnutom sa spektrometrijom masa kako bi se potvrdila masa onečišćenja. Pri razvoju metode proveden je niz eksperimenata na dvije različite kolone, C18 i BEH Phenyl, pri temperaturama od 30 °C i 60 °C, tri pH-vrijednosti 2,0; 4,0; 6,0 te dva različita gradijenta u trajanju 13 i 25 minute. Adsorpcija je praćena pri valnim duljinama od 220 nm, 240 nm i 270 nm. Uz navedene parametre također su korištene različite kombinacije vodenih i organskih faza. Rezultati eksperimenata su analizirani uz pomoć DryLab programa i prilagođeni uvjetima realnog sustava kako bi se dobili konačni uvjeti metode. Odabrana kolona je BEH Phenyl, temperatura 55 °C, gradijent u trajanju 17 minuta, valna duljina 210 nm, pufer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH vrijednosti 4,3. Kao organska faza odabran je acetonitril.

(44 stranice, 26 slika, 17 tablica, 33 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: ceritinib, DryLab, onečišćenja, razvoj metode, UHPLC-MS

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić  
Neposredni voditelj: Mislav Runje, dipl. chem. ing.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
  2. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Morana Dulić
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 28., rujna 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION OF IMPURITIES IN THE CERITINIB

Borna Mašić

In this diploma thesis, a quantitative method for determination of ceritinib impurities by ultra performance liquid chromatography using Drylab program for parameter optimization was developed. The method was adapted for use in high-performance chromatography systems coupled with mass spectrometry to confirm the mass of the aforementioned impurities. The process of parameter optimization was performed via series of experiments in which two types of columns were used, C18 and BEH Phenyl, at temperatures of 30 °C and 60 °C, three pH values 2.0; 4.0; 6.0; at two different gradients in duration of 13 and 25 minutes. Chromatograms were recorded at wavelengths of 220 nm, 240 nm and 270 nm. Different combinations of organic and water phases were also used. The results of the experiments were analyzed with DryLab software and the final conditions of the method were established: BEH Phenyl column, system temperature of 55 °C, 17 minute gradient, a wavelength of 210 nm, buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH value 4.3. Acetonitrile was used as the organic phase.

(44 pages, 26 figures, 17 tables, 33 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: ceritinib, DryLab, impurities, method development, UHPLC-MS

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor  
Assistant mentor: Mislav Runje, dipl. chem. ing.

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Associate Professor
  3. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 28<sup>th</sup> of September 2018.

**Borna Mašić**

*Diplomski rad*



## § 1. UVOD

Za terapiju specifičnog oblika karcinoma pluća koristi se farmaceutik poznat pod nazivom Zykadia, koji sadrži aktivnu tvar ceritinib. Ceritinib se primjenjuje za prvu liniju liječenja odraslih bolesnika s uznapredovalim rakom pluća nemalih stanica koje su pozitivne na kinazu anaplastičnog limfoma.

U lijeku se osim djelatne tvari mogu nalaziti razgradni produkti i razna onečišćenja. Zakonskim regulativama zahtjeva se od farmaceutske industrije detaljno poznavanje onečišćenja prisutnih u djelatnoj tvari te u gotovom lijeku. Onečišćenja i razgradne tvari su neželjene komponente koje nastaju zajedno uz djelatnu tvar u procesu proizvodnje lijeka ili njegovom razgradnjom. Njihova prisutnost utječe na primjenu i učinkovitost lijeka, koja može biti smanjena, dok sama onečišćenja mogu biti mutagena, kancerogena i genotoksična. To je razlog zbog kojega je jako važno identificirati i odrediti prisutnost onečišćenja, odrediti njihovu kemijsku strukturu, te ih kvantificirati. Razvojem moderne analitičke instrumentacije razvile su se selektivne i osjetljive metode koje specifično odgovaraju na zahtjeve farmaceutske regulative.<sup>1</sup>

U ovom radu razvijena je metoda za kvantitativno određivanje onečišćenja ceritiniba primjenom kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz korištenje programa Drylab za optimizaciju parametara. Metoda se potom prilagodila vezanom sustavu kromatografije visoke djelotvornosti spregnutom sa spektrometrijom masa kako bi se potvrdile molekulske relativne mase onečišćenja.

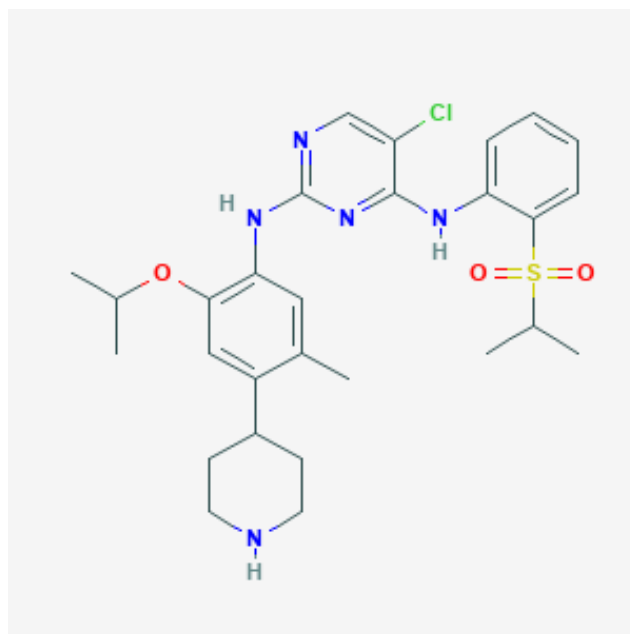
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ceritinib

Ceritinib je visoko selektivan i potentan inhibitor kinaze anaplastičnog limfoma (engl. *anaplastic lymphoma kinase*, ALK). ALK je onkogen koji se aktivacijom eksprimira u protein s aktivnošću tirozin-kinaze. Ceritinib ima molekulska formulu  $C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$ , a prema pravilima Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) ima naziv 5-klor-N2-[5-metil-4-(piperidin-4-il)-2-(propan-2-iloksi)fenil]-N4-[2-(propan-2-sulfonil)fenil]pirimidin-2,4-diamin. Pripada organoheterocikličkim spojevima, točnije piperidinima. Molarna masa ceritiniba je  $558,138 \text{ g mol}^{-1}$ , a njegova topljivost u vodi iznosi  $0,00222 \text{ mg mL}^{-1}$ . Komercijalni naziv lijeka koji sadrži aktivnu tvar ceritinib je Zykadia.

Ceritinib se koristi za prvu liniju liječenja odraslih bolesnika s uznapredovalim rakom pluća nemalih stanica (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) koje su pozitivne na ALK. Ustanovljeno je da 8 % pacijenata oboljelih od karcinoma NSCLC, koji je najčešćiji tip raka pluća, imaju upravo mutaciju na genu ALK. Prije uvođenja terapije Zykadijom potrebno je provjeriti status ALK-pozitivnog karcinoma NSCLC. Testiranje za ALK-pozitivan karcinom NSCLC potrebno je provoditi u laboratorijima s dokazanim stručnim znanjem o specifičnoj tehnologiji koja se za to koristi.<sup>2,3</sup>





Slika 1. 2-D prikaz strukture ceritiniba<sup>4</sup>

## 2.2. Tekućinska kromatografija

Kromatografija je analitička metoda koja služi za odjeljivanja sastojaka ispitivanog uzorka i to na temelju njihovih različitih vremena zadržavanja na koloni. Sastojci se odjeljuju unutar sustava koji se sastoji od pokretne i nepokretne faze. Da bi došlo do odjeljivanja, različiti sastojci koji se nalaze unutar smjese moraju imati različit afinitet prema nepokretnoj fazi. U tom slučaju će se molekule koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi vezati na nju čvršće, te ujedno eluirati sporije s kromatografske kolone u odnosu na molekule s manjim afinitetom prema nepokretnoj fazi.

Kromatografija se ovisno o obliku kromatografske podloge može podijeliti na dvije vrste: kromatografiju na stupcu i plošnu kromatografiju. Na temelju različitog fizičkog stanja pokretne faze, kromatografija se može podijeliti na tekućinsku kromatografiju (pri čemu je pokretna faza tekućina), plinsku kromatografiju (pokretna faza je plin), te na kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (pokretna faza je tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka).<sup>5</sup>

Još jedan način podjele tekućinske kromatografije vezan je uz polarnost nepokretne faze, pri čemu razlikujemo kromatografiju normalnih i obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza sadrži polarnu nepokretnu fazu i nepolarnu pokretnu fazu, dok je kod kromatografije obrnutih faza pokretna faza polarnija od nepokretne faze.

S obzirom na mehanizam odjeljivanja kromatografija se dijeli na adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, ionsko - izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem. Princip odvajanja kod razdjelne kromatografije temelji se na tome što je nepokretna faza tekućina koja je nanešena na čvrsti inertni nosač, dok je u slučaju adsorpcijske kromatografije nepokretna faza adsorbens, a pokretna tekućina ili plin. Nepokretna čvrsta faza afinitetne kromatografije na površini sadrži različite funkcijske skupine s definiranim prostornim rasporedom, te pri prolasku pokretne faze dolazi do specifičnih interakcija između analita u pokretnoj fazi i liganda u nepokretnoj. Ionsko – izmjenjivačka kromatografija temelji se na različitom afinitetu sastojaka u smjesi prema ionskoj fazi. U slučaju kromatografije isključenjem nepokretna faza je materijal koji posjeduje pore točno definiranih dimenzija, sa slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima.<sup>6,7</sup>

Brojem teoretskih tavana  $N$  izražava se učinkovitost kromatografske kolone. Njime je iskazan broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i stacionarne faze, a računa se prema jednadžbama 1 i 2,

$$N = \frac{V^2}{\sigma^2} = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (1)$$

$$N = 16 \frac{V^2}{\omega_b^2} = 16 \frac{t^2}{\omega_b^2} \quad (2)$$

pri čemu je  $N$ -broj teorijskih tavana,  $t$ -vrijeme zadržavanja analita,  $V$ -volumen zadržavanja analita,  $\sigma$ -standardno odstupanje Gaussove krivulje, odnosno širina kromatografskog pika te  $\omega_b$  širina pika pri osnovici kromatografskog pika. Visinom tavana  $H$ , koja se računa prema jednadžbi 3, također se može izraziti učinkovitost,

$$H = \frac{N}{L} \quad (3)$$

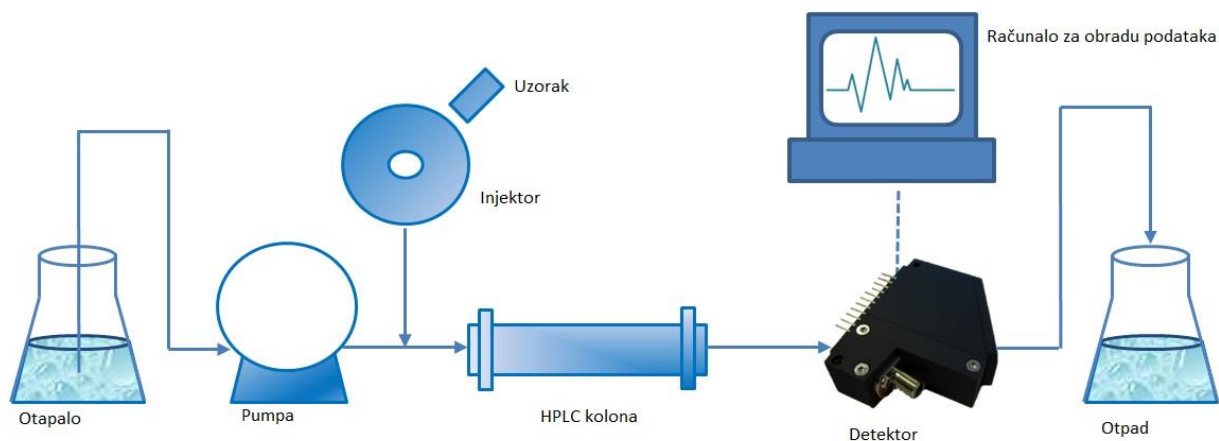
gdje je  $H$  visina tavana,  $N$  broj teorijskih tavana, te  $L$  duljina kolone. Van Deemterova jednadžba (4) prikazuje ovisnost visine teorijskih tavana i linearne brzine pokretne faze,

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_M)u \quad (4)$$

pri čemu je  $u$  linearna brzina pokretne faze, omjer  $B$  i  $u$  longitudinalna difuzija,  $A$  vrtložna difuzija, dok nam član  $(C_M + C_S)u$  govori o prijenosu mase između pokretne  $C_M$  i stacionarne faze  $C_S$ . U samoj jednadžbi član  $A$  opisuje širenje kromatografske zone analita i to zbog difuzije molekula analita unutar pakirane kromatografske podloge. Član  $B$  je posljedica značajke da se molekule analita kroz kolonu kreću vlastitom difuzijom, što bi značilo da se ne prenose samo pasivno pokretnom fazom kroz kolonu. Prema van Deemterovoj jednadžbi djelotvornost kromatografskog razdvajanja je veća što je pokretna faza manje viskozna, čestice čvrste stacionarne faze manje, te stacionarna faza homogenija. Stacionarne faze koje se najčešće koriste bazirane su na derivatima silicijevog dioksida. Njegova površina je jako polarna te je potrebna kemijska derivatizacija hidroksilnih skupina pogodnim reagensima kako bi bila primjenjiva u kromatografiji obrnutih faza.<sup>8</sup>

### 2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Bitna razlika između obične tekućinske kromatografije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je u sitnijim česticama punila zbog kojih dolazi da stvaranja višeg tlaka nego na klasičnoj koloni. HPLC je separacijska analitička tehnika koja se koristi za kvantitativno i kvalitativno određivanje različitih molekula u otopini, ali i za odjeljivanje otopljenih komponenata iz smjese. Princip tehnike temelji se na kemijskim interakcijama između analizirane tvari i stacionarne faze u koloni. Zbog generiranja viših tlakova, ova metoda za razliku od obične tekućinske kromatografije zahtjeva složeniju opremu (slika 2).<sup>9,10</sup>

Slika 2. Dijelovi HPLC kromatografa<sup>11</sup>

Sustav može sadržavati jedan ili više spremnika pokretne faze čija je uloga skladištenje otapala iz kojega crpka kontinuirano povlači određeni volumen određenog otapala. Spremnik i crpka su međusobno povezani cjevčicama, pri čemu crpka sadrži poseban filter koji sprječava eventualni unos raznih čestica i onečišćenja u samu crpku. Radi pri jako visokim tlakovima i ujedno omogućuje konstantan protok pokretne faze u sustav. Razlikujemo dvije vrste crpki: crpka s konstantnim tlakom i crpka s konstantnim protokom. Crpke koje imaju konstantni protok omogućavaju miješanje ukoliko se koristi kombinacija nekoliko otapala. Postoje dvije vrste protoka, izokratan (sastav pokretne faze stalan) ili gradijentan (ukoliko se tijekom analiziranja mijenja sastav pokretne faze).

Automatski uzorkivač koristi se kako bi se uzorak automatizirano unio u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu. Točno određeni volumen koji je zadan programom unosi se iz bočice za uzorke. Bitan dio kromatografa je kolona koja je najčešće uska metalna cijev unutar koje se nalazi nepokretna faza. Njezine dimenzije, duljina i unutarnji promjeri mogu biti različiti. Duljina kolone može biti od 50 mm do 300 mm, a promjer od 2 mm do 4,6 mm.<sup>13</sup> Unutar kolone nalaze se materijali koji se sastoje od mnoštva sitnih čestica, pri čemu se povećava površina nepokretne faze. Tvar ili smjesa tvari koja se analizira prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom. Vrlo mali volumen uzorka unosi se u mobilnu fazu pri čemu se komponente smjese različito zadržavaju na koloni i to zbog specifičnih kemijskih interakcija, sastava nepokretne i pokretne faze, te prirode analizirane tvari.

Neki od najčešće korištenih detektora su UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski detektor i spektrometar masa. Razlikuju se u radu jedan od drugog, svaki je

specifičan, a zajedničko im je da svi daju signal koji je proporcionalan nekom određenom svojstvu analita. Sustavom HPLC se upravlja s računala, pri čemu se određeni parametri mogu kontrolirati i mijenjati, dok se prikupljeni podaci mogu dodatno obrađivati.<sup>12,13</sup>

Kako bi došlo do povoljnog odjeljivanja važan je dobar izbor pogodnih otapala od kojih će se sastojati pokretna faza.<sup>14</sup> Pri kromatografiji normalnih faza najčešće su pogodnija polarna otapala. Točnije, u slučaju kromatografije normalnih faza povećanjem polarnosti povećava se jakost otapala, dok se u slučaju kromatografije obrnutih faza povećanjem polarnosti smanjuje.<sup>6,7</sup>

Kao pokretna faza u većini slučajeva se koristi vodena otopina i to najčešće u kombinaciji s metanolom ili acetonitrilom, organskim otapalom. pH-vrijednost je također jedan od bitnih parametara, koja se podešava dodatkom kiseline ili baze u vodenu pokretnu fazu. U svrhu postizanja dobrog razlučivanja kromatografskih vrpca, potrebno je da pH-vrijednost pokretne faze bude dvije pH jedinice ispod ili iznad vrijednosti  $pK_a$  analita.<sup>15</sup>

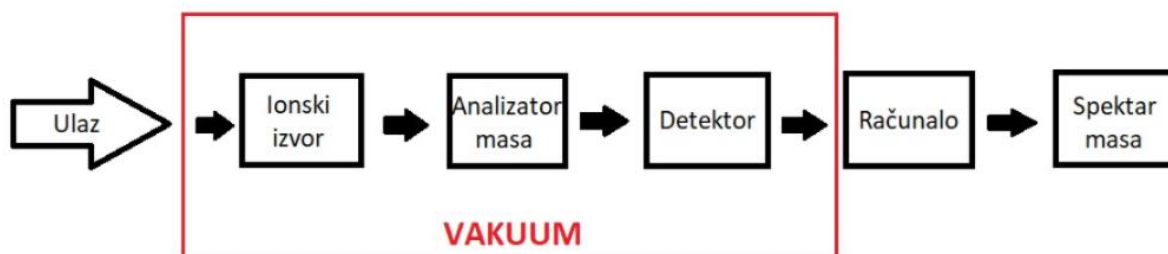
### 2.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (MS) je analitička instrumentna tehnika koja služi za analizu molekula na temelju omjera njihove mase i naboja. Koristi se za kvantifikaciju, identifikaciju i detekciju malih farmaceutskih molekula, te njihovih degradacijskih produkata i metabolita. S obzirom na osjetljivost, tom metodom moguće je analizirati male volumene uzoraka (manje od 10  $\mu$ L).

Analizator se može povezati s tekućinskom kromatografijom, mikročipovima i kapilarnom zonskom elektroforezom. Na taj način dobivaju su tehnike koje su kontinuirano vezane (engl. *on-line*) u kojima se prilikom analize gubi malo uzorka, ali su vremenski manje zahtjevne. Zbog ograničenja pojedinih metoda mogu se koristiti i diskontinuirane metode (engl. *off-line*), a neke od njih su MALDI-MS (engl. *Matrix assisted laser desorption/ionization*, MALDI) i nanosprej-MS. LC-MS/MS je spregnuti vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa koji omogućava analizu iona i to uz bolju fragmentaciju ili odvajanje. Struktura analiziranog iona može se odrediti prema dobivenim spektrima masa.<sup>16</sup>

### 2.3.1. Dijelovi spektrometra masa

Spektrometar masa sastoji se od tri dijela: ionskog izvora, analizatora masa i detektora (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz spektrometra masa

Do ionizacije molekula dolazi u ionskom izvoru. Molekule se mogu različito ionizirati i to ovisno o količini energije koja se primjenjuje u procesu ionizacije te o svojstvima analita. Za ionizaciju molekula u plinovitom stanju koristi se ionizacija elektronima, kemijska ionizacija i ionizacija u polju. Prilikom ionizacije elektronima dolazi do sudara između molekula uzorka i elektrona pri čemu nastaje veliki broj fragmenata, te u spektru masa može izostati signal molekulskog iona. Kemijska ionizacija koristi plin reagens za ionizaciju molekula uzorka za razliku od ionizacije elektronima. Prvo dolazi do ionizacije plina reagensa ionizacijom elektronima, koji zatim ionizira uzorak reakcijama kojim mogu nastati pozitivno i negativno nabijeni ioni. Signal molekulskog iona jasno je vidljiv u spektru masa koji je nastao pri kemijskoj ionizaciji. Ionizacija poljem koristi snagu električnog polja čime dolazi do izbivanja elektrona iz molekule uzorka. Tom metodom nastaju kationski radikali.<sup>17</sup>

Za ionizaciju uzoraka u čvrstom stanju koriste se tehnike kao što su matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (na engl., MALDI), ali i ionizacija bombardiranjem sekundarnim ionima (engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS). U slučaju metode MALDI koristi se otopina malih organskih molekula (matrice). Nakon što otapalo ispari laserom se osvijetli matrica s uzorkom. Energija lasera se apsorbira matricom, te time dolazi do desorpcije i ionizacije analita. Nakon bombardiranja površine uzorka snopom iona nastaju ioni analita kod ionizacije SIMS. Navedenoj metodi slična je metoda bombardiranjem brzim atomima (engl. *fast atom bombardment*, FAB) u kojoj se uzorci otope u nehlapljivoj matrici, najčešće glicerolu.<sup>17,18</sup>

Ionizacija uzoraka direktno iz otopine je najbitnija kod vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LS-MS). Tehnike poput elektroraspršenja (engl. *Electrospray ionization*, ESI), termoraspršenja (engl. *thermospray*, TSP), kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) i ionizacije fotonima pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric pressure photoionization*, APPI) koriste se pri atmosferskom tlaku. Kako bi nesmetano prošli od izvora do detektora, ioni se uvode u analizator masa koji je smješten u vakuumu. Važno je da su otvori koji služe za prolaz iona dovoljno veliki kako bi se omogućio prolazak što većeg broja iona, ali ne previše zbog održavanja vakuuma u analizatoru masa.

U vezanom sustavu LC-MS jedna od najvažnijih tehnika ionizacije je ionizacija elektroraspršenjem. Razlog toga je što se može primijeniti na polarne, nepolarne, ali i termički nestabilne spojeve. Električno polje primjenjuje se na metalnu kapilaru kroz koju prolazi otopina s analitom. Djelovanjem tog električnog polja odvaja se pozitivni i negativni naboj u otopini. Postoji mogućnost da se kapilara priključi na pozitivan kraj izvora napona, pri čemu pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi gdje se zatim akumuliraju.<sup>17</sup> Nedostatak ove tehnike je što matrica može utjecati na ionizaciju analita. Sastojci matrice ili eluensa mogu utjecati na isparavanje otapala, što izravno može utjecati na prelazak analita u plinovito stanje.<sup>19</sup>

Uzorak je najprije potrebno pročistiti, razrijediti ili poboljšati kromatografsko razlučivanje. Pri tome se može koristiti metoda umjeravanja gdje standardna otopina ne sadrži analit.<sup>20,21,22</sup>

Svrha analizatora masa je razdvajanje iona koji su nastali u vakuumu i to na temelju omjera njihove mase i naboja. Najčešće korišteni, te ujedno najvažniji analizator masa je onaj koji mjeri vrijeme leta (engl. *time off light*, TOF) i kvadrupolni analizator masa, dok se u posljednje vrijeme razvio orbitalni analizator masa s ionskom klopkom. Analizator masa koji mjeri vrijeme leta radi na principu da razdvaja ione iste energije, ali različitih omjera mase i naboja ( $m/z$ ) s obzirom da putuju različitim brzinama. Svi ioni imaju isto početno ubrzanje, te se počinju razdvajati kada u cijevi ne djeluje nikakvo električno polje. Ioni koji imaju veći omjer mase i naboja ( $m/z$ ) putuju sporije u odnosu na one s manjim omjerom  $m/z$ . Mjerenjem vremena u kojem ioni dođu od izvora do detektora računa se masa. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri elektrode. Dvije suprotne koje su pozitivno nabijene, dok su preostale dvije negativno nabijene. Kombinacija izmjeničnog i radiofrekventnog potencijala primjenjuje se na elektrode. Ioni koji imaju određenu vrijednost  $m/z$  i gibaju se stabilnom putanjom u

oscilirajućem električnom polju, odvajaju se od ostalih, te dolaze na detektor. Kod kvadrupolnih analizatora postoji mogućnost spajanja u seriju. Jedan od novijih analizatora masa je orbitalni analizator masa s ionskom klopku. Navedeni analizator koristi elektrostatsku klopku s Fourierovom transformacijom za odijeljivanje i detekciju iona.

Posljednji dio masenog spektrometra je detektor. Nakon što prođu kroz analizator ioni ulaze u njega, te se detektiraju na osnovi mase, brzine ili naboja. Neophodno je pojačati signale koje daje detektor budući sa jako mali broj iona prođe kroz analizator. Najpoznatiji detektori su Faradayev cilindar, optički detektori, fotografska ploča, te multiplikatori elektrona.<sup>23</sup>

ACQUITY QDa je optički detektor koji omogućuje minimalan rizik od neočekivanih koelucija, te sa sigurnošću daje potvrdu komponenti u tragovima. Navedeni detektor poboljšava analitičku vrijednost i produktivnost svake analize, ali i eliminira potrebu za pokretanjem dodatnih testova ili pak dugotrajnim alternativnim tehnikama.<sup>24</sup>



Slika 4. Prikaz korištenog tekućinskog kromatografa ultravisoke djelotvornosti (Acquity UPLC H-Class (Waters, SAD))



## 2.4. Validacija

Validacija je skup postupaka kojima se dokazuje da bilo koja procedura, proces, oprema, materijal, aktivnost ili čak sustav djeluje očekivano pri određenim uvjetima, te pri tome postiže zadovoljavajuću razinu određenih parametara. Validacijom se potvrđuje da analitička metoda rezultira točnim, pouzdanim i konzistentnim podacima.<sup>25,26,27</sup> Time se ujedno potvrđuje da je metoda ponovljiva i da je neovisna o osobama koje ju provode, mjestima na kojima se provodi, upotrebi različitih reagensa ili pak radu na različitim uređajima. Izgradnja određenoga stupnja pouzdanosti u metodu je najveća prednost validacije analitičkih metoda. Postoji niz preporuka kojima se provodi validacija metode, a najčešće korištene smjernice su one koje propisuje Internacionalna organizacija za harmonizaciju (ICH, engl. *International conference on harmonization*) – poglavlje Q2 "Validacija analitičkih procedura" i Organizacija za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and drug administration*) – "Analitičke procedure i validacija metoda lijekova".

Proces validacije ima nekoliko faza. U prvoj fazi se definira svrha/cilj metode, analit koji će se testirati i mjeriti, očekivani raspon koncentracije, okolina (matriks), oprema na kojoj će se raditi i lokacija. Definiranje kriterija validacije, a to su kriteriji prihvatljivosti određivanih parametara i karakteristike djelovanja, kao što su priprema i izvedba eksperimenata obuhvaća drugu fazu. Treća faza obuhvaća razvoj plana za kontrolu kvalitete rutinske analize, dok je posljednja faza izrada validacijskog izvješća i dokumentacije.<sup>26</sup> Parametri validacije metode su: specifičnost, selektivnost (utjecaj matriksa), potaknuta razgradnja, linearnost, područje primjene, točnost, preciznost, granica detekcije i kvantifikacije, robusnost, stabilnost otopina uzorka i standarda.

### 2.4.1. Linearnost

Područje primjene metode definirano je linearnošću, a odnosi se na mogućnost metode da u zadanom području daje rezultate koji su direktno ili prema definiranoj matematičkoj transformaciji proporcionalni koncentraciji analita u samom uzorku. Procjena hoće li kalibracija koja je direktno proporcionalna koncentraciji dati dovoljnu točnost rezultata u cijelom planiranom području primjene metode cilj je samog testiranja ovoga parametra. Priprema otopine za ispitivanje linearnosti dobiva se razrjeđivanjem polazne, koncentrirane otopine.<sup>28,29</sup>

#### 2.4.2. Točnost

Točnost analitičke metode predstavlja podudaranje dobivenog rezultata sa stvarno sadržanom količinom komponente koja se određuje. Na gotovom farmaceutskom proizvodu točnost metode se određuje tako da se u placebo doda poznata količina standard. Pripravi se niz otopina različitih koncentracija pri čemu se treba pokriti cijelo radon područje metode. Za ispitivanje točnosti potrebno je napraviti testiranje na najmanje tri različite koncentracije te pripremiti najmanje po tri uzorka za svaku koncentraciju. Točnost se ispituje na glavnoj aktivnoj komponenti, u ovom radu to je ceritinib, ali i na svim dostupnim poznatim razgradnim produktima.<sup>28,29</sup>

#### 2.4.3. Granica kvantifikacije

Najniža koncentracija analita koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati je granica detekcije. Određuje se na temelju omjera signala kromatografskog pika i šuma bazne linije, čija je prihvaćena vrijednost 3:1. Granica kvantifikacije je pak najmanja koncentracija analita u uzorku koja je određena s prihvatljivom preciznošću i točnošću i to u definiranim uvjetima. Za određivanje granice kvantifikacije koristi se vrijednost omjera signala kromatografskog pika i šuma 10:1. Pri tome se analiziraju standardne otopine analita, odnosno otopine poznatih koncentracija. U većini slučajeva granica kvantifikacije (LOQ, engl. *limit of quantification*) je dvostruko, odnosno trostruko veća od granice detekcije (LOD, engl. *limit of detection*).<sup>25</sup>

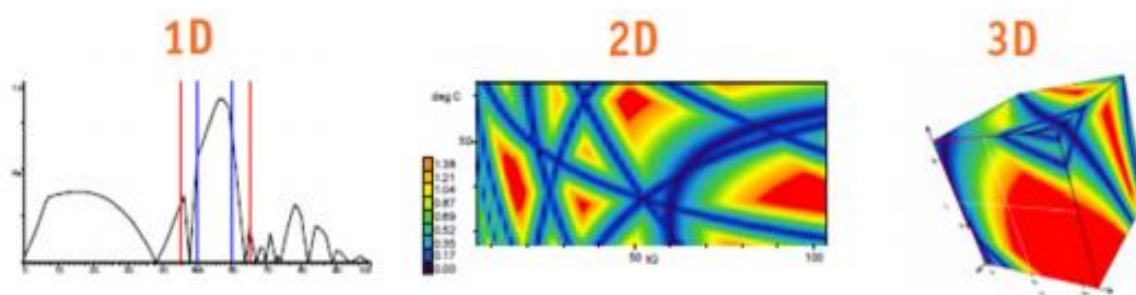
### 2.5. DryLab

Prilikom razvoja UHPLC ili HPLC metode koriste se različite kolone, otapala, te pufera. Obzirom da je potrebno podešavati pH-vrijednost mobilne faze, vrijeme razvijanja efikasne metode može biti dugotrajno. Kako bi se postigao brži razvoj metode, poboljšala efikasnosti, te dobilo više specifičnih podataka o samim metodama, razvijeni su brojni računalni programi.<sup>30</sup> Jedan od njih je DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka)<sup>31</sup> koji se koristi za eksperimentalno modeliranje. Primjenom programa DryLab mogu se predvidjeti kromatografska ponašanja analiziranih sastojaka na jednoj nepokretnoj fazi, tako da se prvo definiraju određeni parametri, kao što su pH-vrijednost i protok pokretne faze, način eluiranja, temperatura i ostali parametri. Navedeni program smanjuje vrijeme koje je potrebno za

optimizaciju metode u rutinskim primjenama te daje informacije o promjenama različitih faktora) prilikom kromatografskih analiza kao što su temperatura, vremenski gradijent, pH-vrijednost itd.

Primjenom programa DryLab mogu se odrediti promjene koje utječu na kvalitetu metode. U program se, na temelju rezultata dobivenih početnim eksperimentima u razvoju UHPLC metode analize, unesu retencijska vremena i površine signala odijeljenih sastojaka uzorka. Na temelju prepoznavanja površine signala pojedinih komponenti, program automatski prepoznaje i prati pikove. Ukoliko je početni volumen uzorka bio konstantan tijekom analize prepoznavanje pikova je dobro. Međutim, pogreške u rezultatima dobivenih programom mogu biti uvjetovane zbog prisutnosti signala koji imaju slične površine, velikog broja sastojaka smjese te promjena u retencijskom vremenu analita.

Najčešći parametri koji se unose u program su temperatura, vrijeme trajanja eksperimenta i pH-vrijednost pokretne faze. Promjenom pojedinih parametara program generira trodimenzijski prikaz ovisnosti jednog parametra o druga dva. S obzirom na broj parametara koji se želi modificirati dobiju se grafički prikazi u funkciji jednog parametra, 1D (kritična vrijednost parametra na y-osi), dva parametra, 2D (kritična vrijednost parametra predstavljena površinom odgovarajuće boje na dvodimenzionalnu grafu), ili tri parametra, 3D, pri čemu se dobije kocka čija površina predstavlja kritičnu vrijednost parametra (slika 5).



Slika 5. Grafički prikaz 1D, 2D i 3D kritičnih rezolucija<sup>33</sup>

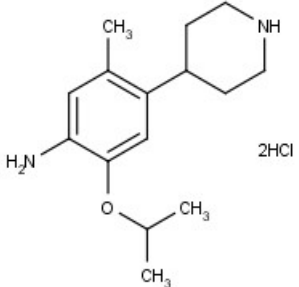
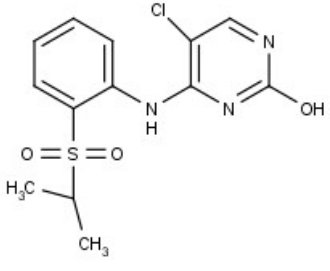
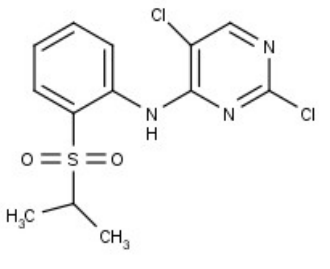
Crvena boja predstavlja područja gdje je došlo do zadovoljavajućeg odvajanja, dok su plavom bojom označena područja gdje postoje neka preklapanja ili gdje se mogu potencionalno pojaviti neki drugi problemi tijekom analize.<sup>32,33</sup>

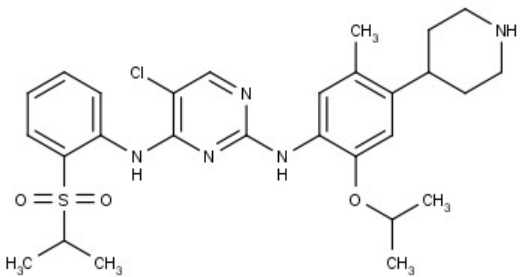
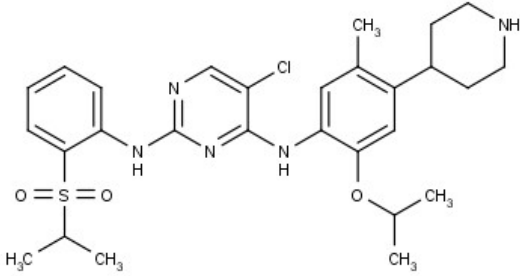
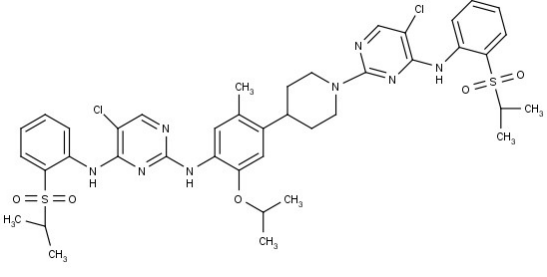
## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Opis polaznog materijala

Strukture ceritiniba i onečišćenja, njih 5, prikazane su u tablici 1. Korišteni polazni materijali sintetizirani su u Plivi i korišteni bez prethodnog pročišćavanja. Spojevi su u tablici prikazani prema porastu relativne molekulske mase.

Tablica 1. Prikaz struktura onečišćenja i početnog uzorka.

Oznaka uzorka	Struktura	Masa	Točna masa	Proizvođač
CRT - 1		248,364	248,1889	TAPI Pliva Hrvatska
CRT imp 1		327,787	327,0444	TAPI Pliva Hrvatska
CRT - 2		346,232	345,0105	TAPI Pliva Hrvatska

CRT		558,135	557,2227	TAPI Pliva Hrvatska
CRT imp 3		558,135	557,2227	TAPI Pliva Hrvatska
CRT imp 2		867,906	866,2566	TAPI Pliva Hrvatska

### 3.2. Oprema i instrumenti

- **Kromatograf:** Acquity UPLC H-Class (Waters, SAD)
  - Kvaterna pumpa
  - Detektor: QDA
  - Automatski uzorkivač s kontrolom temperature
  - Injektorski sustav
- **Kromatografska kolona**
  - BEH C18, 2,1mm × 100 mm, 1,7 μm
  - BEH Phenyl, 2,1mm × 100 mm, 1,7 μm
- **Računalni programi**
  - DryLab Software (Molnar Institut, Berlin)
  - Waters ®Empower™ softver

- **Ostala oprema**
  - Mikrovaga, model XP56 (Mettler-Toledo AG Švicarska)
  - pH metar, model PHM220 (Radiometer Analytical SAS, Francuska)
  - Ultrazvučna kupelj, Sonrex digital 10P (Bandelin, Njemačka)
  - Membranski filtri za pokretnu fazu, RC58, veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$  (Whatman, Njemačka)

### 3.3. Kemikalije

- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , LC čistoće prema europskoj farmakopeji Ph Eur (J.T.Baker, Engleska)
- Acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , LC čistoće prema europskoj farmakopeji (J.T.Baker, Engleska)
- Mravlja kiselina,  $\text{HCOOH}$ , aditiv za LC-MS (Honeywell, Njemačka)
- Amonijak,  $\text{NH}_3$ , vodena otopina,  $\geq 25\%$   $\text{NH}_3$  u  $\text{H}_2\text{O}$  (Honeywell, Njemačka)
- Amonijev formijat,  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$ , za HPLC,  $\geq 99,0\%$  (Honeywell, Njemačka)
- Kalijev dihidrogen fosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Ultrapure (J.T.Baker, Engleska)
- Fosfatna kiselina,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , puriss. p.a.,  $\geq 85\%$  (Honeywell, Njemačka)

### 3.4. Priprema pokretnih faza i otapala

#### 3.4.1. Priprema vodenih pokretnih faza

Za potrebe eksperimenta pripremljene su dvije vodene pokretne faze. Za pripravu prve vodene pokretne faze, razrijeđene otopine  $\text{NH}_3 \geq 25\%$ , pipetirano je 1,0 mL u 1000 mL vode, miješanjem na magnetskoj miješalici. Za pripravu druge vodene pokretne faze, 0,1 %  $\text{HCOOH}$ , pipetiran je 1,0 mL  $\text{HCOOH}$  u 1000 mL vode, miješanjem na magnetskoj miješalici. Objе otopine su filtrirane preko filtera veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$  direktno u staklenu bocu od 1 L.

#### 3.4.2. Priprema otapala/diluenta

Prije pripreme otapala potrebno je odrediti topljivost onečišćenja i same aktivne tvari u istom. Acetonitril se nije pokazao kao dobro otapalo za navedena onečišćenja, te je ispitan sustav  $\text{MeOH}$ :MiliQ voda različitih omjera organskog otapala i vode, kako bi se odredio omjer

pri kojemu je najbolje otapanje svih onečišćenja i aktivne tvari. Nakon toga pripravljena je 1 L otapalo sastava MeOH:H<sub>2</sub>O 9:1.

### 3.5. Priprema pufera

Pripremljena je po 1 L 4 pufera različitih pH-vrijednosti, koncentracije 10 mmol L<sup>-1</sup>. Vrijednosti pH pripremljenih pufera iznosila su redom: 2,0; 4,0; 4,3 i 6,0. Za pripravu pufera prvo je odvagano 1,36218 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, te otopljeno u 1 L MiliQ (engl. *Ultrapurewater*) vode. Pufer se profiltrirao preko filtera veličine pora 0,2 μm, a pH-vrijednost podesila dodatkom razrijeđene otopinom H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ukoliko je vrijednost bila viša, odnosno dodatkom razrijeđene otopinom KOH ukoliko je vrijednost pufera bila niža od željene.

Također je pripremljen pufer volumena 1 L, koncentracije 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH-vrijednosti 2,0 tako da je odvagano 0,62 g HCOONH<sub>4</sub>, te otopljeno u 1L MiliQ vode. Pufer je profiltriran preko filtera veličine pora 0,2 μm, a pH-vrijednost podesila na željenu dodatkom razrijeđene otopine HCOOH, odnosno razrijeđene otopine NH<sub>3</sub>.

### 3.6. Priprema otopina uzoraka za validiranje metode

Za pripravu otopina masene koncentracije  $\gamma = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  izvagano je približno 5 mg uzorka svakog onečišćenja i aktivne tvari na mikrovagi, te prebačeno u tikvicu od 20 mL. U tablici 2. prikazane su mase odvaganih uzoraka. Odvagani uzorci onečišćenja i aktivne tvari prebačeni su u odmjernu tikvicu. Dodana je mala količina pripremljenog otapala u volumnom omjeru MeOH:H<sub>2</sub>O 9:1 kako bi se uzorci otopili, te je tikvica stavljena u ultrazvučnu kupelj 1 minutu. Nakon toga, tikvica je nadopunjena je do oznake otapalom.

Tablica 2. Mase odvaganih uzoraka

Ime uzorka	<i>m</i> /mg
CRT - 1	4,998
CRT imp 1	5,025
CRT - 2	5,085
CRT	5,005
CRT imp 3	4,995
CRT imp 2	5,051

Tako priređena otopina sadržavala je sva onečišćenja i aktivnu tvar masenih koncentracija  $\gamma = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  i kao takva korištena je za pripremu ostalih otopina. Iz navedene otopine prebačen je 1,00 mL otopine u tikvicu od 10,00 mL, u koju je prethodno stavljeno 3,0 mL otapala, te je zatim tikvica nadopunjena do oznake. Masena koncentracija tvari u tako pripremljenoj otopini iznosila je  $\gamma = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ . Otopina u kojoj je masena koncentracija sastojaka iznosila  $\gamma = 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ , pripremljena je prebacivanjem 1 mL ishodne otopine u tikvicu od 25 mL i nadopunjavanjem tikvice otapalom do oznake. Otopina masene koncentracije  $\gamma = 0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$  pripremljena je prebacivanjem 1 mL otopine koncentracije  $\gamma = 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  u tikvicu od 20 mL, nakon čega je tikvica nadopunjena otapalom do oznake. Masena koncentracija otopine  $\gamma = 0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$  odgovara granici kvantifikacije metode.

Za pripremu otopine masene koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  izvagano je na mikrovagi 5,00 mg uzorka aktivne tvari, te prebačeno u tikvicu od 5 mL. Postupak je ponavljen još 3 puta kako bi se pripravile ukupno 4 otopine koje su se međusobno razlikovale po korištenom otapalu. Za pripremu otopine X korišteno je početno otapalo, u slučaju otopine Y kao otapalo koristila se otopina razine 1 %, za Z otopina razine 0,05 %, a u slučaju otopine W kao otapalo se koristila otopina razine 2,5 %. Pripravljene otopine korištene su za određivanje linearnosti u opisanom, odnosno zadanom koncentracijskom području.

### 3.7. Parametri UHPLC metode

Pripravljene uzorci prebačeni su u bočice koje su postavljene u UHPLC instrument. Promjenjivi parametri bili su vrijednosti valne duljine (220 nm, 240 nm, 270 nm), kolone (C18, BHE fenil), te eluensi (A = amonijak, mravlja kiselina, B = acetonitril, metanol), dok su gradijent, protok, otapalo, temperatura te volumen injektiranja bili konstantni. Podatci za jedan od eksperimenata provedenih pri razvoju metode prikazani su u tablici 3.



Tablica 3. Parametri šestog eksperimenta pri razvoju UHPLC metode

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>WATERS Acquity CSH C18; 100·2,1 mm; 1,7 µm</b>		
<b>Pokretna faza A</b>	Otopina NH <sub>3</sub>		
<b>Pokretna faza B</b>	CH <sub>3</sub> CN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme / min</b>	<b>φ (eluens A) / %</b>	<b>φ (eluens B) / %</b>
	0,00	95	5
	10,00	10	90
	12,00	10	90
	12,01	95	5
	14,00	95	5
<b>Otapalo</b>	8 : 2 (MeOH : Mili Q voda)		
<b>Volumen injektiranja</b>	1 µL		
<b>Protok</b>	0,35 mL min <sup>-1</sup>		
<b>Valna duljina / nm</b>	220		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

U metodi koja je kasnije obrađena u programu DryLab linearno je mijenjan udio pokretne faze “B” tijekom vremena, konkretno kretao se u rasponu od 10 % do 98 % kroz 13, odnosno 25 minuta. Kromatogrami su snimani pri temperaturama od 30 °C i 60 °C. Valna duljina detekcije bila je 210 nm, kolona BEH Phenyl, pokretna faza B bila je acetonitril, dok je pokretna faza A bila puffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Korištene su tri različite pH-vrijednosti pufera: 2,0; 4,0; te 6,0. Korišteni parametri prikazani su u tablici 4. Dobiveni kromatogrami su integrirani, a dobivene vrijednosti unešene u program DryLab kako bi se računski odredila konačna metoda.

Tablica 4. Parametri korišteni za UHPLC eksperimente

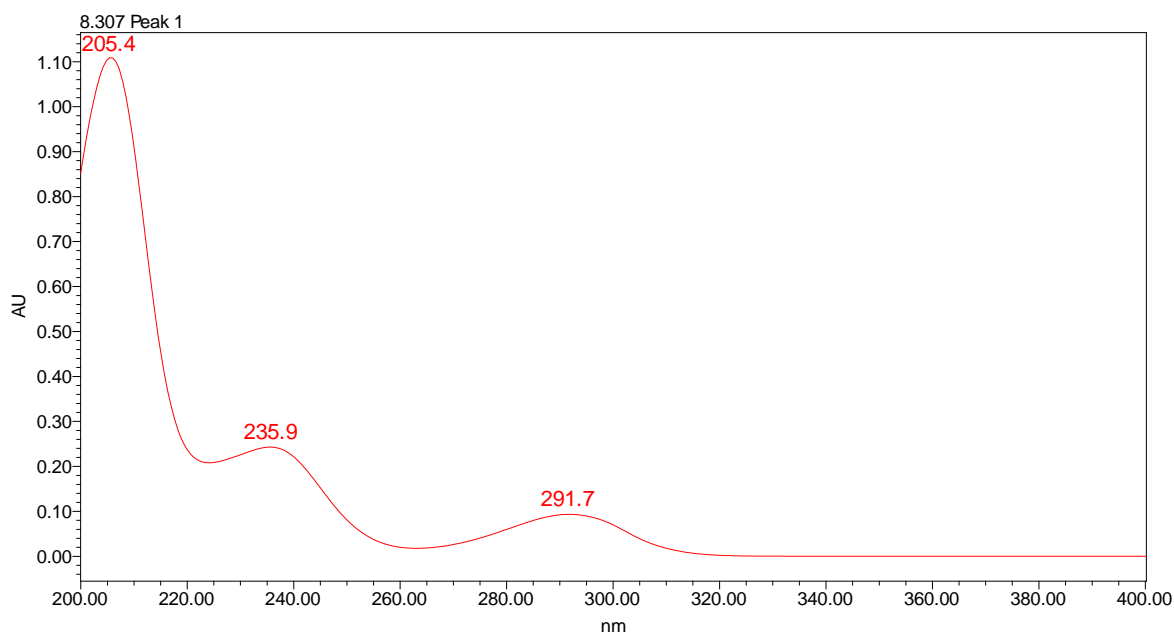
<b>Kolona</b>	<b>BEH Phenyl</b>		
<b>Pokretna faza A</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		
<b>Pokretna faza B</b>	CH <sub>3</sub> CN		
<b>φ (eluens B) / %</b>	5 - 90		
<b>Valna duljina /nm</b>	210		
<b>Trajanje gradijenta / min</b>	13	25	
<b>Temperature /°C</b>	30	60	
<b>pH-vrijednosti</b>	2,0	4,0	6,0

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

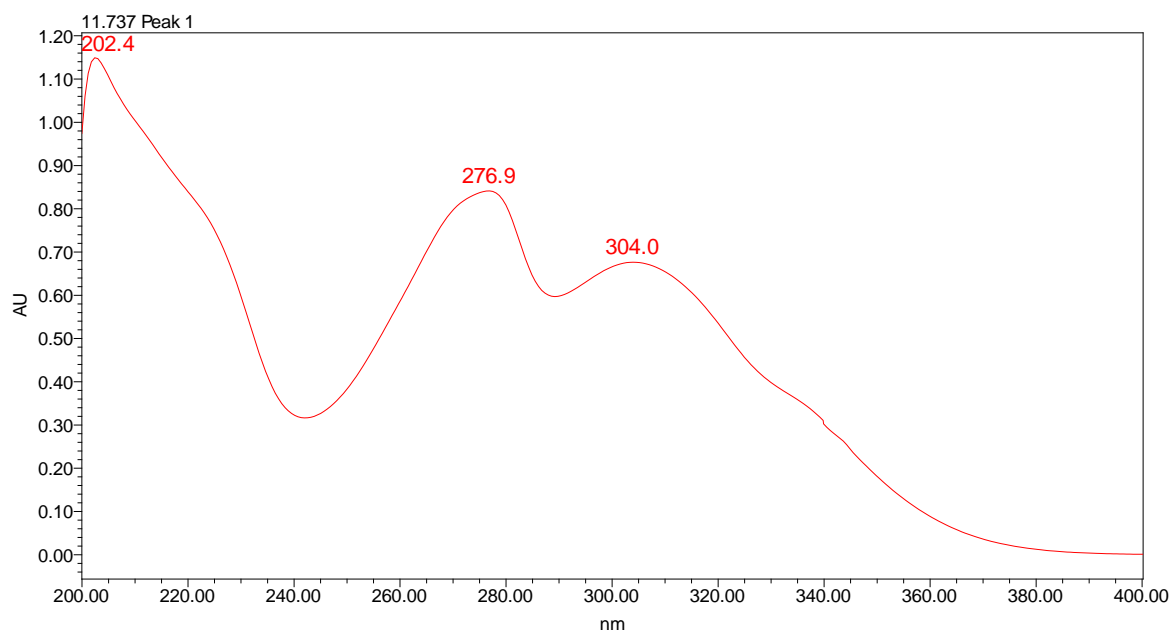
### 4.1. Rezultati UHPLC analize

Na temelju kromatograma dobivenih eksperimentima za koje su promjenjivi i konstatni parametri navedeni u odlomku 3.7 i prikazani u tablici 4., odabrani su uvjeti za daljnji razvoj metode za određivanje onečišćenja u aktivnoj tvari ceritinib.

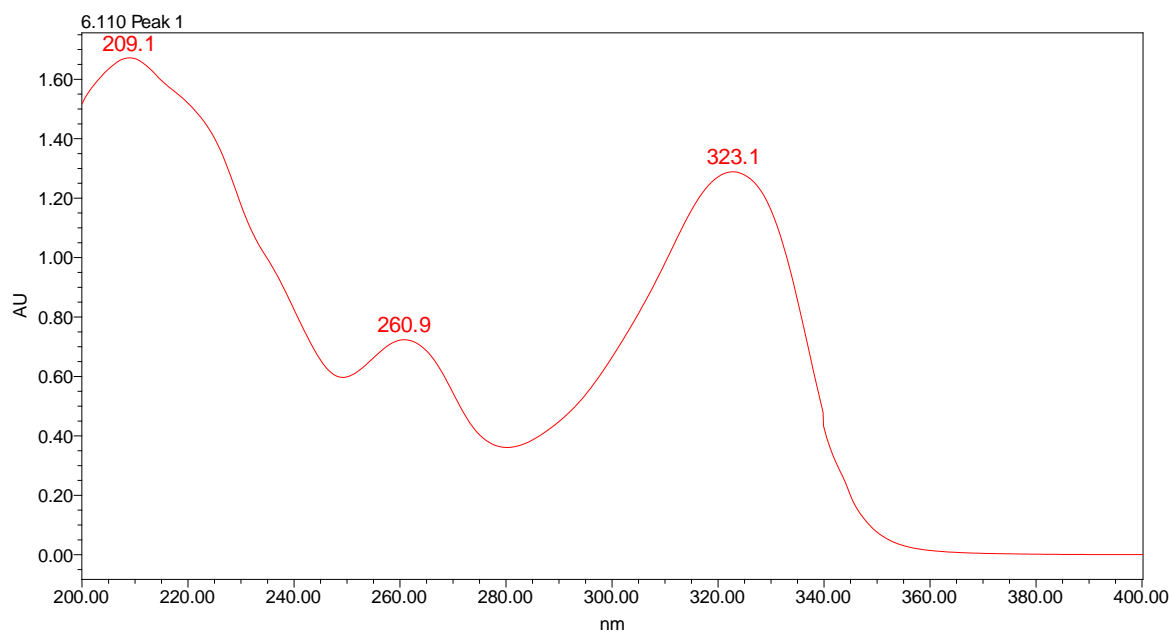
Apsorpcijski spektri svih onečišćenja i aktivne tvari snimljeni su u području valnih duljina od 200 nm do 400 nm (Slike 6-11) te je na temelju njih odabrana optimalna valna duljinu za praćenje kromatografskog procesa. Valna duljina pri kojoj su svi spojevi imali što veću apsorpciju bila je 210 nm.



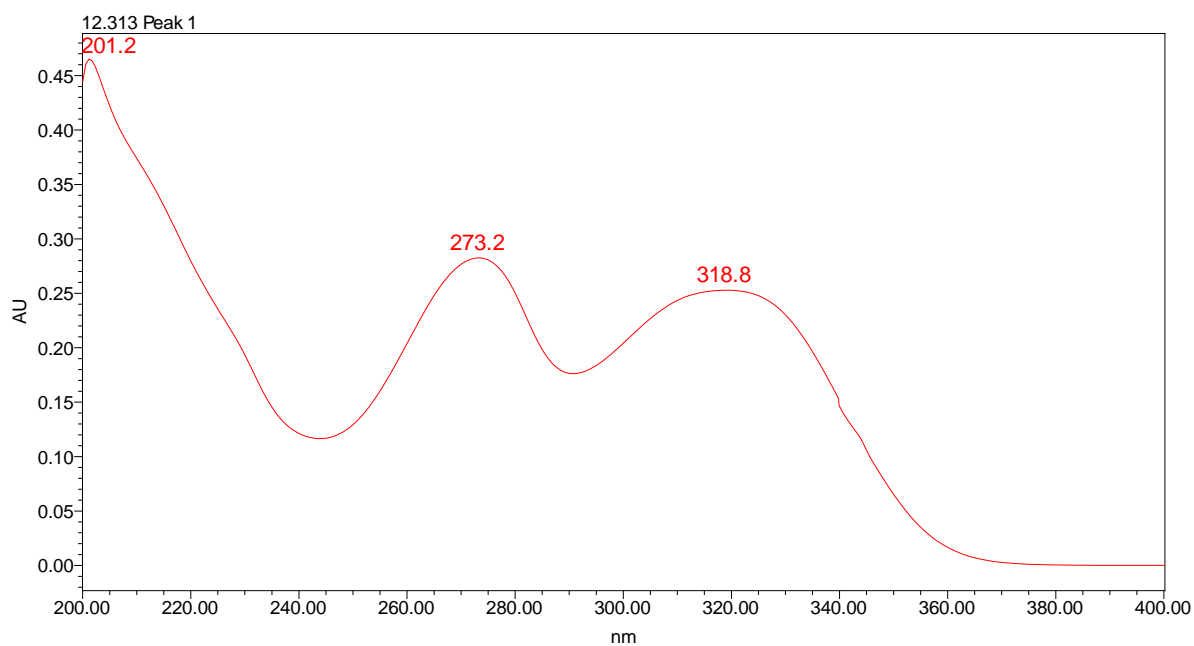
Slika 6. Apsorpcijski spektar onečišćenja CRT – 1



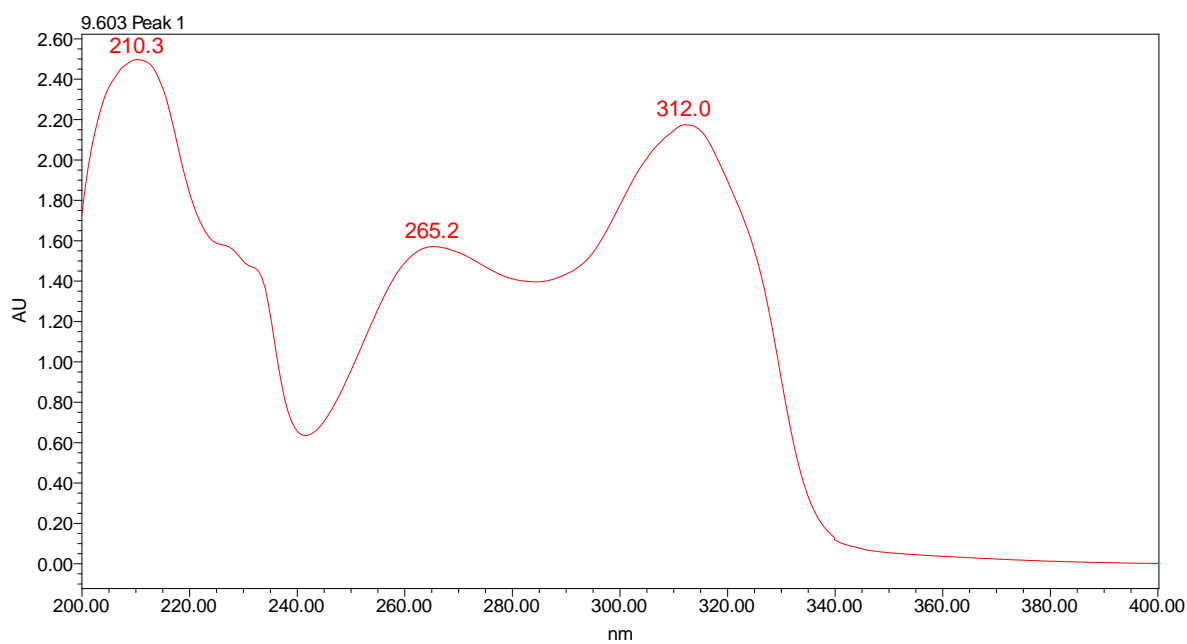
Slika 7. Apsorpcijski spektar aktivne tvari CRT



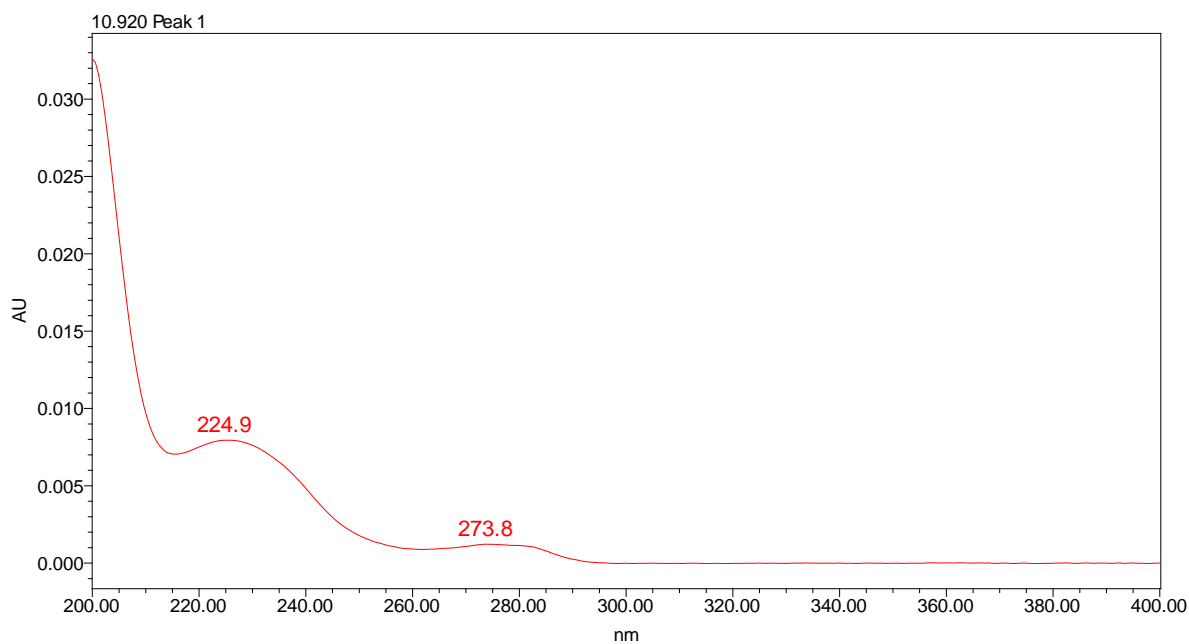
Slika 8. Apsorpcijski spektar onečišćenja CRT imp 1



Slika 9. ApSORPCIJSKI SPEKTAR ONEČIŠĆENJA CRT imp 3

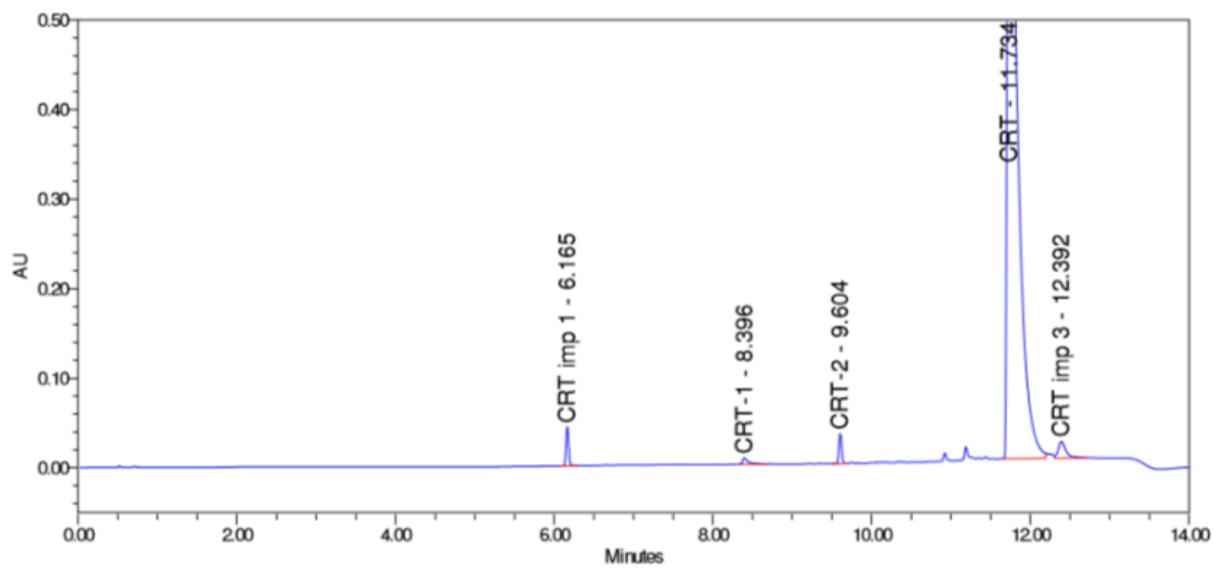


Slika 10. ApSORPCIJSKI SPEKTAR ONEČIŠĆENJA CRT – 2

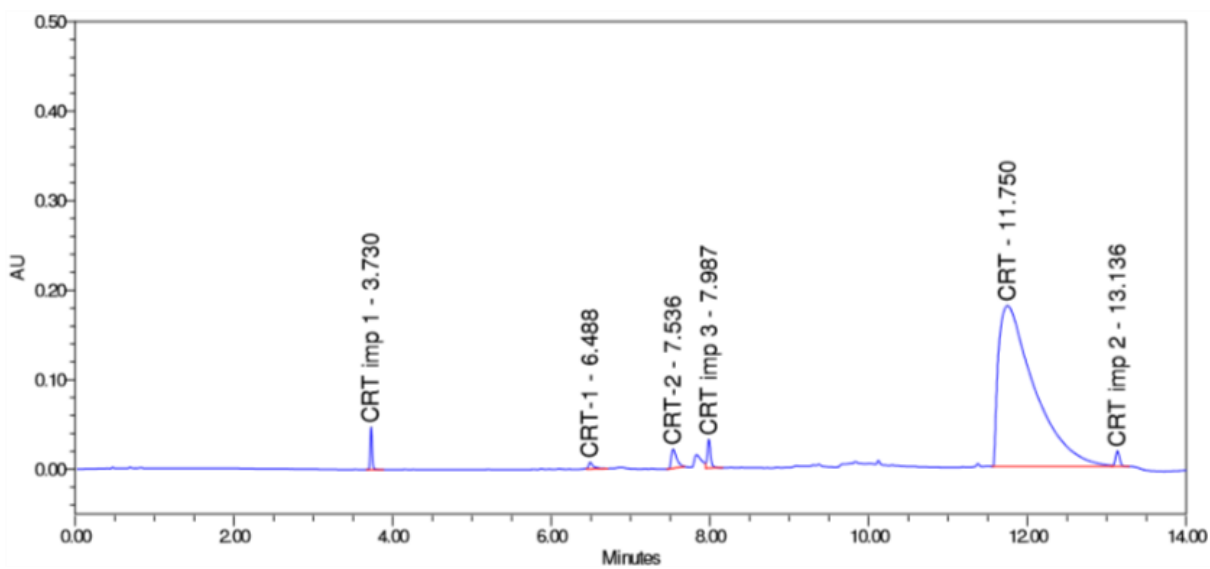


Slika 11. Apsorpcijski spektar onečišćenja CRT imp 2

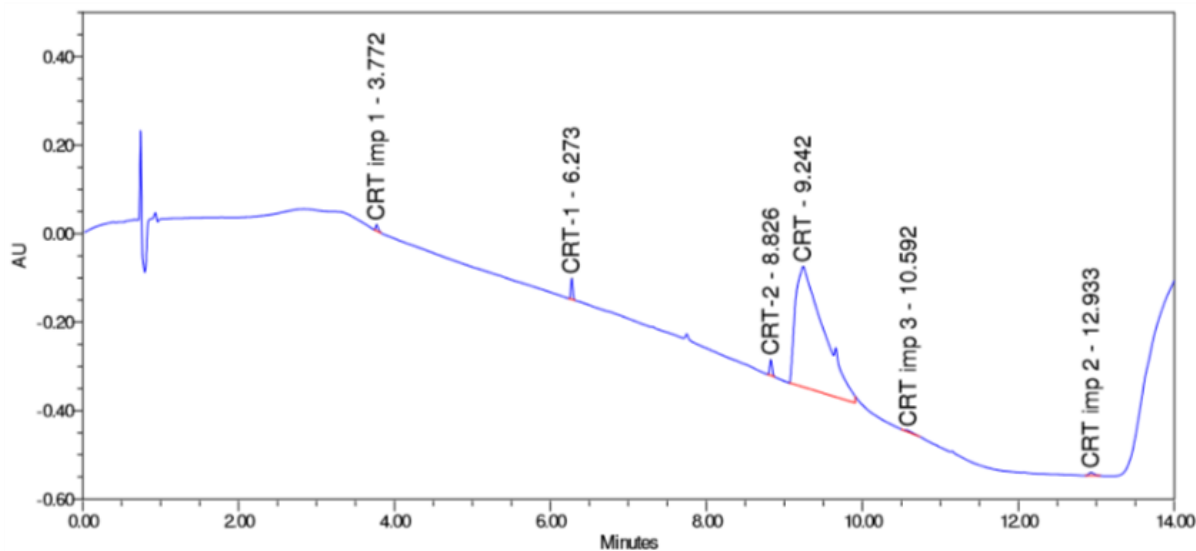
Kombinacija vodene i organske faze,  $\text{NH}_3$  i  $\text{MeOH}$  nije se pokazala kao dobra jer glavni pik, pik aktivne tvari CRT, izlazi tek na kraju kromatograma, prikazano na Slici 12. Isti problem, ali i razvučenost ostalih pikova uočeno je u kromatogramu kada je kao pokretna faza korištena smjesa  $\text{NH}_3$  i  $\text{CH}_3\text{CN}$  (Slika 13.). U daljnim eksperimentima za razvoj metode kao organska faza korišten je acetonitril i niže pH-vrijednosti.



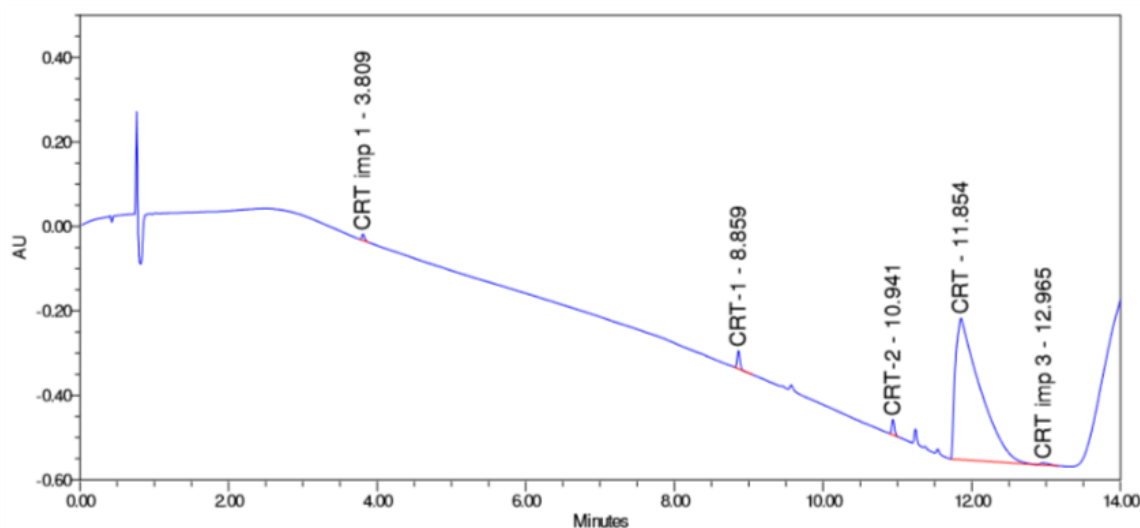
Slika 12. Kromatogram sastojaka smjese odjeljenih na koloni C<sub>18</sub> uz pokretnu fazu: NH<sub>3</sub> i MeOH



Slika 13. Kromatogram sastojaka smjese odjeljenih na koloni C<sub>18</sub> uz pokretnu fazu: NH<sub>3</sub> i CH<sub>3</sub>CN



Slika 14. Kromatogram sastojaka smjese odjeljenih na BEH Phenyl koloni uz pokretnu fazu: HCOOH i CH<sub>3</sub>CN



Slika 15. Kromatogram sastojaka smjese odjeljenih na BEH Phenyl koloni uz pokretnu fazu: HCOOH i MeOH

U nastavku rada varirana je pH-vrijednost pufera KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0; 4,0 i 6,0), dok je kao pokretna faza korišten CH<sub>3</sub>CN i MeOH. Eksperimenti su provedeni na C18 i BEH Phenyl koloni. Korištenjem pufera kao vodene faze, za razliku od HCOOH ili NH<sub>3</sub>, dobiveni pikovi su uži i viši. Zbog utjecaja ionske jakosti pufera postignuta je znatno bolja rezolucija.

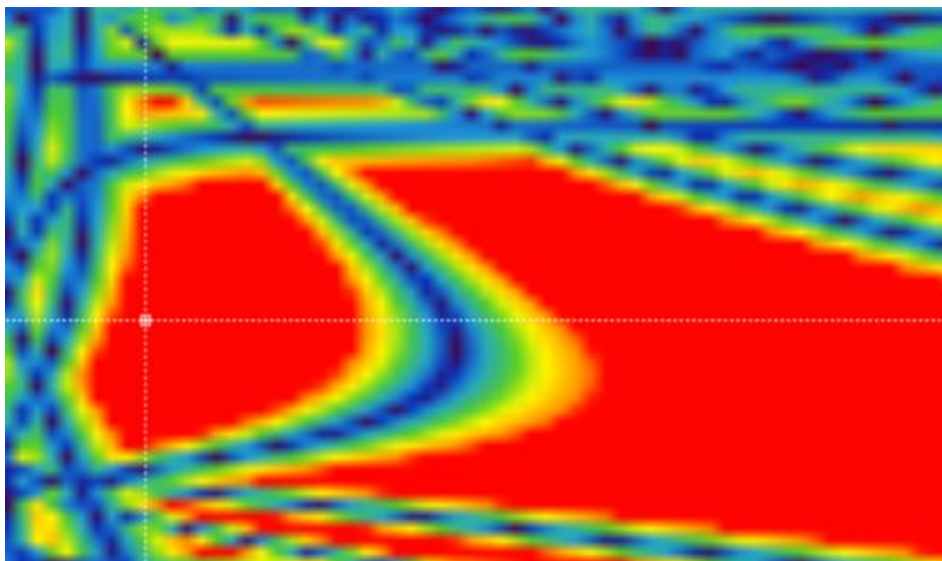
Kada se kao organska faza koristio MeOH, pik aktivnog sastojka, kao i pikovi onečišćenja uočeni su u kromatogramu pri većim vrijednostima vremena zadržavanja te je zbog

toga za daljnji razvoj metode odabrana jača organska pokretna faza, acetonitril. Također je za razvoj konačne metode odabrana kolona BEH Phenyl, jer je na toj koloni postignuto bolje razlučivanje u odnosu na C18 kolonu, odnosno pikovi su bili oštiji i uži.

Kako bi se dobili podatci o integriranim područjima željenih pikova koji su neophodni za DryLab analizu provedeni su novi eksperimenti. Eksperimenti su provedeni pri navedenim uvjetima: temperaturama od 30 °C i 60 °C, različitim trajanjem eksperimenta od 13 i 25 minuta, te pri tri pH-vrijednosti (2,0; 4,0; 6,0) pufera  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Korištena organska faza bila je  $\text{CH}_3\text{CN}$ , a zajedno s ostalim navedenim, parametrima korištena je kolona BEH Phenyl. Na temelju provedenih eksperimenata za DryLab uočljiv je bio utjecaj različitih temperatura, ali i pH-vrijednosti na zadržavanje pojedinih sastojaka smjese na koloni. Povišenjem temperature vrijeme zadržavanja je kraće, a promjena pH utječe na položaj pikova onečišćenja u odnosu na pik ceritiniba na kromatogramu. Pri uvjetima pH 2,0, temperaturi od 60 °C, i linearnom dijelu gradijenta u trajanju od 13 min vidljivo je preklapanje pikova onečišćenja CRT - 2 i CRT imp 3. Navedene pikove teško je međusobno razlikovati na kromatogramu, te se u tu svrhu onečišćenja mogu pojedinačno analizirati po danim uvjetima metode. Rezultat navedene analize je asignacija pojedinog pika odgovarajućem onečišćenju. „Ulazak“ pika onečišćenja pod glavni pik, odnosno preklapanje pikova onečišćenja CRT 2 i glavnog pika ustanovljeno je pri pH 4,0 na obje temperature i oba gradijenta, dok je pri pH 4,0, temperaturi od 60 °C, te gradijentu 25 min pik od onečišćenja CRT - 2 izašao ispred glavnog pika.

Na temelju rezultata ranije provedenih eksperimenata, integriranim površinama željenih pikova i analizom provedenom u programu DryLab, predloženi su uvjeti konačne metode. U svrhu dobivanja oštrijih, bolje razdvojenih pikova i kraćeg vremena trajanja analize, predložena metoda prilagođena je realnom sustavu. Prema Slici 16., koja prikazuje ovisnost  $t/\text{min}$  o  $T/^\circ\text{C}$ , odabrano je crveno područje što je znak veće stabilnosti i boljeg razdvajanja, uz nižu temperaturu, te kraće vrijeme eksperimenta. Ranije provedenim eksperimentima odabrani su konačni parametri za metodu kojom se određuju onečišćenja u ceritinib aktivnoj tvari. Metoda je prikazana u tablici 5.





Slika 16. Grafički prikaz rezultata dobivenog DryLab metodom

Tablica 5. Parametri razvijene metode za UHPLC

<b>Kolona i pakiranje</b>	<b>BEH Phenyl, 2,1mm x 100 mm, 1,7 <math>\mu</math>m</b>		
<b>Eluens A</b>	Pufer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); pH = 4,3		
<b>Eluens B</b>	$\text{CH}_3\text{CN}$		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme / min</b>	<b><math>\phi</math> (eluens A) / %</b>	<b><math>\phi</math> (eluens B) / %</b>
	0,00	90	10
	2,00	81	19
	3,50	65	35
	6,00	58	42
	9,00	40	60
	12,00	10	90
	14,00	10	90
	15,00	90	10
17,00	90	10	
<b>Otapalo</b>	9 : 1 (MeOH : MiliQ voda)		
<b>Volumen injektiranja / <math>\mu\text{L}</math></b>	1		
<b>Protok / <math>\text{mL min}^{-1}</math></b>	0,40		
<b>Valna duljina / nm</b>	210		
<b>Temperatura kolone / <math>^{\circ}\text{C}</math></b>	55		

## 4.2. Linearnost

Za svih 5 onečišćenja i aktivnu tvar provedeno je ispitivanje linearnosti. Postupak linearnosti procjenjuje se u rasponu koncentracije od 0,0005 do 0,025 mg mL<sup>-1</sup> pripremljenog analita u otapalu koristeći 3 točke (tri različite koncentracije) na kalibracijskoj krivulji. Razrjeđenja su napravljena kao što je opisano u poglavlju 3.6. Kao donja granica ispitivanja linearnosti uzeta je granica detekcije masene koncentracije 0,0005 mg mL<sup>-1</sup>. Gornja granica postavljena je na 0,025 mg mL<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani u tablicama 5 – 10, dok tablica 11. prikazuje pojedine parameter linearnosti.

Tablica 5. Rezultati studije linearnosti provedeni na **CRT** aktivnoj tvari

Uzorak	Masena koncentracija / mg mL <sup>-1</sup>	Nivo* / %	Odziv detektora	Nagib pravca	RRF**
CRT_1	$5,005 \times 10^{-4}$	0,05	3878	7812576	1
CRT_2	$1,001 \times 10^{-2}$	1	79473		
CRT_3	$2,503 \times 10^{-2}$	2,5	195241		

\* Koncentracijski nivo izražen s obzirom na masenu koncentraciju u obliku postotka

\*\*RRF- relativni faktor odgovora (engl. *Relative Response factor*): omjer nagiba onečišćenja i nagiba aktivne tvari

Tablica 6. Rezultati studije linearnosti provedeni na **CRT – 1** onečišćenju

Uzorak	Masena koncentracija / mg mL <sup>-1</sup>	Nivo / %	Odziv detektora	Nagib pravca	RRF
CRT_1_1	$4,998 \times 10^{-4}$	0,05	5994	11584432	1,5
CRT_1_2	$9,996 \times 10^{-3}$	1	118192		
CRT_1_3	$2,4990 \times 10^{-2}$	2,5	290004		

Tablica 7. Rezultati studije linearnosti provedeni na **CRT – 2** onečišćenju

Uzorak	Masena koncentracija / mg mL <sup>-1</sup>	Nivo / %	Odziv detektora	Nagib pravca	RRF
CRT_2_3	$5,0850 \times 10^{-4}$	0,05	4886	9667841	1,2
CRT_2_3	$1,0170 \times 10^{-2}$	1	102186		
CRT_2_3	$2,5425 \times 10^{-2}$	2,5	246317		

Tablica 8. Rezultati studije linearnosti provedeni na **CRT imp – 1** onečišćenju

Uzorak	Masena koncentracija / $\text{mg mL}^{-1}$	Nivo / %	Odziv detektora	Nagib pravca	RRF
CRT_imp1_1	$5,025 \times 10^{-4}$	0,05	5584	10540480	1,4
CRT_imp1_2	$1,0050 \times 10^{-2}$	1	109559		
CRT_imp1_3	$2,5125 \times 10^{-2}$	2,5	265582		

Tablica 9. Rezultati studije linearnosti provedeni na **CRT imp – 2** onečišćenju

Uzorak	Masena koncentracija / $\text{mg mL}^{-1}$	Nivo / %	Odziv detektora	Nagib pravca	RRF
CRT_imp2_1	$5,0510 \times 10^{-4}$	0,05	3883	6926561	0,2
CRT_imp2_2	$1,0102 \times 10^{-2}$	1	60068		
CRT_imp2_3	$2,5255 \times 10^{-2}$	2,5	173091		

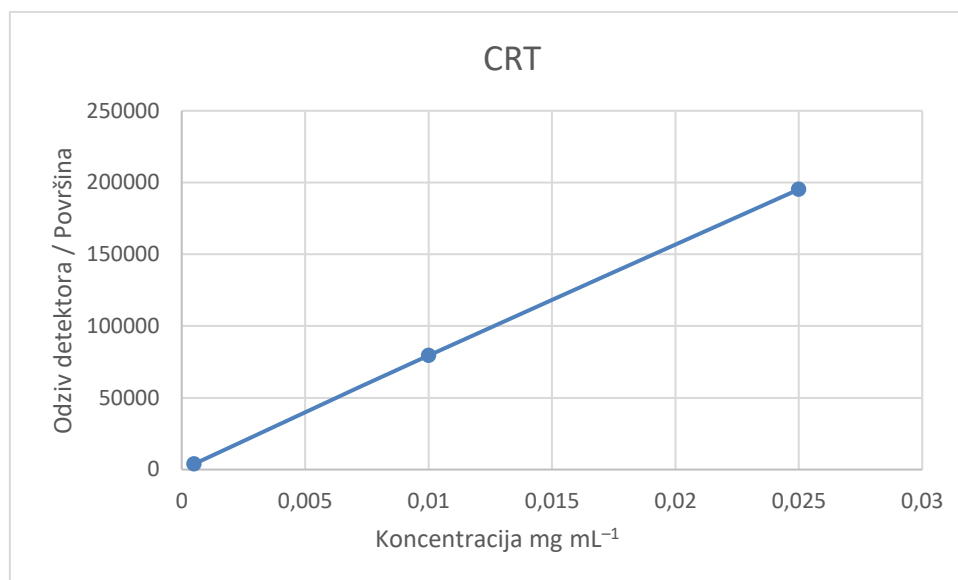
Tablica 10. Rezultati studije linearnosti provedeni na **CRT imp – 3** onečišćenju

Uzorak	Masena koncentracija / $\text{mg mL}^{-1}$	Nivo / %	Odziv detektora	Nagib pravca	RRF
CRT_imp3_1	$4,9950 \times 10^{-4}$	0,05	2537	7214971	0,9
CRT_imp3_2	$9,990 \times 10^{-3}$	1	72023		
CRT_imp3_3	$2,4975 \times 10^{-2}$	2,5	179268		

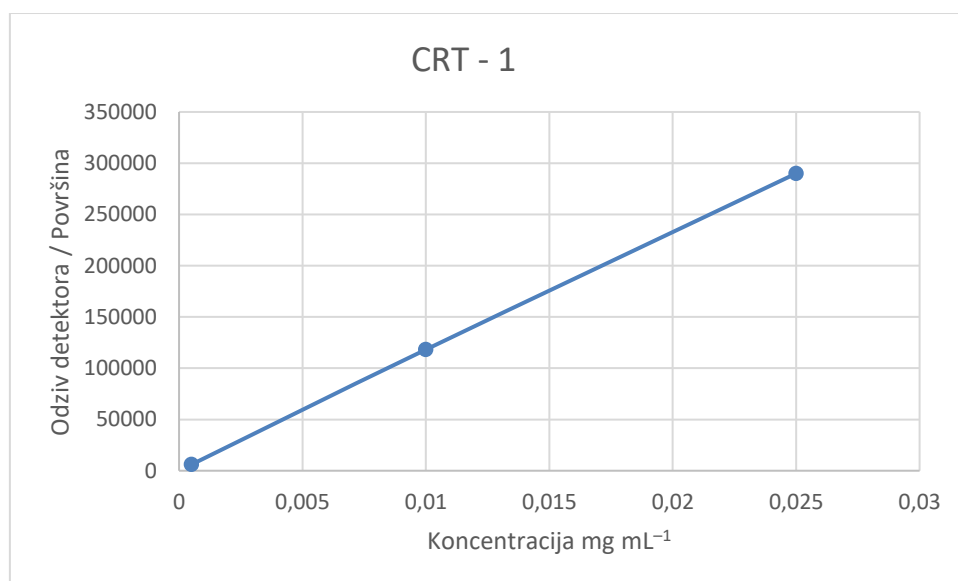
Tablica 11. Linearnost onečišćenja

Uzorak	Nagib pravca	RRF
<b>CRT</b>	7812576	<b>1,0</b>
<b>CRT-1</b>	11584432	1,5
<b>CRT-2</b>	9667841	1,2
<b>CRT imp 1</b>	10540480	1,4
<b>CRT imp 2</b>	6926561	0,9
<b>CRT imp 3</b>	7214971	0,9

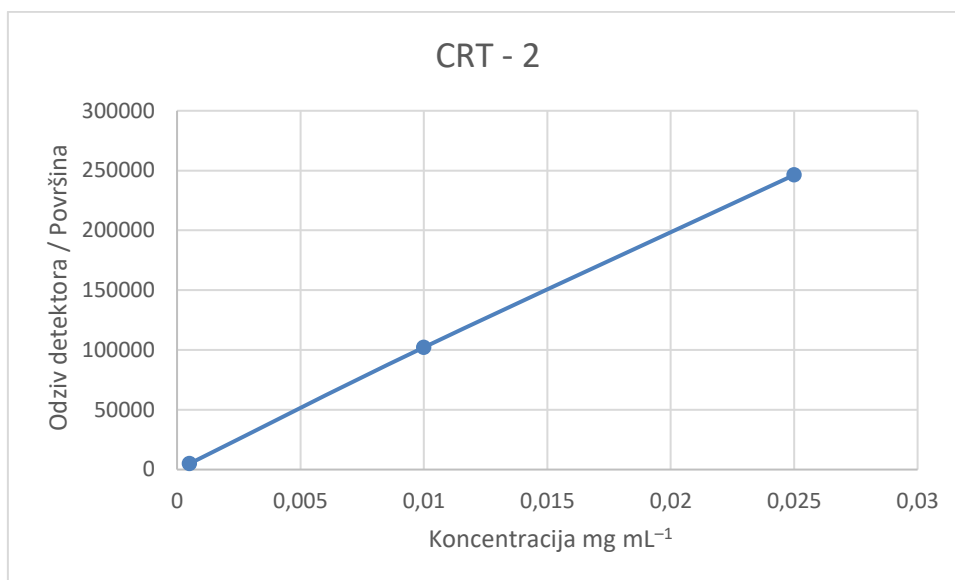
Na temelju rezultata prikazanih u tablicama 5-10 provedene studije linearnosti grafički je prikazana ovisnost odziva detektora (površine kromatografskog pika) o koncentraciji standarda (slike 17-22).



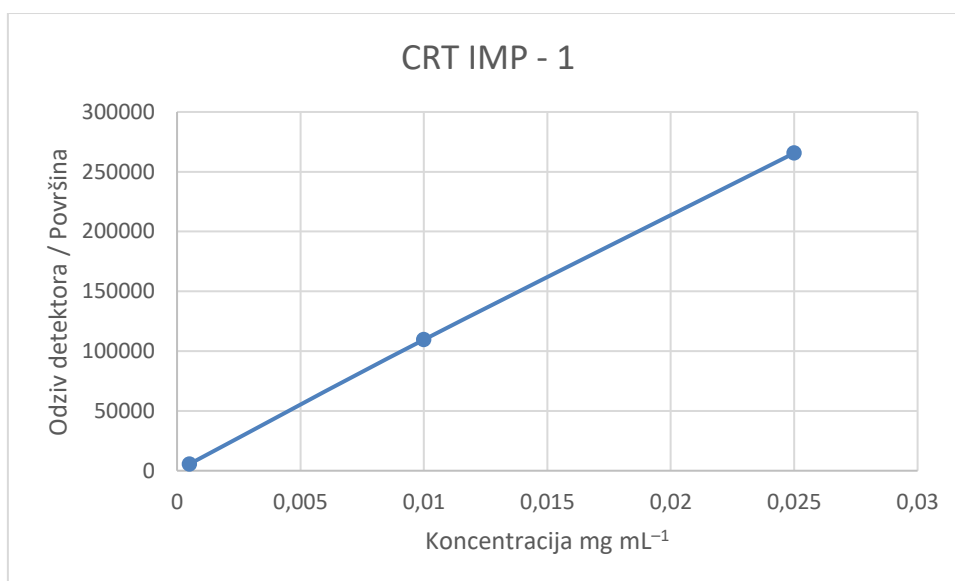
Slika 17. Ovisnost površine kromatografskog pika aktivne tvari CRT o koncentraciji, prema podacima iz tablice 5.



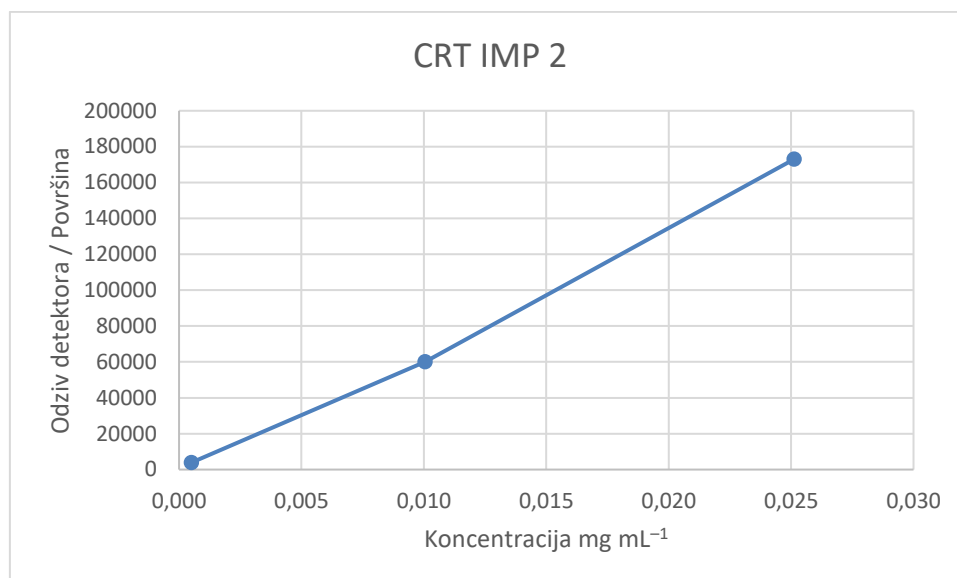
Slika 18. Ovisnost površine kromatografskog pika onečišćenja CRT – 1 o koncentraciji, prema podacima iz tablice 6.



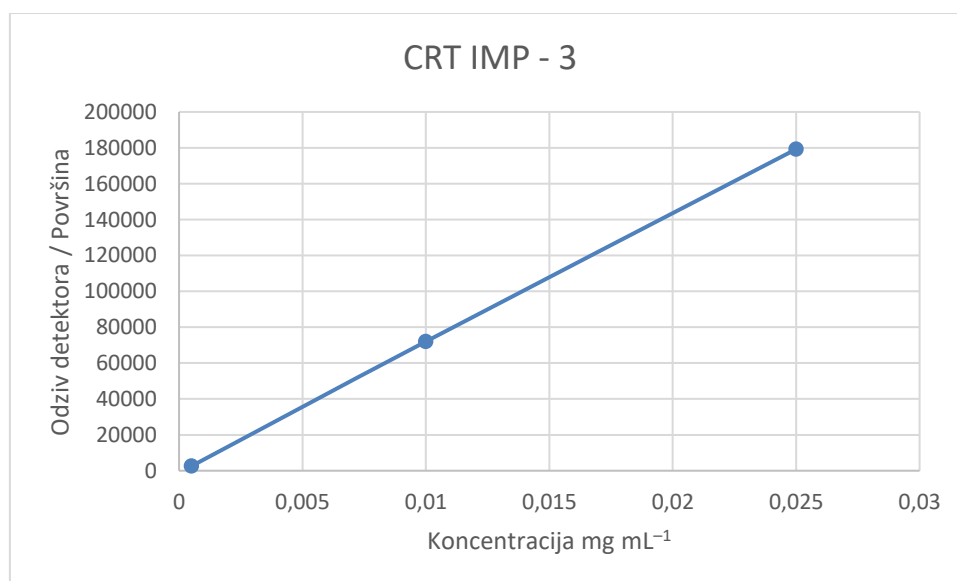
Slika 19. Ovisnost površine kromatografskog pika onečišćenja CRT – 2 o koncentraciji, prema podacima iz tablice 7.



Slika 20. Ovisnost površine kromatografskog pika onečišćenja CRT imp 1 o koncentraciji, prema podacima iz tablice 8.



Slika 21. Ovisnost površine kromatografskog pika onečišćenja CRT imp 2 o koncentraciji, prema podacima iz tablice 9.



Slika 22. Ovisnost površine kromatografskog pika onečišćenja CRT imp 3 o koncentraciji, prema podacima iz tablice 10.

Na temelju dobivenih podataka vidljivo je da je metoda linearna za aktivnu tvar CRT i 4 onečišćenja, CRT-1, CRT-2, CRT imp 1, te CRT imp 3 u području od 0,0005 mg mL<sup>-1</sup> do 0,025 mg mL<sup>-1</sup>. Obzirom da je u navedenom rasponu koncentracija komponenti zabilježena linearna ovisnost odaziva detektora o koncentraciji dovoljna je priprema standarda na jednom

koncentracijskom nivou. Razlog toga je što u svakodnevnoj analizi uzoraka nije potrebno pripremati kalibracijski pravac.

### 4.3. Analitički povrat

Analitički povrat (engl. *Recovery*) određen je usporedbom odgovora analiziranog uzorka sa odgovorom standardnog referentnog materijala otopljenog u čistom otapalu. Ukoliko je validacija zadovoljavajuća, analitički povrat određen za različite koncentracije može se iskoristiti za korekciju konačnih rezultata. Odabrane koncentracije trebaju pokriti širok raspon koncentracija i trebaju se uzeti u obzir i one koncentracije blizu granice kvantifikacije. Tablice 12-14 prikazuju analitički povrat onečišćenja pri sljedećim razinama: 0,025 mg mL<sup>-1</sup>, 0,01 mg mL<sup>-1</sup>, 0,0005 mg mL<sup>-1</sup>.

Tablica 12. Analitički povrat onečišćenja pri razini 0,025 mg mL<sup>-1</sup>

Onečišćenja	Standardna otopina onečišćenja (prosjeak površina)	"Cijepljene" otopine (prosjeak površina)	Analitički povrat / %
CRT - 1	290004	290988	100,3
CRT - 2	246317	242752	98,6
CRT imp 1	235582	270782	114,9
CRT imp 2	173091	172260	99,5
CRT imp 3	179268	181227	101,1

Tablica 13. Analitički povrat onečišćenja pri razini 0,01 mg mL<sup>-1</sup>

Onečišćenja	Standardna otopina onečišćenja (prosjeak površina)	"Cijepljene" otopine (prosjeak površina)	Analitički povrat / %
CRT - 1	118192	118390	100,2
CRT - 2	102186	118390	99,2
CRT imp 1	109559	110115	100,5
CRT imp 2	60068	87044	144
CRT imp 3	72023	72881	101,2

Tablica 14. Analitički povrat onečišćenja pri razini 0,0005 mg mL<sup>-1</sup>

Onečišćenja	Standardna otopina onečišćenja (prosjeak površina)	"Cijepljene" otopine (prosjeak površina)	Analitički povrat / %
CRT - 1	5994	5625	93,8
CRT - 2	4886	5755	117,8
CRT imp 1	5584	5706	102,2
CRT imp 2	3883	5536	141,0
CRT imp 3	2537	3129	123,3

#### 4.4. Granica kvantifikacije

Za određivanje granice kvantifikacije metode pripravljena je otopina koncentracije  $\gamma = 0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$ , na način opisan u odlomku 3.6. Rezultati su prikazani u tablici 15.

Tablica 15. Izračun točnosti za aktivnu tvar i onečišćenja

Onečišćenje*	Nivo** / %	Točnost / %	RSD / %
<b>CRT</b>	0,05	102,6	1,3
CRT - 1	0,05	87,3	0,7
CRT - 2	0,05	79,1	0,8
CRT imp 1	0,05	80,3	0,5
CRT imp 2	0,05	99,2	3,7
CRT imp 3	0,05	94,7	6,3

\*Prosječna vrijednost 3 injektiranja svakog onečišćenja i **aktivne tvari**

\*\* Koncentracijski nivo izražen s obzirom na masenu koncentraciju u obliku postotka



Prihvatljivi omjer S/N za granicu kvantifikacije je 10:1. U tablici 16. prikazane su vrijednosti omjera S/N svih onečišćenja u određivanim uzorcima. Za granicu kvantifikacije određena je vrijednost  $0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$

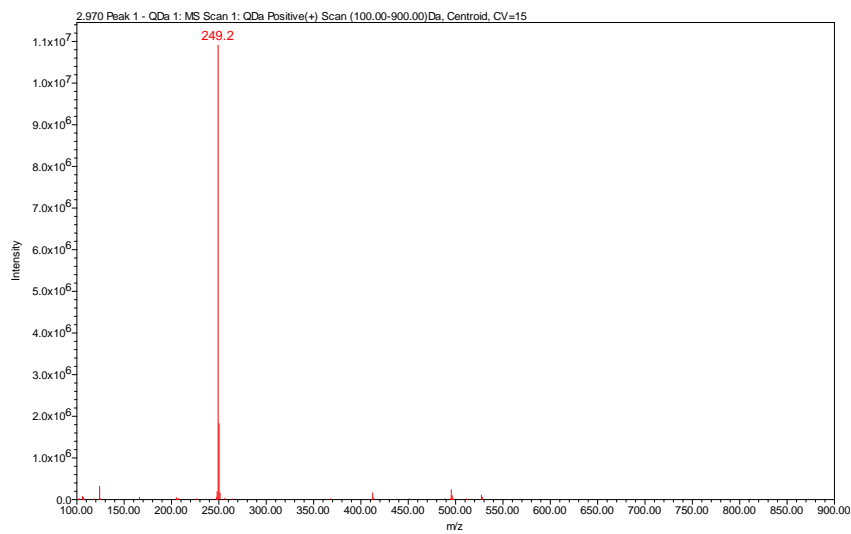
Tablica 16. Prikaz omjera signala kromatografskog pika i šuma

Onečišćenje*	Prosjek S/N $0,0005 \text{ mg mL}^{-1}$
<b>CRT</b>	19
CRT - 1	35
CRT - 2	28
CRT imp 1	51
CRT imp 2	35
CRT imp 3	13

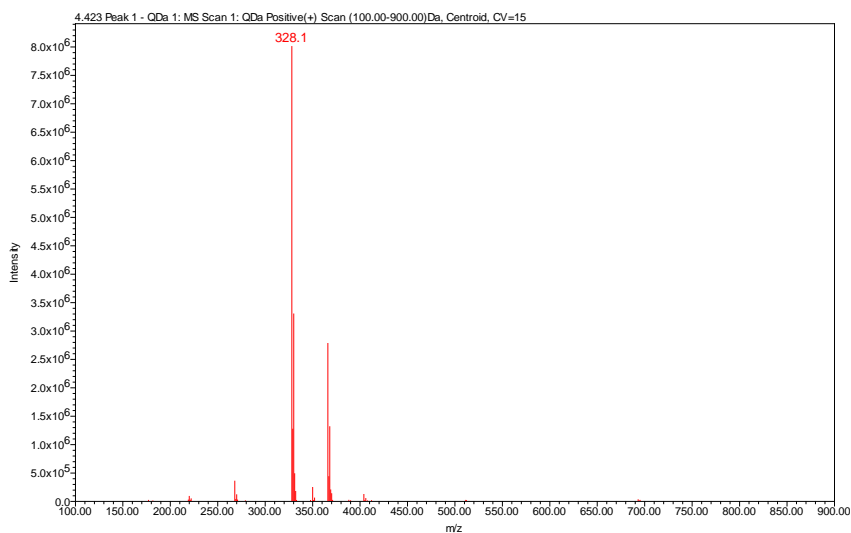
\*Prosječna vrijednost 3 injektiranja svakog onečišćenja i **aktivne tvari**

#### 4.5. LC-MS analiza

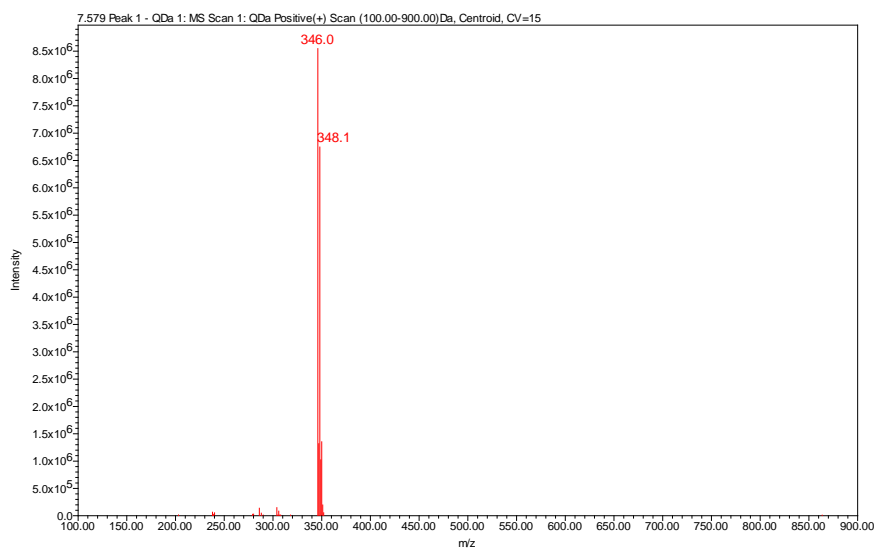
Pripravom, te ujedno korištenjem zasebnog pufera  $\text{HCOONH}_4$  za MS analizu, pH vrijednosti 4,3 potvrđene su mase pojedinih onečišćenja ceritinib aktivne tvari. U priloženim spektrima prikazanim na slikama 22-26 vidljive su vrijednosti  $m/z$  pojedinih onečišćenja, koje se podudaraju s točnim masama prikazanih u tablici 17. U slučaju MS spektara prikazanih na slici 23. i 25. vidljivi su izotopni signali korisni za određivanje broja atoma klora (Cl) u molekuli koji daje doprinos signalu  $(M+2)^+$ . Na slici je također vidljivo da je signal nakon glavnog pika jednak trećini njegova odziva što odgovara izotopu samog klora.



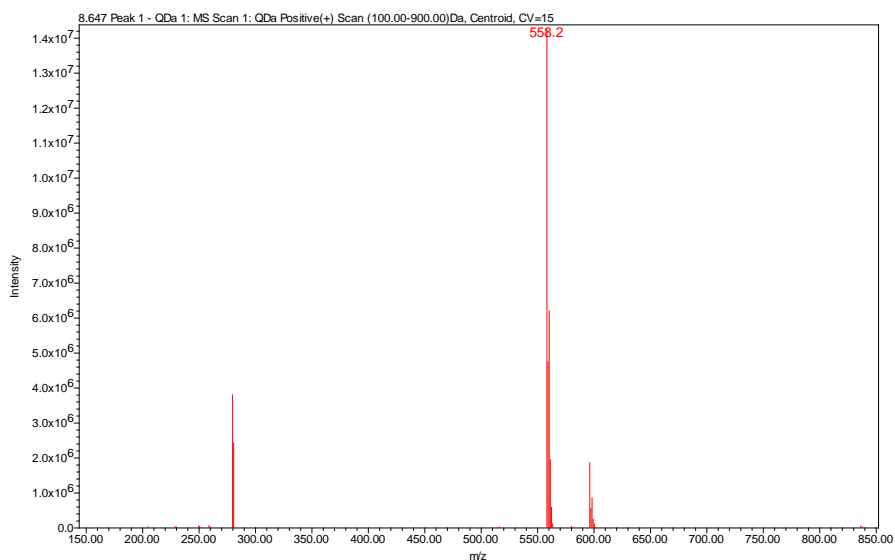
Slika 22. MS spektar onečišćenja CRT-1



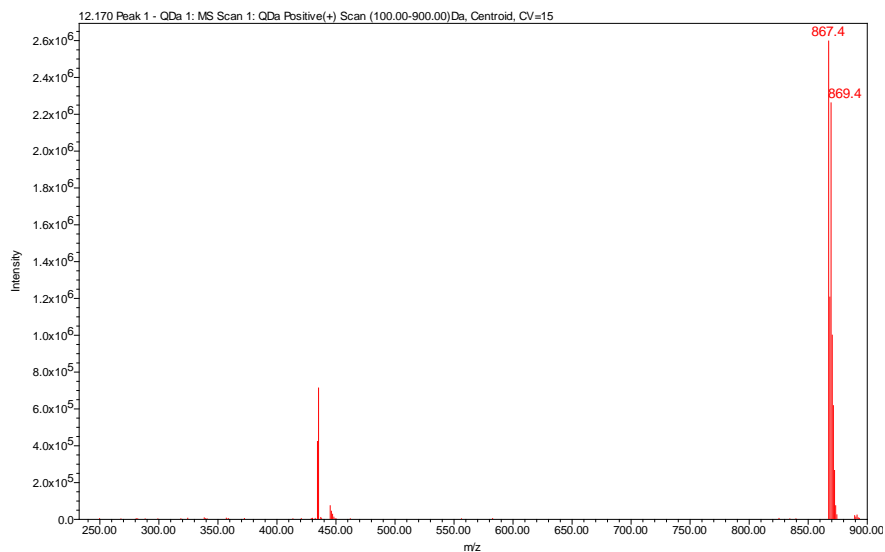
Slika 23. MS spektar onečišćenja CRT imp 1



Slika 24. MS spektar onečišćenja CRT-2

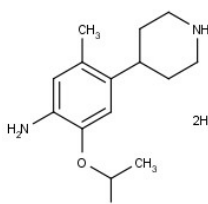
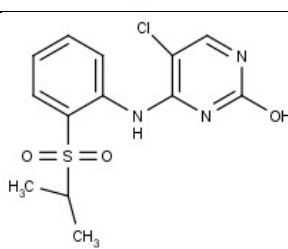
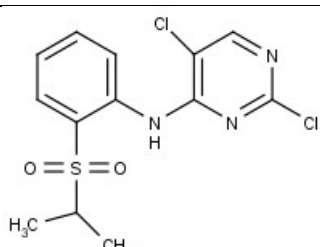


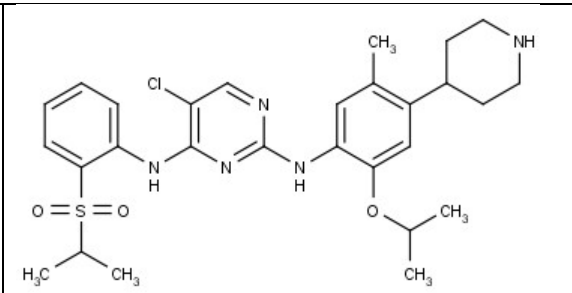
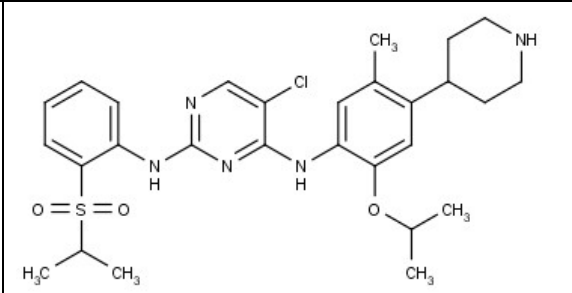
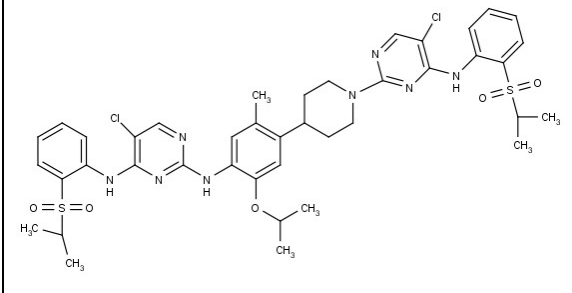
Slika 25. MS spektar onečišćenja CRT imp 3



Slika 26. MS spektar onečišćenja CRT imp 2

Tablica 17. Rezultati masenospektrometrijske analize za onečišćenja i aktivnu tvar

Uzorak	Struktura molekule	M + 1	Točna masa
CRT - 1		249,2	248,1889
CRT imp 1		328,1	327,0444
CRT - 2		346 348 (M+2)	345,0105

CRT	 <chem>CC(C)S(=O)(=O)c1ccc(Nc2nc(Nc3cc(C)c(N4CCCCC4)c3)c(Cl)n2)cc1</chem>	558,2	557,2227
CRT imp 3	 <chem>CC(C)S(=O)(=O)c1ccc(Nc2nc(Nc3cc(C)c(N4CCCCC4)c3)c(Cl)n2)cc1</chem>	558,2	557,2227
CRT imp 2	 <chem>CC(C)S(=O)(=O)c1ccc(Nc2nc(Nc3cc(C)c(N4CCCCC4Nc5cnc(Nc6cc(C)c(S(=O)(=O)C(C)C)c6)c(Cl)n5)c3)c(Cl)n2)cc1</chem>	867,4 869,4 (M+2)	866,2566

## § 5. ZAKLJUČAK

Svrha ovog rada bila je razviti brzu, ponovljivu i jednostavnu metodu za određivanje onečišćenja u ceritinibu. Za odvajanje i kvantitativno određivanje onečišćenja i ceritiniba koristila se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti, dok je za potvrdu rezultata korišten sustav LC-MS.

Za optimizaciju kromatografskih uvjeta korišten je program DryLab. Analizom rezultata odredili su se optimalni kromatografski uvjeti: temperatura 49 °C s ukupnim vremenom trajanja metode od 20 minuta. Dobiveni parametri prilagođeni su realnom sustavu pri čemu je temperatura konačne metode iznosila 55 °C, a ukupno vrijeme kromatografskog odvajanja 17 minuta. Analiza je provedena na BEH Phenyl koloni uz korištenje pufera  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH vrijednosti 4,3 dok je za organsku fazu odabran  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Razvijena je brza i učinkovita UHPLC metoda, s visokom osjetljivošću i kratkim trajanjem analize za određivanje onečišćenja u ceritinibu.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

OZNAKA	NAZIV
ALK	kinaza aplastičnog limfoma
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
APPI	ionizacija fotonima pri atmosferskom tlaku
CD	karbidopa
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
FAB	bomardiranje brzim atomima
FDA	organizacija za hranu i lijekove
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
ICH	internacionalne konferencije za harmonizaciju
LC	tekućinska kromatografija
LC-MS	tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
LOD	granica detekcije
LOQ	granica kvantifikacije
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
$m/z$	omjer mase i naboja
NSCLC	rak pluća nemalih stanica
SIMS	ionizacija bomardiranjem iona
S/N	omjer signala i šuma
TOF	analizator koji mjeri vrijeme leta
TSP	toplinske ionizacije raspršenjem
UHPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
UV/VIS	UV-Vis spektroskopija

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs, *J. of Pharmaceut. A.* **4** (2014) 159–165.
2. J. P. Koivunen, C. Mermel, K. Zejnullahu, C. Murphy, E. Lifshits, A. J. Holmes, H. G. Choi, J. Kim, D. Chiang, R. Thomas, J. Lee, W. G. Richards, D. J. Sugarbaker, C. Ducko, N. Lindeman, J. P. Marcoux, J. A. Engelman, N. S. Gray, C. Lee, M. Meyerson, P. A. Janne, *Clin. Cancer Res.* **14** (2008) 4275–4283.
3. [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170726138214/anx\\_138214\\_hr.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170726138214/anx_138214_hr.pdf) (datum pristupa 23.04.2018.)
4. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ceritinib#section=2D-Structure> (datum pristupa 20.04.2018.)
5. J. Janković, Parkinson's disease: clinical features and diagnosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79** (2008) 368–376.
6. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, *Školska knjiga*, Zagreb, (2003) 217–235.
7. M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, *Mentor d.o.o.*, Zagreb, (2014) 97–99.
8. <http://www.slideshare.net/Analysys/apat-2013-gc-workshop-2> (datum pristupa 21.04.2018.)
9. L. Novakova, L. Havlikova, H. Vlčkova, Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC, *TrAC Trends in Anal. Chem.* **63** (2014) 55–64.
10. K. Toppner, HPLC Analysis, The role of ultrapure water, *Sartorius*, (2014) 16–18.
11. <https://ibsen.com/applications/spectroscopy/high-pressure-liquid-chromatography/> (datum pristupa 25.04.2018.)
12. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, *J. Wiley & Sons*, Kanada, 1979, str. 87–166.



13. M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, *Talanta* **70** (2006) 678–690.
14. S. Fekete, D. Guillarme, Ultra-high-performance liquid chromatography for the characterization of therapeutic proteins, *TrAC Trends in Anal. Chem.* **63** (2014) 76–84.
15. X.-S. Miao, C. D. Metcalfe, Analysis of neutral and acidic pharmaceuticals by liquid chromatography mass spectrometry *u*: M. Petrović, D. Barcelo (urednici), *Comprehensive Analytical Chemistry - Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*, Elsevier, Amsterdam, 2007, str. 133–154.
16. A. Horvatić, M. Cindrić, Analysis of therapeutic peptides by mass spectrometry, Institut “Ruđer Bošković”, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za sistemsku biomedicinu, Zagreb, (2008) 258–263.
17. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Wiley, Third Edition, 2007, str. 33–36.
18. N. Galić, Elektroraspršenje - blagi način ionizacije u spektrometriji masa, *Kem. u Ind.* **53** (2004) 117–123.
19. P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Pico, Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. of Chrom. A.* **1217** (2010) 2471–2483.
20. E. Garcia-Lor, M. Martinez, J. V. Sancho, G. Penuela, F. Hernandez, Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* **99** (2012) 1011–1023.
21. R. Varga, I. Somogyvari, Z. Eke, K. Torkos, Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction.liquid chromatographyelectrospray ionization tandem mass spectrometry, *Talanta* **83** (2011) 1447–1454.
22. M. Periša, S. Babić, Simultaneous determination of pharmaceuticals and some of their metabolites in wastewater by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. of Separation Sc.* **37** (2014) 1289–1296.
23. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* **65** (2016) 471–482.

24. [http://www.waters.com/waters/en\\_HR/ACQUITY-QDa-Mass-Detector-for-Chromatographic-Analysis/nav.htm?cid=134761404&locale=en\\_HR](http://www.waters.com/waters/en_HR/ACQUITY-QDa-Mass-Detector-for-Chromatographic-Analysis/nav.htm?cid=134761404&locale=en_HR) (datum pristupa 25.04.2018.)
25. <http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-5140EN.pdf> (datum pristupa 26.4.2018.)
26. V. Ravichadran, S. Shalini, K.M. Sundram, Harish Rajak, Validation of analytical methods - strategies and importance, *Int. J. Pharmacy and Pharm. Sci*, **2** (2010) 18–22.
27. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf> (datum pristupa 26.4.2018.)
28. U.J. Krull, M. Thompson, (2001), Analytical chemistry, 3rd edition, Encyclopedia of Physical Science and Technology, Toronto
29. D. Harvey, (2000), Modern analytical chemistry, 1st edition, McGraw – Hill, Boston, USA
30. R. M. Krisko, K. McLaughlinb, M. J. Koenigbauer, C. E. Lunte, Application of a column selection system and DryLab software for high-performance liquid chromatography method development, *J. Chromatogr. A*. **1122** (2006) 186–93.
31. *DryLab*<sup>®</sup>, V4.0, *Molnar-institute* (2014), Molnar-institute, Berlin, Njemčka
32. C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *J. Chromatogr. A*. **125** (1976) 129–156
33. J. Terzić, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, Aspekti primene DryLab<sup>®</sup> softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda, *Arh. farm.* **64** (2014) 205–219.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Borna Mašić

Datum rođenja: 18. kolovoza, 1992.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

### Obrazovanje

1999–2007 Osnovna škola „Ivan Goran Kovačić“, Slavonski Brod

2007–2011 Srednja škola „Matija Mesić“, Slavonski Brod

2011–2016 Preddiplomski sveučilišni studij Kemije, Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Nagrade i priznanja

2013 Posebna rektorova nagrada za sudjelovanje u projektu „Otvoreni dani kemijskog odsjeka“

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012-2015 Znanstvene čarolije

**BORNA MAŠIĆ**

**Adresa:** Vukomerec 24b  
10000 Zagreb, Croatia  
**E-mail:** [bornamasic@gmail.com](mailto:bornamasic@gmail.com)  
**Datum rođenja:** 18.08.1992.  
**Telefon:** +385 97 793 1308

**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET • KEMIJSKI ODSJEK • ANALITIČKA  
KEMIJA I BIOKEMIJA**

Kreativna, neovisna, organizirana i vrlo proaktivna osoba s dokazanom intelektualnom sposobnošću i zabilježenim profesionalnim postignućima utemeljenim na kritičkom razmišljanju, kreativnosti i sposobnosti strateškog planiranja, traži buduću karijeru u izazovnom radnom okruženju.

**EDUKACIJA**

**2016 - 2018** M.Sc. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno - matematički fakultet, Kemijski odsjek, Analitička kemija i Biokemija, Zagreb, Hrvatska. M.Sc.  
**2011 - 2016** B.Sc. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno - matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zagreb, Hrvatska. B.Sc.

**RADNO ISKUSTVO**

**2017-danas** Pliva, Zagreb, Hrvatska. Istraživanje i razvoj; analitički laboratorij, M.Sc. Studentska praksa. UHPLC određivanje nečistoća u ceritinib aktivnoj tvari

- Cilj rada je upoznavanje s industrijskim farmaceutskim okruženjem: SOP, EHS i protokolima osiguravanja kvalitete
- Integritet i pohrana podataka
- Razvoj metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) za određivanje nečistoća u ceritinib aktivnoj tvari
- Drylab softver se koristi u svrhu određivanja optimalnih uvjeta za UHPLC kromatografiju, s varijablama kao što su temperatura, pH i sastav pokretne faze. MS se koristio za potvrdu mase detektiranih onečišćenja.

**2013** Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno - matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zagreb, Hrvatska. Posebna rektorova nagrada, član organizacijskog odbora: *Otvoreni dani kemijskog odjeka.*

- Posebna nagrada za izvanredne projekte dizajnirane u svrhu popularizacije znanosti

**2012-2015** Znanstvene čarolije: ne profitabilna organizacija Hrvatskog kemijskog društva. Član organizacijskog odbora i aktivni predavač.

- Program je dizajniran u svrhu popularizacije znanosti među djecom i tinejdžerima
- Organizirao i predstavio više od 20 radionica u vrtićima i osnovnim školama diljem Hrvatske.

**2012-2016** Studentski poslovi. Popis različitih poslova koje sam radio tijekom svog sveučilišnog obrazovanja.

- Globe Travel Agency: asistent direktorice
- The House Hotel: rad na recepciji
- Gen-I: asistent direktorice
- H1 Telecom: agent u call centru
- The Valamar Group Animation Team: animator u hotelu

**VJEŠTINE**

Jezici: hrvatski (izvorni govornik), engleski (aktivno u govoru i pismu), njemački (osnove u govoru i pismu)

Alati: aktivno korištenje MC Office-a, DryLab, Empower...

Vozačka dozvola: B kategorija

**HOBII**

**2006 - 2017:** Odbojkaški klub "Brod"

**2009 - 2011:** Kazalište mladih Slavonski brod

**1996 - 2005:** Akrobatski R'n'R

