

# Razvoj i validacija metode fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima za određivanje onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari Elvitegraviru

---

Radić, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:699232>

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

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



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Antonija Radić

**RAZVOJ I VALIDACIJA METODE  
FLUIDNE KROMATOGRFIJE PRI  
SUPERKRITIČNIM UVJETIMA ZA  
ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U  
AKTIVNOJ FARMACEUTSKOJ TVARI  
ELVITEGRAVIRU**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju TAPI Pliva R&D Analitika pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Asje Čuline, dipl. ing. biotehn.

## Zahvale

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc Nives Galić na strpljivosti, pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Srdačno zahvaljujem dr. sc. Mislavu Runje na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada.*

*Posebno hvala mojoj neposrednoj voditeljici Asji, dipl. ing. biotehn. na nesebičnoj pomoći, podršci, ohrabrivanju te na ugodnoj i prijateljskoj atmosferi u laboratoriju tijekom izrade diplomskog rada. Hvala Ti za sve.*

*Hvala Miroslavi na velikoj pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Hvala svim mojim dragim prijateljima za podršku, razumijevanje i pomoć tijekom studiranja, posebno hvala onima koji su vjerovali u mene čak i kad sama nisam. Hvala vam za sve protekle dane moga studiranja koje ću pamtiti zauvijek. Od srca, hvala Josipi, Martini, Mateji i Martini. Uz vas su sve studentske brige bile lakše.*

*Zahvaljujem mojoj rodbini koja je na bilo koji način olakšala moje studentske dane. Hvala za vjeru u moj uspjeh.*

*Naposlijetku, osobitu zahvalu upućujem mojim roditeljima, bratu i sestrama za ljubav, veliku žrtvu, odricanje te razumijevanje tijekom mojih studentskih dana.*

# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Elvitegravir .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Virus humane imunodeficijencije.....</i>	<i>3</i>
<b>2.2. Kromatografija.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. <i>Kromatografski parametri .....</i>	<i>6</i>
<b>2.3. Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima.....</b>	<b>7</b>
2.3.1. <i>Kromatografski sustav .....</i>	<i>8</i>
2.3.2. <i>Instrumentacija .....</i>	<i>11</i>
<b>2.4. Usporedba SFC s ostalim kolonskim kromatografijama i primjena.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5. Validacija analitičkih metoda .....</b>	<b>14</b>
2.5.1. <i>Parametri validacije .....</i>	<i>15</i>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Popis polaznih materijala, kemikalija i opreme.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Priprema pokretnih faza i otapala.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Priprema otopina za SFC analizu.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Kromatografski parametri za SFC analizu .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5. Validacija metode za određivanje onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari Elvitegraviru.....</b>	<b>23</b>
3.5.1. <i>Specifičnost .....</i>	<i>23</i>
3.5.2. <i>Granica kvantifikacije.....</i>	<i>23</i>
3.5.3. <i>Preciznost.....</i>	<i>24</i>
3.5.4. <i>Linearnost .....</i>	<i>25</i>
3.5.5. <i>Točnost.....</i>	<i>27</i>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Rezultati SFC analize.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Validacija metode.....</b>	<b>32</b>
4.2.1. <i>Specifičnost .....</i>	<i>33</i>
4.2.2. <i>Granica kvantifikacije.....</i>	<i>34</i>
4.2.3. <i>Preciznost.....</i>	<i>37</i>

4.2.4. <i>Linearnost</i> .....	38
4.2.5. <i>Točnost</i> .....	39
<b>4.3. Sažetak rezultata validacije metode .....</b>	<b>42</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>43</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>44</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>46</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XLVIII</b>



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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### RAZVOJ I VALIDACIJA METODE FLUIDNE KROMATOGRAFIJE PRI SUPERKRITIČNIM UVJETIMA ZA ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA U AKTIVNOJ FARMACEUTSKOJ TVARI ELVITEGRAVIR

Antonija Radić

Elvitegravir je inhibitor enzima HIV-1 integraze koji se u kombinaciji s drugim lijekovima koristi za liječenje virusa humane imunodeficijencije (HIV). Tijekom procesa proizvodnje ili razgradnje aktivne farmaceutske tvari mogu nastati razna onečišćenja koja utječu na kvalitetu i sigurnost lijeka. Određivanje čistoće lijeka uključuje analitičke metode kojima je moguće detektirati, identificirati, strukturno karakterizirati i kvantitativno odrediti onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari kao i u samom lijeku. U ovom radu razvijena je brza i učinkovita metoda fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima za analizu onečišćenja Elvitegravira primjenom detektora s nizom dioda. Razvijena metoda također je i validirana određivanjem sljedećih parametara validacije: specifičnost, granica kvantifikacije, preciznost, linearnost i točnost.

(47 stranica, 17 slika, 32 tablice, 26 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: Elvitegravir, onečišćenja, SFC, validacija

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić  
Neposredni voditelj: Asja Čulina, dipl. ing. biotehn.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
  2. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič
  3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2019.



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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR ELVITEGRAVIR ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT IMPURITIES DETERMINATION

Antonija Radić

Elvitegravir is an HIV-1 integrase enzyme inhibitor which, in combination with other drugs is used to treat human immunodeficiency virus (HIV). During the process of production or degradation of the active pharmaceutical substance, various impurities are produced that affect quality and safety of the drug. Determining the purity of the drug includes analytical methods that can detect, identify, structure and quantitatively determine the impurities in the active pharmaceutical substance as well as in the drug itself. In this paper, a fast and efficient supercritical fluid chromatography (SFC) method for the analysis of impurities has been developed by using a diode array detector. The developed method is also validated by determining the following validation parameters: specificity, limit of quantification, precision, linearity and accuracy.

(47 pages, 17 figures, 32 tables, 26 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: Elvitegravir, SFC, impurities, validation

Mentor: Prof. Dr. Nives Galić

Assistant mentor: Asja Čulina, dipl. ing. biotehn.

Reviewers:

1. Prof. Dr. Nives Galić
  2. Dr. Ines Primožič, Associate Professor
  3. Dr. Biserka Prugovečki, Associate Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 21<sup>th</sup> February 2019



## § 1. UVOD

Aktivna farmaceutska tvar Elvitegravir je inhibitor HIV-1 integraze.<sup>1</sup> U kombinaciji s drugim lijekovima koristi se za liječenje virusa humane imunodeficijencije tipa 1.

Bilo koji sastojak lijeka koji nije definiran kao aktivna tvar ili pomoćna tvar u farmaceutskom proizvodu predstavlja onečišćenje. Kako bi lijek bio siguran za primjenu važno je ispitati njegovu čistoću, a to uključuje analitičke metode kojima je moguće detektirati, identificirati, strukturno karakterizirati i kvantitativno odrediti onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari kao i u samom lijeku. Najviša preporučena dnevna doza Elvitegravira je 150 mg. Zahtjevi analitičke metode uvelike su opisani u smjernicama Međunarodne organizacije za harmonizaciju (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH). ICH dokument Q3A(R2) donosi smjernice za kontrolu onečišćenja u novim ljekovitim tvarima. Prema tom dokumentu dopuštena granica svakoga pojedinoga poznatog onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari (ako maksimalna dnevna dopuštena doza nije veća od dva grama, tablica 1.) može iznositi 0,15 %.<sup>2,3</sup>

Tablica 1. Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja prema ICH smjernicama (ICH, 25. listopada, 2006.)

Najviša dnevna doza	Granica za izvještavanje	Granica za identifikaciju	Granica za kvalifikaciju
$\leq 2$ g/dan	0,05 %	0,10 % ili 1,0 mg/dan (ovisno o tome što je niže)	0,15 % ili 1,0 mg/dan (ovisno o tome što je niže)
$>2$ g/dan	0,03 %	0,05 %	0,05 %

Svrha ovoga diplomskog rada je razviti metodu za kvantitativno određivanje onečišćenja Elvitegravira primjenom fluidne kromatografije pri superkričnim uvjetima te provesti validaciju razvijene metode koja uključuje određivanje sljedećih validacijskih parametara: specifičnost, granica kvantifikacije, preciznost, linearnost i točnost.

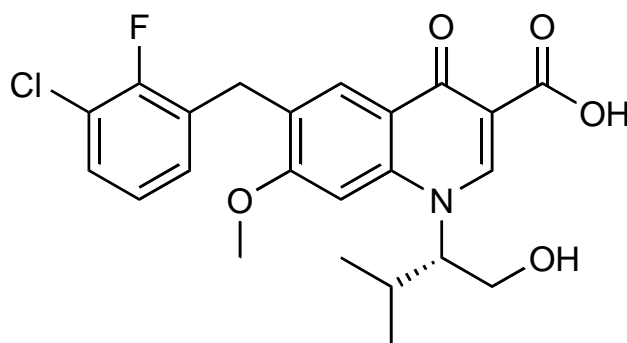
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Elvitegravir

Elvitegravir (ELV) je aktivna farmaceutska tvar koja se koristi za liječenje osoba zaraženih virusom humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1), virusom koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS). Prema pravilima Međunarodne unije za čistu i primjenjenu kemiju (IUPAC) naziva se 6-[(2-fluorofenil-3-klor) metil]-1-[(2S)-1-hidroksi-3-metilbutan-2-il]-7-metoksi-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina. Molekularna formula Elvitegravira je  $C_{23}H_{23}ClFNO_5$ , a molekulska masa iznosi 447,88 Da (slika 1).

Reverzna transkriptaza, proteaza i integraza su enzimi važni za umnažanje HIV-a u stanicama domaćina i stoga su oni ciljevi lijeka protiv ove virusne infekcije. Elvitegravir je organska molekula modificirane kinolonske strukture koja posjeduje inhibitorско djelovanje na enzim HIV-1 integrazu.<sup>1</sup> Inhibira enzim i potom sprječava integraciju genetskog materijala virusa u genetski materijal zaraženih stanica i na taj način smanjuje mogućnost razmnožavanja virusa i usporava širenje infekcije. Metabolizira se prvenstveno putem jetrenog enzima CYP3A, a lijek koji inducira ili inhibira CYP3A može utjecati na bioraspoloživost Elvitegravira. U liječenju se koristi u kombinaciji s tvarima koje pomažu njegovoj stabilizaciji tako što usporavaju njegovu razgradnju i time potiču antivirusno djelovanje.<sup>4</sup> Oblik terapije koji koristi kombinaciju lijekova, odnosno visokoaktivna antiretroviralna terapija (HAART, od *engl. Highly Active Retroviral Therapy*), pomaže u liječenju HIV-1 infekcije tako što smanjuje replikaciju virusa HIV-1.<sup>5</sup>

Američka organizacija za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration, FDA*) odobrila je 27. kolovoza 2012. godine kombinaciju sljedeće četiri aktivne tvari u jednoj tableti: kobicistat, tenofovir, emtricitabin i Elvitegravir. Samo kobicistat djeluje kao stabilizator, a ostala tri posjeduju anti HIV djelovanje.<sup>6</sup>



Slika 1. Struktura aktivne farmaceutske tvari Elvitegravira

### 2.1.1. Virus humane imunodeficijencije

Virus humane imunodeficijencije pripada skupini retrovirusa. Glavna karakteristika retrovirusa je njihova sposobnost umnažanja mehanizmom reverzne transkripcije kojim nastaje kopija DNA koja se onda ugradi u stanicu domaćina. Infekcija virusom humane imunodeficijencije je infekcija jednim od dva virusa (HIV-1 ili HIV-2) koja uništava bijele krvne stanice odnosno limfocite, te uzrokuje AIDS koji nastaje kao posljedica oslabljenog imuniteta. HIV-1 je najčešći u Europi, Aziji i centralnoj, južnoj i istočnoj Africi. HIV-2 je glavni virus koji uzrokuje AIDS u zapadnoj Africi.<sup>7,8</sup>

Limfociti, odnosno bijele krvne stanice glavni su cilj ovoga virusa koji onda dovodi do infekcije. Genetski materijal virusa najprije se ugrađuje u DNA zaražene stanice, potom se umnaža unutar nje i na kraju je razara te ispušta nove virusne čestice. Nove virusne čestice tada zaraze druge limfocite i na isti način ih razaraju. Virus djeluje tako da se pričvrsti na limfocite koji na svojoj membrani imaju receptorsku bjelančevinu, koja se naziva CD4. Stanice s receptorima CD4 uglavnom se nazivaju CD4+ stanice koje aktiviraju i usklađuju druge stanice imunološkog sustava, kao što su B-limfociti, makrofagi i citotoksični T limfociti, koje pomažu uništiti stanice raka ili slično. Infekcija HIV-om razara CD4+, organizam slabi i ne može se sam zaštititi od infekcije ili nastanka stanica raka. Također, infekcija HIV-om može ometati i ulogu B-limfocita odnosno dijela imunološkog sustava koji proizvodi protutijela tako što dovodi do stvaranja ogromnog broja istih.<sup>9</sup>

Prijenos infekcije HIV odvija se spajanjem s tjelesnom tekućinom koja sadrži zaražene stanice. U takve tekućine ubrajaju se krv, izlučevine rodnice, sjeme, cerebrospinalna tekućina i majčino mlijeko. HIV se prenosi spolnim odnosom, injekcijama ili infuzijama zaražene krvi te sa zaražene majke na dijete tijekom poroda ili preko majčina mlijeka.

Velik broj ljudi zaraženih HIV-om godinama nemaju nikakve simptome, ali najčešći znakovi koji mogu upućivati da se radi o HIV infekciji su nagli gubitak težine, groznica, otečene limfne žlijezde na vratu i ispod pazuha, bijele mrlje u ustima ili grlu. Svi od tih simptoma mogu se povezati i s nekom drugom bolesti, ali analizom krvi na HIV može se dokazati da su povezani s AIDS-om. Najčešće korištene tehnike koje se koriste u otkrivanju protutijela u uzorku krvi su imunoenzimski metoda ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) i *Western Blot*. Lijekovi za liječenje infekcije HIV su inhibitori reverzne transkriptaze, proteaze i integraze. Svi oni sprječavaju virus da se umnaža i na taj način usporavaju napredak bolesti. Brojna istraživanja pokazala su da je liječenje najučinkovitije kad se daje u kombinaciji barem dvaju lijekova jer se može više produžiti život nego kad se daje jedan lijek. Također, stabilizatori odnosno farmakokinetički pojačivači određene aktivne tvari doprinose boljem djelovanju lijeka na virus. Sva tri inhibitora mogu dovesti do nekoliko nuspojava kao što su povraćanje, proljev, mučnina i nelagoda u truhu, ali nema svaki od njih istu količinu i trajanje nuspojava.<sup>10,11</sup>

U liječenju HIV-1 infekcija koristi se HAART terapija koja se pokazala dosta učinkovita u kontroliranju napredovanja virusa tako da može smanjiti HIV infekciju na vrlo nisku razinu i tu razinu održavati duže vremena nego prijašnjim terapijama. Primjenom antivirusnih lijekova ciljano se želi poboljšati kvaliteta života bolesnika, a potom i produžiti životni vijek.<sup>12</sup>

## 2.2. Kromatografija

Metoda odjeljivanja sastojaka na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza, pokretne i nepokretne, naziva se kromatografija. Kromatografski sustav sastoji se od dvije faze, pokretne i nepokretne, te analiziranog uzorka. Nepokretna faza miruje u kromatografskoj koloni dok druga, pokretna, nosi uzorak preko nje. Sastojci smjese koji se odjeljuju nemaju jednaku pokretljivost u nepokretnoj fazi pa se iz kolone eluiraju jedan po jedan.<sup>13</sup>

Kromatografija se može koristiti u preparativne i analitičke svrhe. Preparativna kromatografija bavi se odjeljivanjem sastojaka iz smjese radi daljnje obrade te se može smatrati metodom pročišćavanja. U analitičkoj kromatografiji radi sa s malim uzorcima te se između ostalog pokušava odrediti relativni omjer sastojaka u smjesi.<sup>14</sup> Postoji više različitih vrsta kromatografije ovisno o obliku kromatografske podloge na kojoj se sastojci odjeljuju, o fizičkom stanju pokretne i nepokretne faze te o mehanizmu odjeljivanja.

Prema obliku kromatografske podloge, kromatografija se može podijeliti na kromatografiju na stupcu odnosno kolonsku kromatografiju i plošnu kromatografiju. Kad govorimo o fizičkom stanju pokretne i nepokretne faze, kromatografija može biti tekućinsko-tekućinska, tekućinsko-čvrsta, plinsko-tekućinska, i plinsko-čvrsta. Prema fizičkom stanju pokretne faze, može se podijeliti na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. U plinskoj kromatografiji pokretna faza je plin, u tekućinskoj tekućina, a u fluidnoj fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka. Sve tri kromatografije ubrajaju se u tehnike kolonske kromatografije, a tekućinska se može provoditi i na papiru, odnosno tankom sloju.<sup>15</sup>

Na temelju mehanizma odjeljivanja kromatografija se dijeli na adsorpcijsku, afinitetnu, ionsko-izmjenjivačku, razdjelnu i kromatografiju isključenjem (tablica 2.)

Tablica 2. Podjela kromatografije prema mehanizmu odjeljivanja

<b>Vrsta kromatografije</b>	<b>Mehanizam odjeljivanja</b>
<b>Adsorpcijska kromatografija</b>	Utemeljen na različitoj adsorpciji sastojaka uzorka na čvrstom nosaču
<b>Afinitetna kromatografija</b>	Utemeljen na posebnim biološkim interakcijama između analita i liganda na nepokretnoj fazi
<b>Ionsko-izmjenjivačka kromatografija</b>	Utemeljen na različitom afinitetu sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni
<b>Razdjelna kromatografija</b>	Utemeljen na različitoj topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi (plinska kromatografija) ili na različitoj topljivosti sastojaka uzorka u pokretnoj i nepokretnoj fazi (tekućinska kromatografija)
<b>Kromatografija isključenjem</b>	Utemeljen na različitoj veličini i/ili obliku molekula ili različitom naboju

### 2.2.1. Kromatografski parametri

Kromatografski parametri su važni u kromatografskoj analizi jer se njihovom optimizacijom postiže uspješnost kromatografskog razdvajanja. Razdvajanje sastojaka smjese fluidnom kromatografijom pri superkritičnim uvjetima ovisi o odabiru kolone, udjelu i vrsti modifikatora pokretne faze, sastavu pokretne faze, prirodi sastojka, protoku, volumenu injektiranja, temperaturi kolone i povratnom tlaku.

Kromatogram predstavlja grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o volumenu ili vremenu eluiranja. Položaj kromatografske krivulje ili pika daje informaciju za kvalitativnu, a visina odnosno površina pika za kvantitativnu analizu.<sup>16</sup> Pik na kromatogramu definira se širinom i vremenom zadržavanja. Širina pika mjeri se pri osnovici kromatografske krivulje  $w_b$  ili pri polovini visine  $w_h$ .

Važan parametar za kvalitativnu analizu je vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ). Definira se kao vrijeme potrebno sastojku da dođe do detektora nakon injektiranja u kolonu. Mrtvo vrijeme je vrijeme koje prođe od trenutka injektiranja tvari koja se ne veže na nepokretnu fazu do trenutka njezine detekcije. Uglavnom se koristi prilagođeno vrijeme zadržavanja koje se računa kao razlika vremena zadržavanja i mrtvog vremena (jednadžba 1).

$$t'_R = t_R - t_M \quad (1)$$

Faktor zadržavanja,  $k$ , predstavlja omjer vremena koje sastojak provede u nepokretnoj fazi i vremena koje provede u pokretnoj fazi, a računa se na temelju podataka očitanih iz kromatograma,  $t_R$  i  $t_M$  (jednadžba 2). Ukoliko je vrijednost faktora  $k$  od 1 do 20 utoliko je odjeljivanje sastojaka uspješno.<sup>17</sup>

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

Prema klasičnoj teoriji kromatografije uspješnost odjeljivanja sastojaka na koloni ovisi o postizanju ravnotežne raspodjele između pokretne i nepokretne faze dok pokretna faza nosi sastojak kroz kolonu. Broj teorijskih tavana,  $N$ , definiran kao broj postignutih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze (jednadžba 3) te visina tavana ( $H$ ) kvantitativno izražavaju djelotvornost kolone. Visina tavana predstavlja omjer dužine kolone ( $L$ ) i broja teorijskih tavana (jednadžba 4). Što su kromatografski pikovi širi u odnosu na vrijeme zadržavanja,

manja je djelotvornost kolone. Teorijski tavan je hipotetska veličina, pa je djelotvornost kolone to veća što je veći broj teorijskih tavana.

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

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

$$v_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (5)$$

Faktorom razdvajanja,  $\alpha$ , definirana je selektivnost kromatografske kolone i također se računa na temelju kromatografskih podataka,  $t_R$  i  $t_M$ . Što su vremena zadržavanja odjeljivanih sastojaka različitija, to je kolona selektivnija. Računa se prema jednadžbi:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (6)$$

Razlučivanje pikova,  $R_s$ , predstavlja mjeru za selektivnost i djelotvornost kolone.<sup>16,17</sup> Računa se prema jednadžbi:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (7)$$

Za uspješnu analizu važno je da su susjedni pikovi dobro razlučeni. Broj teorijskih tavana, faktor zadržavanja i faktor razdvajanja su povezani s razlučivanjem pikova prema jednadžbi:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (8)$$

### 2.3. Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima

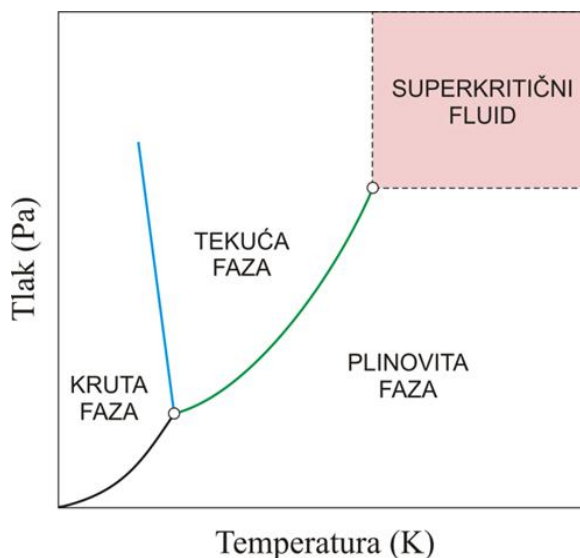
Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Chromatography, SFC*) je kromatografska tehnika slična HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) tehnici normalnih faza. Odjeljivanje se temelji na različitom afinitetu komponenata uzorka između pokretne i nepokretne faze što rezultira eluiranjem

sastojaka smjese u različitim vremenima. Razlika je u tome što se kao pokretna faza koristi fluid temperature i tlaka iznad svoje kritične točke. Primjenjuje se za razdvajanje i određivanje skupina spojeva koji se inače ne mogu odrediti niti plinskom niti tekućinskom kromatografijom. Plinska kromatografija se ne može upotrijebiti ako spojevi nisu hlapljivi ili su osjetljivi na povišenu temperaturu, a tekućinska ako nemaju kromofora prikladnih za UV-Vis detekciju.<sup>15, 18</sup>

### 2.3.1. Kromatografski sustav

Mogući fluidi korišteni kao pokretna faza u SFC i njihova svojstva prikazani su u tablici 3. Dušikov oksid ima dostupnu kritičnu točku, ali je jak oksidans i miješanjem s modifikatorom može izazvati eksploziju. Amonijak ima dobru moć otapanja, ali može dovesti do stvaranja krutine amonijevoga karbonata. Voda je lako dostupna i dobro je otapalo, ali je potrebna ogromna temperatura za postizanje superkritičnih uvjeta. Više je stvari uzrok tomu što se ugljikov(IV)oksid pokazao kao najbolja pokretna faza za SFC. Ugljikov(IV)oksid je jeftin, lako dostupan i inertan, nezapaljiv i netoksičan i kao takav može se miješati s velikim brojem organskih otapala. Njegova svojstva leže između tekućine i plina pri održavanju temperature i tlaka iznad njegove kritične točke. Kritična temperatura je temperatura iznad koje se plin više ne može ukapljiti bez obzira na to kakav tlak primijenili, a kritični tlak je minimalni tlak koji treba primijeniti da bi plin ukapljili pri kritičnoj temperaturi. Kritična temperatura i kritični tlak su karakteristike molekule, ne mogu se mijenjati. Za čisti ugljikov(IV)oksid, definirana kritična temperatura je 31 °C, a kritični tlak 74 bara. Fazni dijagram prikazan je na slici 2. Ugljikov(IV)oksid ima nisku viskoznost i površinsku napetost te slabu UV apsorbanciju na niskoj valnoj duljini. Polarnost je slična heksanu i time ga čini pogodnim za korištenje kao pokretnu fazu kod eluiranja nepolarnih spojeva. Čisti ugljikov(IV)oksid nije najbolji izbor kod analize polarnih spojeva i molekula velike molekulske mase jer može uzrokovati probleme s topljivošću.





Slika 2. Fazni dijagram

Tablica 3. Moguće pokretne faze u fluidnoj kromatografiji pri superkričnim uvjetima

Fluid	Kritična temperatura / °C	Kritični tlak / $10^6$ Pa	Gustoća / $\text{g cm}^{-3}$
CO <sub>2</sub>	31,3	7,39	0,468
N <sub>2</sub> O	36,5	7,27	0,457
NH <sub>3</sub>	132,5	11,4	0,235
Metanol	239,4	8,10	0,272
<i>n</i> -Butanol	152,0	3,80	0,228
Diklordifluorometan	11,8	4,12	0,558
Dietil-eter	195,6	3,64	0,265

Pokretnoj fazi dodaje se polarno organsko otapalo (2–40 %) kako bi se povećala topljivost analita. Postoji niz otapala s različitom snagom eluiranja kako bi se dobila različita vremena zadržavanja za pojedini analit i tako postigla selektivnost. Uporaba modifikatora daje i bolje kromatografske pikove. Najčešće korišteni su metanol, etanol, izopropanol i acetonitril. Kloroform i etil-acetat koriste se jako malo zbog štetnog utjecaja na okoliš. U brojnim analizama kao najbolji izbor za eluiranje polarnih spojeva pokazao se metanol jer je lako dostupan, jeftin, netoksičan i potpuno se miješa s ugljikovim(IV)oksidom u velikom rasponu temperatura i tlakova. Gradijent obično varira od 2–5 % do 30–40 % modifikatora. Količina dodanog modifikatora znatno utječe na kritičnu točku, pa je važno održavati povratni tlak

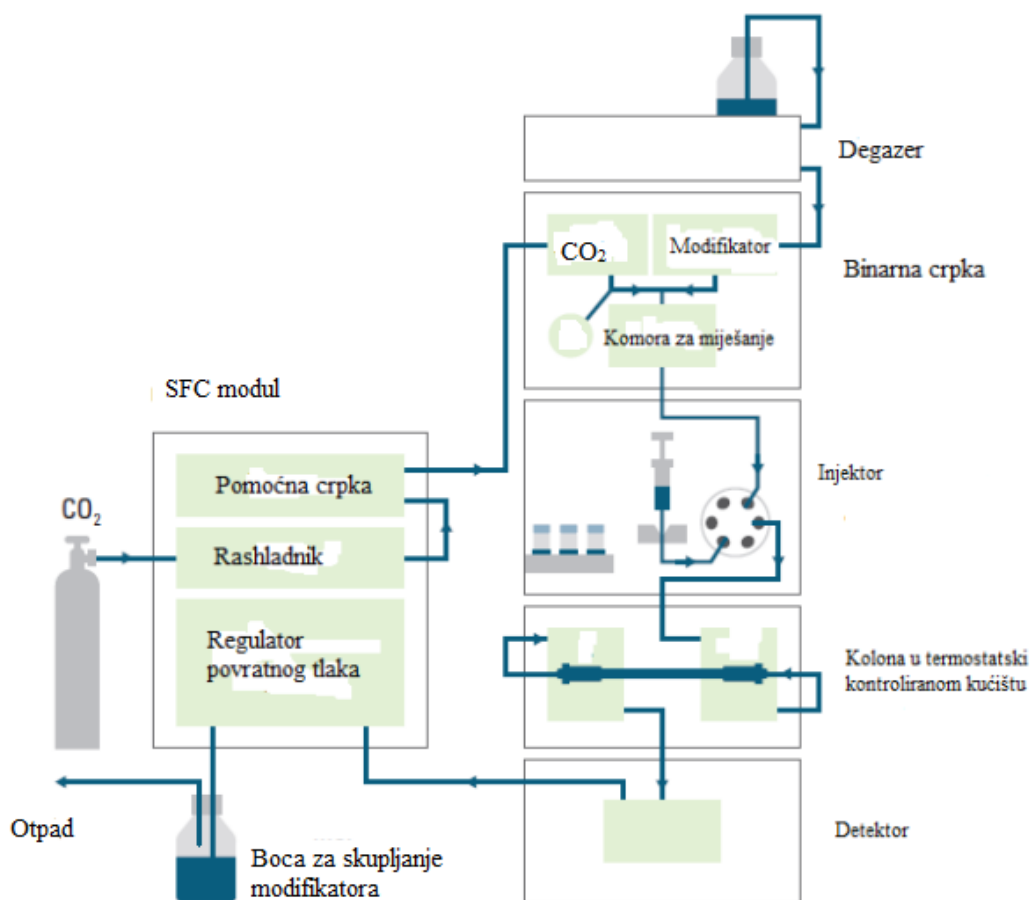
iznad kritične točke. Samo male promjene tlaka i temperature mogu uzrokovati drastične promjene gustoće pokretne faze, a time i varijacije u vremenu zadržavanja i rezoluciji.

Modifikator dodan u pokretnu fazu ponekad nije dovoljan za eluiranje jako polarnih i bazičnih smjesa pa se koriste aditivi. Dodaju se u rasponu koncentracija od 0,1 % do 2 % za organske modifikatore i do 10 % za vodu. Dietilamin i trietilamin dodaju se za poboljšanje eluiranja bazičnih spojeva, dok trifluorocena, octena i mravlja kiselina za bolje kromatografske pikove kiselih spojeva. Uzorci koji pokazuju kiselost svojstva ne zahtijevaju uvijek uporabu aditiva jer je ugljikov(IV)oksid dovoljno kiseo da eluira sve komponente uzorka.

Sve nepokretne faze razvijene za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti koriste se i u fluidnoj kromatografiji. Kao čvrsti nosač koristi se silikagel, aluminijski oksid i ionsko-izmjenjivačka smola. Najčešće korištene skupine nepokretnih faza su umrežene i kemijski vezane faze na površinu silikagela. To su uglavnom lančaste alkilne skupine C<sub>8</sub> i C<sub>18</sub>. Punjene kolone imaju punila ista kao i punila za HPLC kolone, a kapilarne kolone načinjene su na isti način kao i kolone za GC. Promjer punjenih kolona je 0,5 mm do 4,6 mm i dugačke su 25 cm, a promjer čestica punila je 3 μm do 10 μm. Kapilarne kolone napravljene su od taljenoga silicijevog dioksida i dugačke su 10 m do 20 m. Promjer im je 0,05 mm do 0,1 mm, a debljina filma je 0,05 μm do 1 μm. Punjene kolone koriste se za složene uzorke koji zahtijevaju odjeljivanje visoke učinkovitosti dok se kapilarne koriste za uzorke koji sadrže manje komponentata.

### 2.3.2. Instrumentacija

Većina dijelova instrumenta za SFC slična je dijelovima instrumenta za HPLC i GC. Uobičajeni dijelovi za kolonsku kromatografiju su: crpka, injektor za unošenje uzorka, kolona u termostatski kontroliranom kućištu, detektor te program za obradu podataka. Shema instrumenta za SFC prikazana je na slici 3. Dodatni i drugačiji dijelovi instrumentacije koje ima SFC kromatografski sustav su graničnik protoka, regulator povratnog tlaka te detektor s visokotlačnom protočnom ćelijom koja se koristi za rad pri visokim tlakovima.



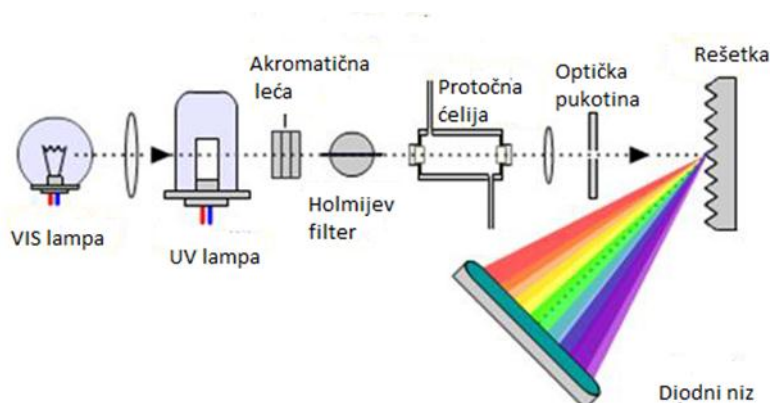
Slika 3. Shematski prikaz *Agilent* SFC sustava.

Ugljikov(IV)oksid se dovodi iz boce preko rashladnika u komoru za miješanje pomoćnom crpkom i tu se miješa s modifikatorom pomoću binarne crpke. Modifikator prije miješanja prolazi kroz degazer (otplinjač) kako bi se uklonio višak plinovitih čestica. Graničnik protoka ograničava protok pokretne faze, a uloga mu je održavanje tlaka u kromatografskoj koloni. Eluiranje može biti izokratno (sastav pokretne faze je stalan) i gradijentno (sastav pokretne

faze se mijenja tijekom analize). Injektor služi za unošenje uzorka u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu. Iz bočica za uzorke unosi se točno određeni volumen zadan programom.

Regulator povratnog tlaka (BPR, engl. *Back-Pressure Regulator*) koristi se za podešavanje tlaka u koloni pomoću pipca tako da se izlazni tlak kolone održava neovisno o protoku pokretne faze iz crpke, a mora biti veći od atmosferskog.<sup>19-22</sup>

Detektor mjeri promjenu fizikalnog ili kemijskog svojstva koju uzrokuje prolaz analita kroz mjerno-protočnu ćeliju detektora. Budući da je SFC kromatografska tehnika koja povezuje HPLC i GC tehnike mogu se koristiti i plinskokromatografski i tekućinskokromatografski detektori. Najčešće korišteni detektori su UV detektor, fluorescencijski detektor, plamenoionizacijski detektor (FID), dušik-fosfor detektor (NPD), detektor zahvata elektrona, IR spektrometar i spektrometar masa. Prilikom odabira detektora u obzir se uzima sastav pokretne faze, vrsta nepokretne faze i brzina protoka. UV-Vis detektori korišteni u SFC za razliku od onih u HPLC moraju podnijeti visoki tlak. U ovom eksperimentu korišten je detektor s nizom fotodioda (slika 4.) koji omogućava snimanje cijelog spektra analita. Snima u rasponu valnih duljina od 190 nm do 750 nm ili više. Uzorak se ozrači polikromatskim zračenjem koje dopire iz volframdeuterijske žarulje i dolazi na rešetku koja raspršuje svjetlost prema svakoj valnoj duljini. Svaka dioda mjeri intenzitet svjetla za određeni raspon valnih duljina ovisno o položaju diode u nizu. Konačno dobiveni spektar zasnovan je na Lambert-Beerovom zakonu. SFC sustavom upravlja se računalom gdje se mogu mijenjati i kontrolirati određeni parametri, a prikupljeni podatci dodatno se obrađuju.<sup>15,23</sup>



Slika 4. Dijelovi detektora s nizom fotodioda

## 2.4. Usporedba SFC s ostalim kolonskim kromatografijama i primjena

Vrijeme analize i ponovno uravnoteženje kolone u tehnici SFC smanjene su za faktor 3–5 u usporedbi s tehnikom HPLC. S porastom cijene organskih otapala i ekološke osviještenosti kojoj je cilj smanjiti količinu toksičnog otpada, SFC se koristi kao „zelena alternativa“ HPLC, bilo da se radi o kromatografiji normalnih ili obrnutih faza. SFC je puno osjetljivija tehnika, posjeduje niz prednosti, ali i nedostataka u odnosu na HPLC i GC navedenih u tablici 4.

Tablica 4. Prednosti i nedostaci SFC tehnike

Prednosti u odnosu na HPLC	Nedostaci u odnosu na HPLC
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Veća rezolucija i kapacitet</li> <li>• Manje otpadnih organskih otapala</li> <li>• Veća propusnost</li> <li>• Brža kalibracija</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ograničen izbor pokretne faze</li> <li>• Ograničena topljivost analita u pokretnoj fazi</li> <li>• Nepoželjne reakcije s pokretnom fazom</li> <li>• Neprikladna za analite topljive u vodi</li> </ul>
Prednosti u odnosu na GC	Nedostaci u odnosu na GC
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolja topljivost</li> <li>• Širi izbor uzoraka</li> <li>• Snaga pokretne faze može se kontrolirati dodatkom modifikatora</li> <li>• Pogodna za termički nestabilne spojeve</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ograničen izbor pokretne faze</li> <li>• Neželjene reakcije s pokretnom fazom</li> <li>• Složeniji sustav</li> <li>• Dodatak organskih modifikatora sprječava upotrebu detektora koji reagiraju na spojeve s ugljikom (npr. FID)</li> </ul>

Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima primjenjuje se u situacijama kada GC ili HPLC ne zadovoljavaju ili nisu potrebne. Koristi se u analizi parafina, odnosno za određivanje ugljikovodičnih lanaca formule  $C_nH_{2n+2}$ . Upotrebljava se za analizu ribljeg ulja gdje se analiziraju omega-3-masne kiseline koje su vrlo korisne za zdravlje. Također, u kombinaciji s tehnikom ekstrakcije fluidom uz superkrične uvjete upotrebljava se za kontrolu procesa u prehrambenoj industriji. Korisna je u analizi pesticida u uzorcima vode, kozmetičkoj industriji za analizu voskova koji sadrže estere s dugim ugljikovodičnim lancima, analizi površinski aktivnih tvari i eksploziva. Odjeljivanje kiralnih spojeva predstavlja dosta veliki problem u analitičkoj kemiji, ali SFC je u zadnje vrijeme široko prihvaćen za analizu ovakve vrste uzoraka. U farmaceutskoj industriji, jako je djelotvorna

tehnika u analizi visokopolarnih produkata te u praćenju razvoja lijeka gdje se analiziraju onečišćenja i razgradni produkti.<sup>24</sup>

## 2.5. Validacija analitičkih metoda

Razvijene analitičke metode trebaju biti validirane kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. Validacijom dokazujemo da razvijena metoda služi svrsi za koju smo je namijenili odnosno validacija je dokaz da razvijena metoda ispunjava određene uvjete. Validaciju analitičkih metoda zahtijevaju brojne državne regulatorne agencije i industrijski odbori. Najčešće korišteni postupci validacije analitičkih metoda propisuje Međunarodna organizacija za harmonizaciju (ICH, engl. *International Conference on Harmonization*)-poglavlje Q2 „Validacija analitičkih postupaka“ i Organizacija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) – „Analitičke procedure i validacija metoda za lijekove“. FDA zahtjeva da se tijekom validacije pokaže i dokumentira točnost, osjetljivost, specifičnost i ponovljivost analitičkih podataka. Slično zahtjeva i Europska agencija za medicinu (EMA, engl. *European Medicines Agency*) koja se u svojim smjernicama u potpunosti uskladila s prijedlozima ICH-a, međunarodnom inicijativom predstavnika regulatornih agencija i farmaceutske industrije Europe, SAD-a i Japana s ciljem osiguranja sigurnih, kvalitetnih i učinkovitih medicinskih proizvoda. Nadalje, dobra laboratorijska praksa (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP, 1976. FDA), dobra analitička praksa (engl. *Good Analytical Practice*, GAP), dobra proizvođačka praksa (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) i Međunarodna organizacija za harmonizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO) daju regulatorne zahtjeve po kojima su postupci validacije postali obveza.

Dogovoreni i literaturno najcitiraniji parametri validacije su:

1. linearnost, engl. *Linearity*
2. granica detekcije (LOD), engl. *Limit of detection*
3. granica kvantifikacije (LOQ), engl. *Limit of quantification*
4. preciznost, engl. *Precision*
  - ponovljivost, engl. *Repeatability*
  - međupreciznost, engl. *Intermediate precision*
  - obnovljivost, engl. *Reproducibility*
5. točnost, engl. *Accuracy*

6. specifičnost/selektivnost, engl. *Specificity/ Selectivity*

7. područje primjene, engl. *Range*

Kombinacijom navedenih parametara oblikuje se plan validacije ovisno o tome koji uzorak, odnosno analit imamo na raspolaganju i ovisno o primijenjenoj analitičkoj metodi.

### 2.5.1. Parametri validacije

Linearnost je parametar koji određuje područje primjene, a izražava mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određuje se mjerenjem odziva detektora za različite poznate koncentracije standarda. ICH zahtijeva uporabu najmanje pet koncentracijskih razina uz tri ponavljanja. Procjena linearnosti provodi se matematički i grafički. Matematička procjena uključuje linearnu regresiju koja se izražava jednadžbom pravca  $y = ax + b$ , gdje nagib pravca ( $a$ ) ukazuje na osjetljivost metode, a odsječak ( $b$ ) na sustavnu pogrešku. Računa se i koeficijent korelacije  $r^2$  koji predstavlja mjeru odstupanja od linearnosti. Najčešće se upotrebljavaju dva načina grafičkog prikaza; grafički prikaz odstupanja od regresijskog pravca prema koncentraciji ili logaritmu koncentracije.

Granica detekcije (LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. Određuje se mjerenjem omjera signala kromatografskog pika i šuma bazne linije, a prihvatljiv omjer je 2:1 ili 3:1. To se radi razrjeđivanjem otopine uzorka ili dodavanjem analita određene koncentracije u otopinu uzorka (engl. *spiked solution*). Također, može se odrediti i statistički preko računanja standardne devijacije signala i nagiba prema jednadžbi  $LOD = 3,3 \times \sigma / a$  pri čemu je  $a$  nagib, a  $\sigma$  standardna devijacija regresijskog pravca.

Granica kvantifikacije (LOQ) predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može kvantificirati uz određenu točnost i preciznost. Posebno ga je važno određivati kod kvantitativnih analiza kod kojih je razina koncentracije analita koji se određuje vrlo niska (npr. metode određivanja razgradnih produkata te metode određivanja onečišćenja što je cilj ovoga rada). Dopušteni omjer signala i šuma kod određivanja LOQ je 10:1. U nekim slučajevima, LOQ je otprilike dvostruko veća od LOD.

Preciznost predstavlja ponovljivost rezultata dobivenih nizom mjerenja iz istoga homogenog uzorka. Razlikujemo je u ovisnosti o uvjetima u kojima se provodi. Ponovljivost kao jedna od razina preciznosti određuje se uzastopnom analizom uzoraka uzetih od istoga

homogenog uzorka na istom instrumentu, a pripremao ih je isti analitičar. Međupreciznost predstavlja mogućnost metode da proizvodi pouzdane rezultate uz različite analitičare, instrumente, kolone i kemikalije. Određuje se unutar istog laboratorija. Obnovljivost rezultata je važna ako se metoda koristi u različitim laboratorijima jer čimbenici poput sobne temperature, vlage i opreme mogu na to utjecati. Kod određivanja ponovljivosti računa se standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) i interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

Točnost je parametar analitičke metode koji govori koliko se podudaraju stvarna, odnosno prihvaćena referentna vrijednost i srednja vrijednost rezultata dobivenih tijekom analize. Preporuča se koristiti tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode i provoditi analizu minimalno tri puta. Točnost se ispituje na cijelom radnom području metode, a provodi se na glavnoj aktivnoj tvari, u ovome radu Elvitegraviru te na dostupnim onečišćenjima ON1 i ON2.

Specifičnost predstavlja parametar kojim se pokazuje prikladnost određivanja analita u prisutnosti drugih komponenata uzorka koje mogu uključivati matricu uzorka, produkte degradacije ili nečistoće. U kromatografiji se odabirom optimalnih kolona, sastava pokretne faze, temperature kolone i uvjeta detekcije postiže specifičnost. Kromatografske tehnike poput SFC više se temelje na terminu selektivnosti nego specifičnosti. Također, IUPAC potiče korištenje termina selektivnosti i specifičnost definira kao krajnju selektivnost. Selektivnost daje mogućnost određivanja više komponenata istodobno, ali pod uvjetom da ne smetaju jedna drugoj. U praksi se određuje usporedbom kromatograma referentnog materijala i uzorka, a potrebno je dokumentirati i parametre koji određuju razlučivanje i simetriju pikova kako bi se dobili kvantitativni rezultati.<sup>25,26</sup>

Četiri najčešća analitička postupka kod validacija analitičkih metoda su:

1. identifikacijski testovi
2. kvantitativni testovi određivanja sadržaja onečišćenja
3. limit testovi za kontrolu onečišćenja
4. kvantitativni testovi određivanja sadržaja analita u uzorku.

Identifikacijski testovi potvrđuju identitet analita u uzorku, a to se obično postiže usporedbom svojstava uzorka (spektar, kromatografsko ponašanje, kemijska reaktivnost) i standarda. Limit testovi i kvantitativni testovi služe za određivanje onečišćenja u uzorcima i u konačnici daju informaciju o čistoći analiziranog uzorka. Kod ovih testova



određuju se validacijski parametri ovisno o primijenjenoj metodi. Kvantitativni testovi za određivanje sadržaja analita u uzorku uključuju metodu određivanja sadržaja i ujednačenosti sadržaja aktivnih tvari, metodu oslobađanja aktivnih tvari, metodu određivanja sadržaja konzervansa, te metodu određivanja sadržaja ostatnih otapala.<sup>26</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Popis polaznih materijala, kemikalija i opreme

Polazni materijali sintetizirani su u TAPI Pliva Hrvatska i kao takvi korišteni u svrhu analize. Tablica 5. prikazuje strukture Elvitegravira i njegova dva procesna onečišćenja, a popis korištenih kemikalija nalazi se u tablici 6.

Tablica 5. Popis i strukture spojeva korištenih za SFC analizu

IUPAC naziv	Kratica	Struktura	Proizvođač
6-brom-1-[(2S)-1-hidroksi-3-metilbutan-2-il]-7-metoksi-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilat	ON1		TAPI Pliva Hrvatska
6-brom-1-(1-[(tert-butildimetilsilil)oksi]-3-metilbutan-2-il)-7-metoksi-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilat	ON2		TAPI Pliva Hrvatska
6-[(2-fluorofenil-3-klor) metil]-1-[(2S)-1-hidroksi-3-metilbutan-2-il]-7-metoksi-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilna kiselina	ELV		TAPI Pliva Hrvatska

Tablica 6. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Proizvođač	CAS broj	Rok valjanosti	Čistoća
MeOH	J. T. Baker	1716402801	06/2019	HPLC grade
TEA	Sigma-Aldrich	121-44-8	09/2019	HPLC grade
TFA	Sigma-Aldrich	76-05-01	09/2019	HPLC grade

Korištena voda je ultravisoke čistoće (Mili-Q<sup>®</sup> Advantage A10, Merck).

Ostala oprema:

- kromatograf: *Agilent 1200 i 1260 Infinity SFC module*
- mikrovaga: *Mettler Toledo XP2U*
- analitička vaga: *Mettler Toledo XPE205*
- vorteks: *IKA Vortex Genius 3*
- ultrazvučna kupelj: *Bandelin Sonorex*

### 3.2. Priprema pokretnih faza i otapala

Kao pokretna faza A korišten je ugljikov(IV)oksid (CO<sub>2</sub>). Pokretna faza B pripremljena je kao smjesa metanola (MeOH), trifluoroctene kiseline (TFA) i trietilamina (TEA) u volumnom omjeru 200:1:1.

Korišteno otapalo za pripremu uzoraka za SFC analizu bilo je istog sastava kao pokretna faza B.

### 3.3. Priprema otopina za SFC analizu

Otopina Elvitegravira korištena za SFC analizu pripremljena je u masenoj koncentraciji 20 mg mL<sup>-1</sup>. Odvagano je 100 mg Elvitegravira u tikvicu od 5 mL na *Mettler Toledo XPE205* vagi i nadopunjeno do oznake. Nakon toga su pripremljene otopine dvaju onečišćenja Elvitegravira koncentracije 0,03 mg mL<sup>-1</sup> (ON1 i ON2). Na mikrovagi odvagano je 3 mg svakog onečišćenja u tikvicu od 100 mL i nadopunjeno do oznake. Nadalje, pripremljena je otopina za određivanje prihvatljivosti sustava koja je sadržavala 20 mg mL<sup>-1</sup> Elvitegravira i

0,03 mg mL<sup>-1</sup> svakoga pojedinoga onečišćenja. Sve navedene otopine promiješane su na vorteks mješalici *IKA Vortex Genius* i ultrazvučnoj kupelji *Bandelin Sonorex*.

Priprava otopina koje su korištene u validaciji metode navedena je u poglavlju 3.5 za svaki validacijski parametar pojedinačno.

### 3.4. Kromatografski parametri za SFC analizu

SFC analiza pripremljenih otopina provedena je na tri različite kolone.

- Lux Cellulose-3 dimenzija 250 × 4,6 mm sa submikronskim česticama 5 μm
- Agilent Zorbax Rx-Sil dimenzija 150 × 4,6 mm sa submikronskim česticama 5 μm
- Acquity UPLC BEH C18 dimenzija 2,1 × 100 mm sa submikronskim česticama 1,7 μm.

Kromatografski parametri modificirani tijekom analize su protok pokretne faze, udio pokretne faze B i vrijeme analize. U tim analizama korišteno je izokratno i gradijentno eluiranje. Od tablice 7. do tablice 10. navedeni su evaluirani kromatografski parametri provedenih analiza.

Tablica 7. Kromatografski parametri prvog eksperimenta SFC analize.

Kolona i punilo	Agilent Zorbax Rx-Sil dimenzija 4,6 × 150 mm sa submikronskim česticama 5 μm	
Pokretna faza A	CO <sub>2</sub>	
Pokretna faza B	MeOH, TFA, TEA	
Protok	1,5 mL min <sup>-1</sup>	
Tip eluiranja	izokratno	
Udio pokretne faze	% A	% B
	80	20
Vrijeme trajanja	10 min	
Temperatura BPR	60 °C	
Tlak BPR	140 bar	
Volumen injektiranja	5 μL	
Detektor	260 nm	
Temperatura kolone	40 °C	
Temperatura injektora za unošenje uzorka	15 °C	

Tablica 8. Kromatografski parametri drugog eksperimenta SFC analize.

Kolona i punilo	Acquity UPLC BEH C18 dimenzija 2,1 × 100 mm sa submikronskim česticama 1,7 μm		
Pokretna faza A	CO <sub>2</sub>		
Pokretna faza B	MeOH, TFA, TEA		
Protok	1 mL min <sup>-1</sup>		
Tip eluiranja	izokratno		
Udio pokretne faze	% A	% B	
	90	10	
Vrijeme trajanja	15 min		
Temperatura BPR	60 °C		
Tlak BPR	140 bar		
Volumen injektiranja	5 μL		
Detektor	260 nm		
Temperatura kolone	40 °C		
Temperatura injektora za unošenje uzorka	15 °C		

Tablica 9. Kromatografski parametri trećeg eksperimenta SFC analize.

Kolona i punilo	Lux Cellulose-3 dimenzija 250 × 4,6 mm sa submikronskim česticama 5 μm		
Pokretna faza A	CO <sub>2</sub>		
Pokretna faza B	MeOH, TFA, TEA		
Protok	3 mL min <sup>-1</sup>		
Tip eluiranja	gradijentno		
Gradijent	Vrijeme / min	% A	% B
	0	95	5
	2	95	5
	3	90	10
	4	90	10
	5	85	15
	6	85	15
	7	80	20
	8	80	20
	9	75	25
	10	75	25
	11	70	30
	12	70	30
	13	65	35
14	65	35	

Tablica 9. Kromatografski parametri trećeg eksperimenta SFC analize-nastavak

Gradijent	15	90	10
	16	90	10
Vrijeme trajanja	15 min		
Temperatura BPR	60 °C		
Tlak BPR	140 bar		
Volumen injektiranja	5 µL		
Detektor	260 nm		
Temperatura kolone	40 °C		
Temperatura injektora za unošenje uzorka	15 °C		

Tablica 10. Kromatografski parametri četvrtog eksperimenta SFC analize

Kolona i punilo	Lux Cellulose-3 dimenzija 250 × 4,6 mm sa submikronskim česticama 5µm	
Pokretna faza A	CO <sub>2</sub>	
Pokretna faza B	MeOH, TFA, TEA	
Protok	3 mL min <sup>-1</sup>	
Tip eluiranja	izokratno	
Udio pokretne faze	% A	% B
	85	15
Vrijeme trajanja	12 min	
Temperatura BPR	60 °C	
Tlak BPR	140 bar	
Volumen injektiranja	5 µL	
Detektor	260 nm	
Temperatura kolone	40 °C	
Temperatura injektora za unošenje uzorka	15 °C	

U tablici 10. prikazani su kromatografski parametri kojima je dobiveno zadovoljavajuće razdvajanje oba onečišćenja međusobno te razdvajanje oba onečišćenja od glavne aktivne tvari Elvitegravira.

### 3.5. Validacija metode za određivanje onečišćenja u aktivnoj farmaceutskoj tvari Elvitegraviru

#### 3.5.1. Specifičnost

Specifičnost metode određena je analizom pojedinačnih otopina Elvitegravira i onečišćenja Elvitegravira na razini specifikacijske granice (0,15 % testne koncentracije) te otopine za određivanje prihvatljivosti sustava. Pripremljene su dvije zasebne standardne otopine ON1 i ON2 masene koncentracije  $\gamma=0,03 \text{ mg mL}^{-1}$  te otopina Elvitegravira masene koncentracije  $\gamma=20 \text{ mg mL}^{-1}$  prema tablici 11. Tako pripremljena otopina Elvitegravira u masenoj koncentraciji  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  predstavljala je testnu koncentraciju.

Tablica 11. Priprema standardnih otopina onečišćenja ON1 i ON2

Standardne otopine	Odvaga / mg	Početni volumen / mL	Konačna masena koncentracija / $\text{mg mL}^{-1}$
ELV	100,21	5	20,04
ON1	3,160	100	0,03160
ON2	3,172	100	0,03172
Otopina za određivanje prihvatljivosti sustava	Odvaga / mg	Početni volumen / mL	Konačna masena koncentracija / $\text{mg mL}^{-1}$
ON1	3,0235	100	0,030235
ON2	3,0156		0,030156
ELV	200,24	10	20,02

#### 3.5.2. Granica kvantifikacije

Za ispitivanje granice kvantifikacije pripremljena je standardna otopina onečišćenja na razini 0,05 % testne koncentracije prema tablici 12. Otopina je injektirana šest puta.

Tablica 12. Priprema standardne otopine onečišćenja ON1 i ON2 za određivanje granice kvantifikacije

Standardne otopine	Odvaga /mg	Početni volumen / mL	Faktor razrjeđenja	Konačna masena koncentracija / $10^{-2} \text{mg mL}^{-1}$
ON1	2,9989	100	3,333	0,89967
ON2	3,1218			0,93654

## 3.5.3. Preciznost

Validacijski parametar preciznost čine ponovljivost sustava i ponovljivost metode.

Za ispitivanje ponovljivosti sustava pripremljene su standardne otopine onečišćenja ON1 i ON2 na tri koncentracijske razine 0,05 %, 0,15 % i 0,23 %, prikazane u tablici 13. i tablici 14. Svaka koncentracijska razina injektira se tri puta.

Tablica 13. Priprema otopina onečišćenja za ispitivanje ponovljivosti sustava ON1

Koncentracijska razina / %	Odvaga ON1 / mg	Početni volumen / mL	Faktor razrjeđenja	Konačna koncentracija/ $10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>
0,05	2,9989	100	3,333	0,8997
0,15	3,1850	100	/	3,1850
0,23	4,7720	100	/	4,7720

Tablica 14. Priprema otopina onečišćenja za ispitivanje ponovljivosti sustava ON2

Koncentracijska razina/ %	Odvaga ON2 / mg	Početni volumen / mL	Faktor razrjeđenja	Konačna koncentracija/ $10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>
0,05	3,1218	100	3,333	0,9365
0,15	3,1220	100	/	3,1220
0,23	4,8297	100	/	4,8297

Ponovljivost metode određuje se analizom šest otopina uzorka Elvitegravira masene koncentracije  $\gamma=20$  mg mL<sup>-1</sup>. Odvage su prikazane u tablici 16. i svaka je otopljena u 5 mL otopine onečišćenja ON1 i ON2. Budući da nije bio dostupan uzorak Elvitegravira koji bi sadržavao oba onečišćenja, otopine su pripremljene otapanjem uzorka Elvitegravira u otopini smjese onečišćenja masene koncentracije  $\gamma=0,03$  mg mL<sup>-1</sup> (eng. *spike solution*). Otopina koja je sadržavala oba onečišćenja prethodno je pripravljena prema tablici 15.



Tablica 15. Priprema standardne otopine onečišćenja za ispitivanje ponovljivosti metode

Naziv onečišćenja	Odvaga / mg	Volumen / mL	Konačna masena koncentracija / $10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>	Koncentracijska razina onečišćenja
ON1	3,185	100	3,185	0,15 %
ON2	3,132		3,132	0,15 %

Tablica 16. Priprema otopina uzorka Elvitegravira za ispitivanje ponovljivosti metode

Otopina	Odvaga Elvitegravira/ mg	Volumen standardne otopine onečišćenja / mL	Konačna masena koncentracija / mg mL <sup>-1</sup>
1	102,13	5	20,43
2	102,97	5	20,60
3	102,38	5	20,48
4	103,48	5	20,70
5	101,31	5	20,26
6	102,25	5	20,45

#### 3.5.4. Linearnost

Linearnost je određena na temelju injektiranja ukupno pet otopina na pet koncentracijskih razina. Pripravljene su tri standardne otopine onečišćenja iz kojih je pripremljeno ukupno 5 koncentracijskih razina:

1. L1-granica kvantifikacije ( $\gamma=0,010$  mg mL<sup>-1</sup>)
2. L2 ( $\gamma=0,020$  mg mL<sup>-1</sup>)
3. L3 ( $\gamma=0,030$  mg mL<sup>-1</sup>)
4. L4 ( $\gamma=0,040$  mg mL<sup>-1</sup>)
5. L5 ( $\gamma=0,045$  mg mL<sup>-1</sup>)

Otopine za određivanje linearnosti pripravljene su kako je opisano u tablici 17. i tablici 18. Otopina L2 dobivena je razrjeđenjem otopine L3, a otopina L4 razrjeđenjem otopine L5.

Tablica 17. Priprema otopine onečišćenja za određivanje linearnosti ON1

Otopina	Koncentracijska razina / %	Odvaga ON1 / mg	Početni volumen / mL	Faktor razrjeđenja	Konačna masena koncentracija/ $10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>
L1	0,05	2,9989	100	3,3333	0,8997
L2	0,10	/	/	1,4285	2,0998
L3	0,15	2,9997	100	/	2,9997
L4	0,18	/	/	1,25	3,8176
L5	0,23	4,7720	100	/	4,7720

Tablica 18. Priprema otopine onečišćenja za određivanje linearnosti ON2

Otopina	Koncentracijska razina / %	Odvaga ON2 / mg	Početni volumen / mL	Faktor razrjeđenja	Konačna masena koncentracija/ $10^{-2}$ mg mL <sup>-1</sup>
L1	0,05	3,1218	100	3,3333	0,9365
L2	0,10	/	/	1,4285	2,1854
L3	0,15	3,1220	100	/	3,1220
L4	0,18	/	/	1,25	3,8638
L5	0,23	4,8297	100	/	4,8297

## 3.5.5. Točnost

Validacijski parametar točnosti metode čine parametri odstupanje od linearnosti (engl. *deviation from linearity*) te analitički povrat (engl. *recovery*).

Odstupanje od linearnosti ispituje se na tri koncentracijske razine za svako onečišćenje (0,05 %, 0,15 % i 0,23 %). Otopine onečišćenja priređene su kako je opisano u tablici 19. i tablici 20.

Analitički povrat određuje se usporedbom odziva detektora za otopine poznatih koncentracija onečišćenja s odzivom detektora za otopine uzorka Elvitegravira otopljenog u otopini poznatih koncentracija onečišćenja. U tu svrhu pripravljene su standardne otopine onečišćenja na tri koncentracijske razine: 0,05 %, 0,15 % i 0,23 % kako je prikazano u tablici 21. i tablici 22. Svaka otopina injektirana je tri puta. Nakon toga u uzorak Elvitegravira dodaju se prethodno pripravljene standardne otopine onečišćenja (engl. *spike solution*). Svaka otopina injektirana je jedanput. Paralelno je pripravljena i otopina Elvitegravira masene koncentracije  $\gamma=20 \text{ mg mL}^{-1}$  (engl. *nonspiked solution*).

Tablica 19. Priprema otopina za određivanje odstupanja od linearnosti za ON1

Koncentracijska razina / %	Odvaga ON1 / mg	Početni volumen / mL	Faktor razrjeđenja	Konačna koncentracija / $10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$
0,05	2,9989	100	3,333	0,8997
0,15	3,1850	100	/	3,1850
0,23	4,7720	100	/	4,7720

Tablica 20. Priprema otopina za određivanje odstupanja od linearnosti za ON2

Koncentracijska razina / %	Odvaga ON1 / mg	Početni volumen / mL	Faktor razrjeđenja	Konačna koncentracija / $10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$
0,05	3,1218	100	3,333	0,9365
0,15	3,1220	100	/	3,1220
0,23	4,8297	100	/	4,8297

Tablica 21. Priprema otopina za određivanje analitičkog povrata za onečišćenje ON1

<b>Koncentracijska razina / %</b>	<b>Odvaga ON1 / mg</b>	<b>Ukupni volumen / mL</b>	<b>Konačna koncentracija / <math>10^{-2}</math> mg mL<sup>-1</sup></b>
0,05	1,0048	100	1,0048
0,15	2,9982	100	2,9928
0,23	4,7546	100	4,7546

Tablica 22. Priprema otopina za određivanje analitičkog povrata za onečišćenje ON2

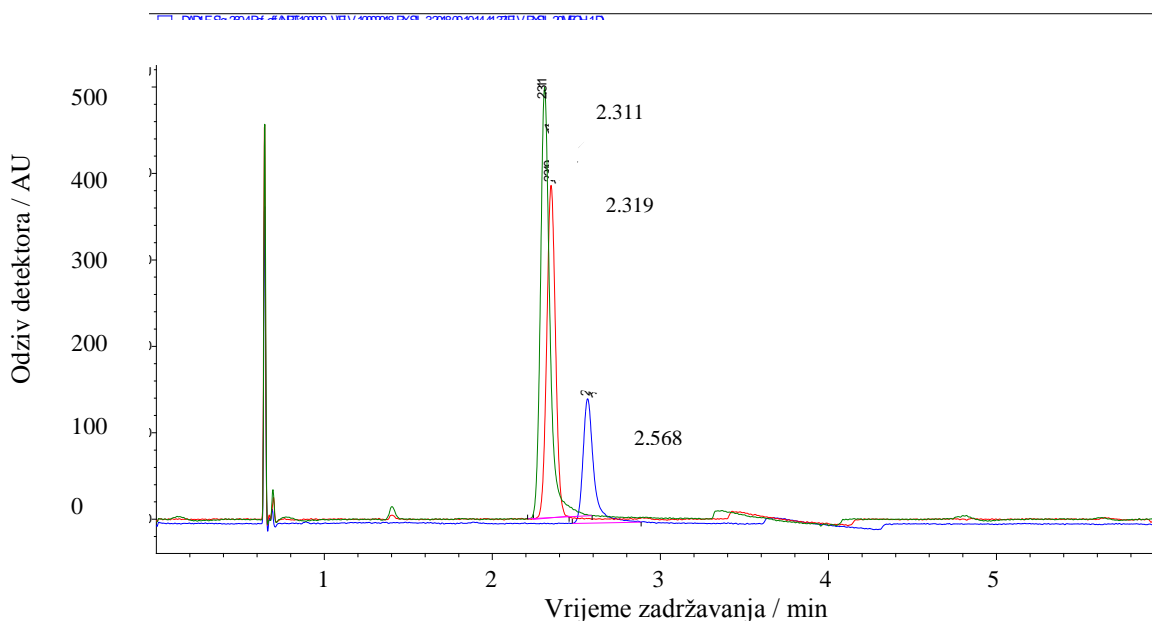
<b>Koncentracijska razina / %</b>	<b>Odvaga ON2 / mg</b>	<b>Ukupni volumen / mL</b>	<b>Konačna koncentracija / <math>10^{-2}</math> mg mL<sup>-1</sup></b>
0,05	1,0362	100	1,0362
0,15	2,9525	100	2,9525
0,23	4,6292	100	4,6292

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

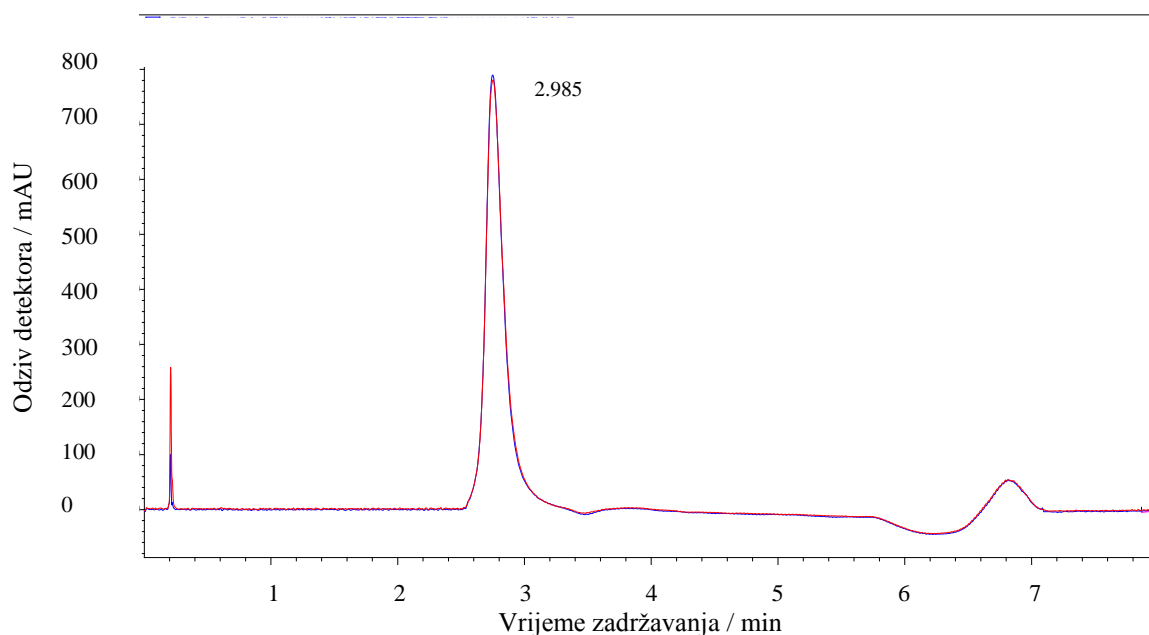
### 4.1. Rezultati SFC analize

Provedene su SFC analize Elvitegravira i onečišćenja ON1 i ON2 na tri različite kolone. Na temelju kromatograma dobivenih eksperimentima prikazanim u tablicama 7. do 10. najprikladnije odjeljivanje Elvitegravira i spomenutih onečišćenja te najbolji kromatografski pikovi postignuti su na koloni Lux Cellulose-3 dimenzija  $250 \times 4,6$  mm sa submikronskim česticama  $5 \mu\text{m}$  korištenjem parametara prikazanih u tablici 10.

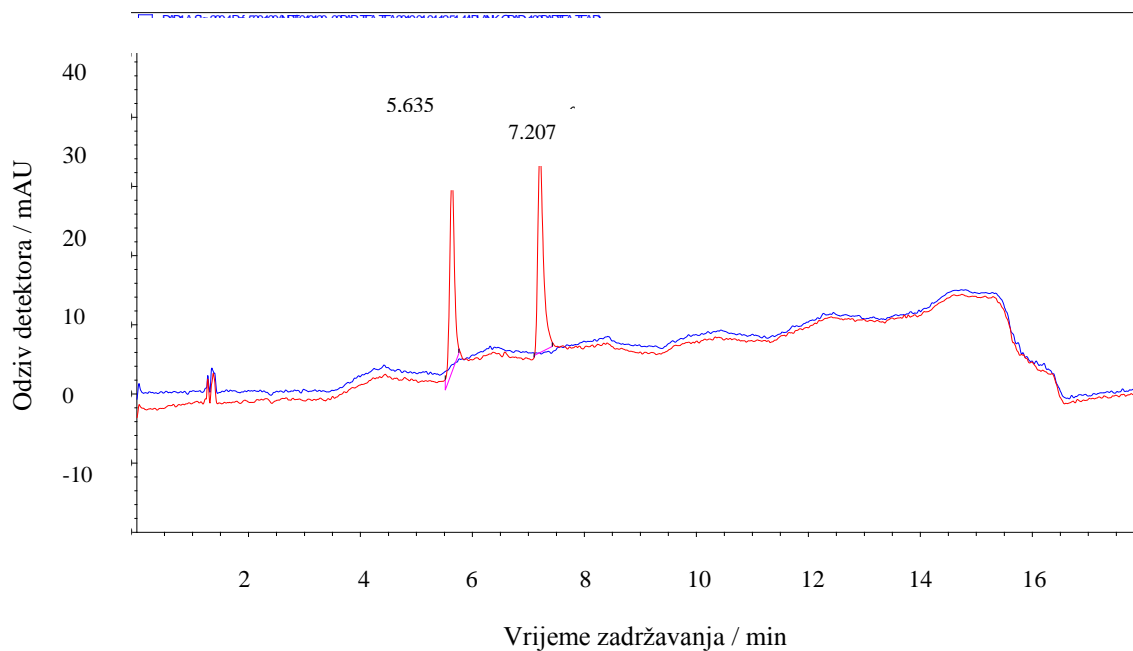
Korištenjem ostale dvije kolone vidljive su loše bazne linije, preklapanje kromatografskih pikova onečišćenja ON1 i ON2, preklapanje kromatografskog pika Elvitegravira i bazne linije te izostanak pikova.



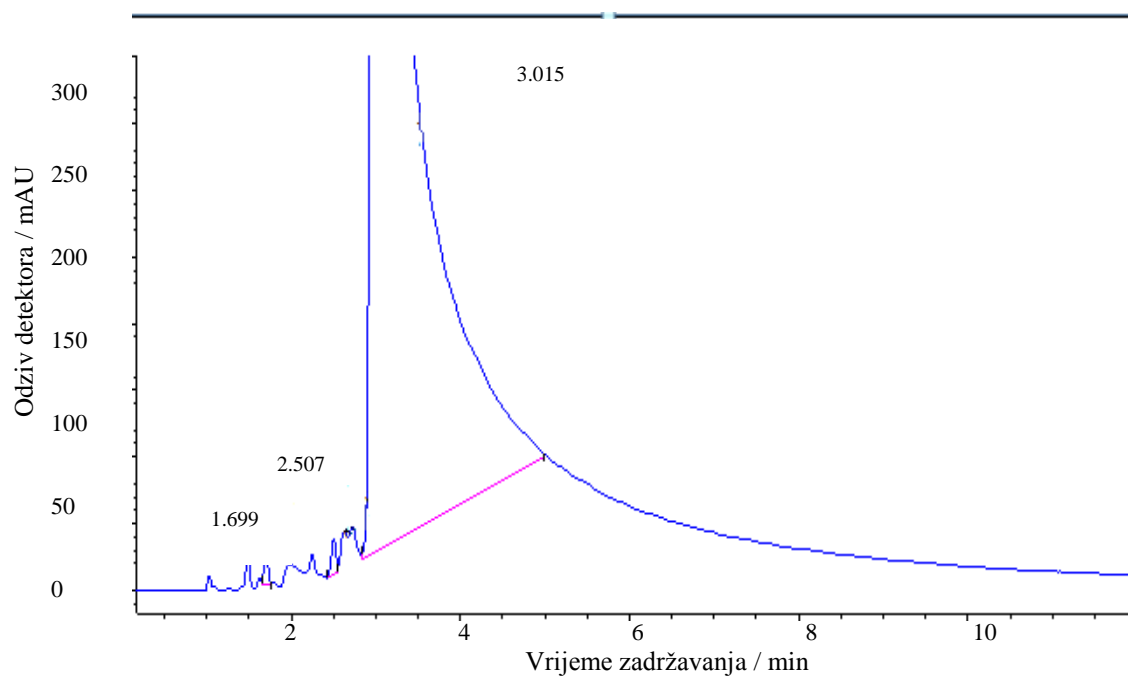
Slika 5. Kromatogram Elvitegravira ( $t_R=2,568$  min) i onečišćenja na koloni Agilent Zorbax Rx-Sil dimenzija  $4,6 \times 150$  mm sa submikronskim česticama  $5 \mu\text{m}$  - preklapanje kromatografskog pika ON1 ( $t_R=2,319$  min) i ON2 ( $t_R=2,311$  min)



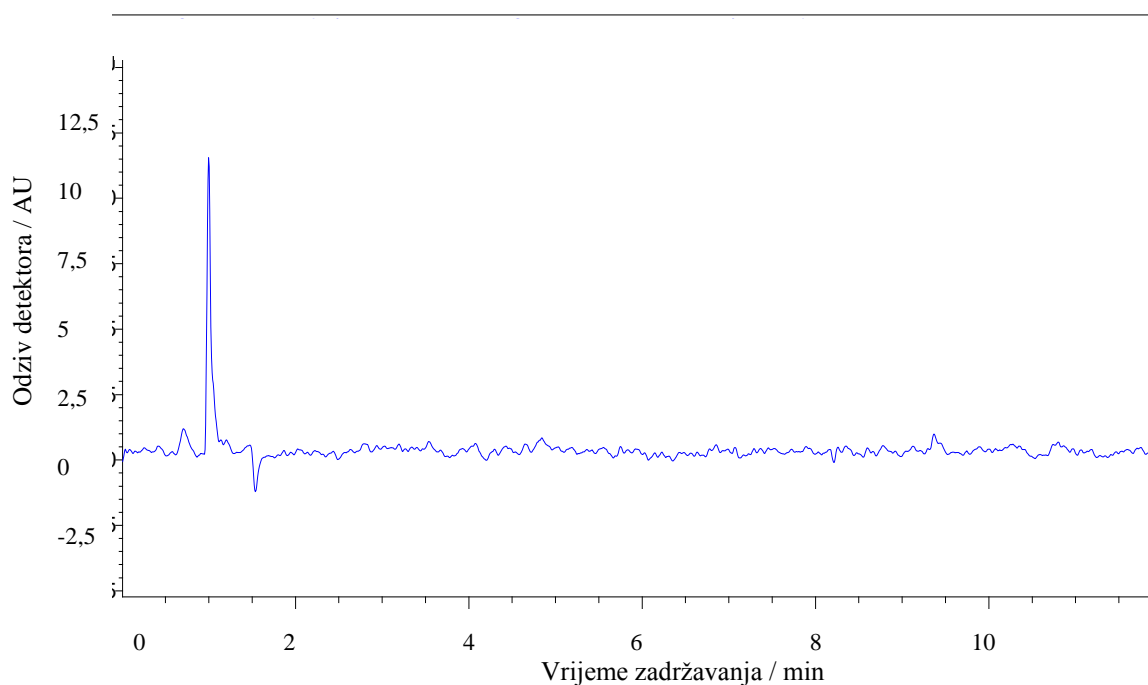
Slika 6. Kromatogram Elvitegravira i onečišćenja na koloni Acquity UPLC BEH C18 dimenzija  $2,1 \times 100$  nm sa submikronskim česticama  $1,7 \mu\text{m}$  - preklapanje kromatografskog pika Elvitegravira ( $t_R=2,985$  min) i bazne linije



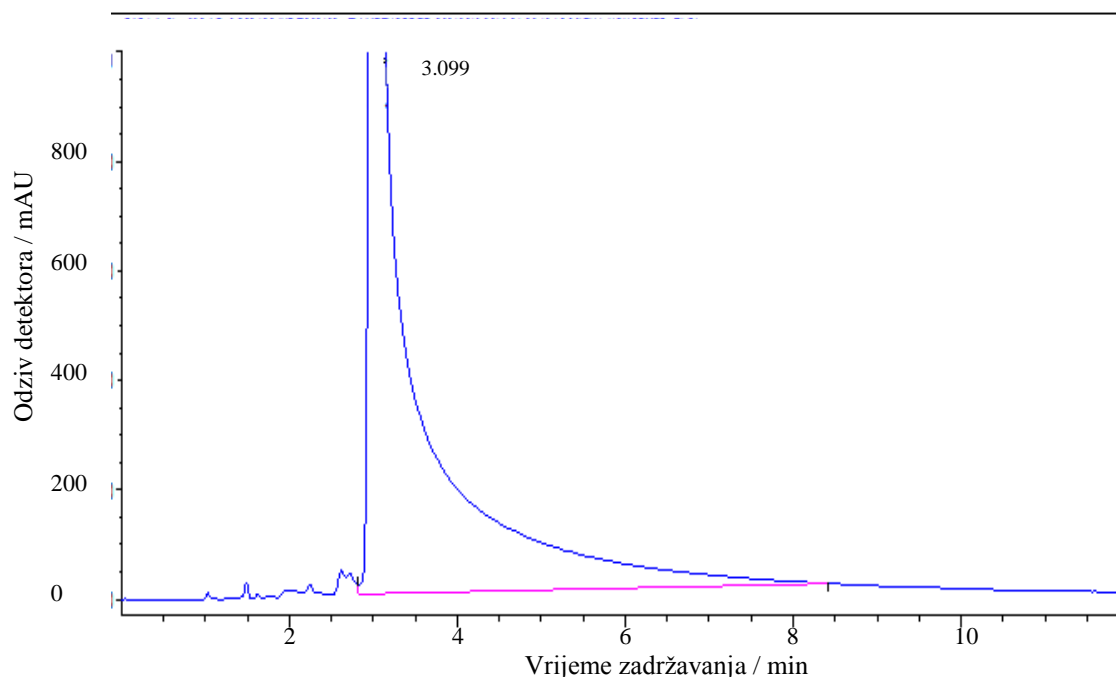
Slika 7. Kromatogram Elvitegravira i onečišćenja na koloni Lux Cellulose-3 dimenzija  $250 \times 4,6$  mm sa submikronskim česticama  $5 \mu\text{m}$  - izostanak kromatografskog pika Elvitegravira



Slika 8. Kromatogram Elvitegravira ( $t_R=3,015$  min) i onečišćenja na koloni Lux Cellulose-3 dimenzija  $250 \times 4,6$  mm sa submikronskim česticama  $5 \mu\text{m}$  prema razvijenoj metodi tipom izokratnog eluiranja (ON:  $t_R=2,507$  min; ON2:  $t_R=1,699$  min)



Slika 9. Kromatogram bazne linije prema razvijenoj metodi na koloni Lux Cellulose-3 dimenzija  $250 \times 4,6$  mm sa submikronskim česticama  $5 \mu\text{m}$



Slika 10. Kromatogram glavne tvari Elvitegravira ( $t_R=3,099$  min) prema razvijenoj metodi na koloni Lux Cellulose-3 dimenzija  $250 \times 4,6$  mm sa submikronskim česticama  $5 \mu\text{m}$

#### 4.2. Validacija metode

Validacijski parametri ispituju se grafički ili matematički. U tablici 23. prikazani su kriteriji prihvatljivosti za određivanje validacijskih parametara prema ICH.

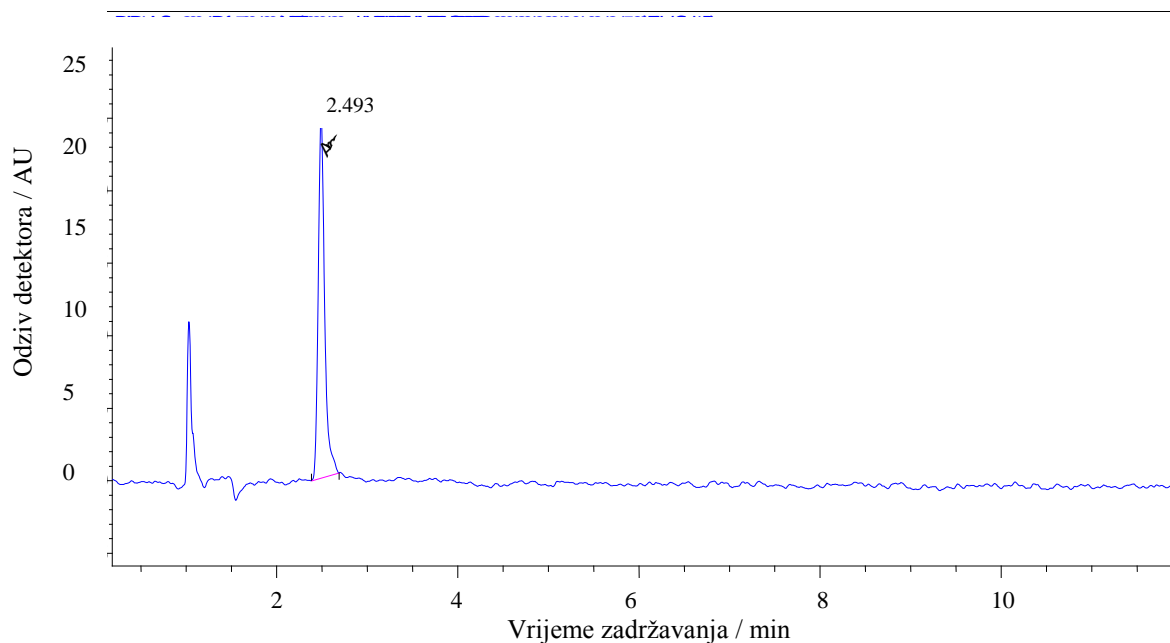
Tablica 23. Kriteriji prihvatljivosti za određivanje validacijskih parametara

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
<b>Linearnost</b>	
Koeficijent korelacije	$\geq 0,990$
Vrijednost odsječka u odnosu na izračunatu površinu testne koncentracije	$\leq 10 \%$
<b>Granica kvantifikacije</b>	
S/N	$\geq 10$
RSD površina svih 6 injektiranja	$\leq 20 \%$
<b>Točnost</b>	
Analitički povrat	70-150 %
RSD	$\leq 10 \%$
<b>Ponovljivost</b>	
RSD	$\leq 20 \%$

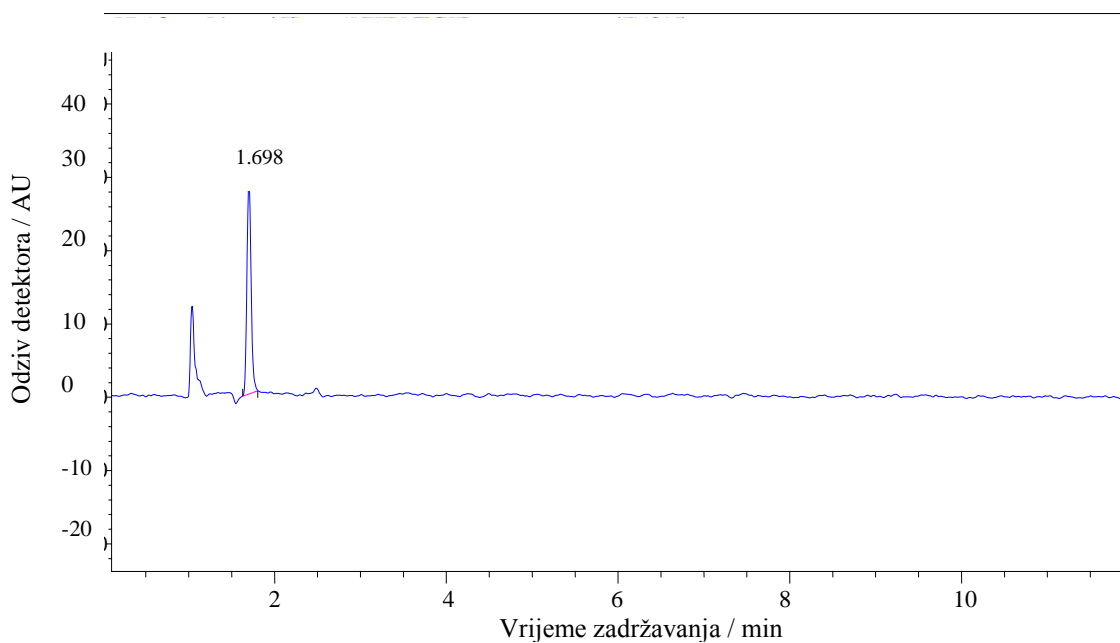


#### 4.2.1. Specifičnost

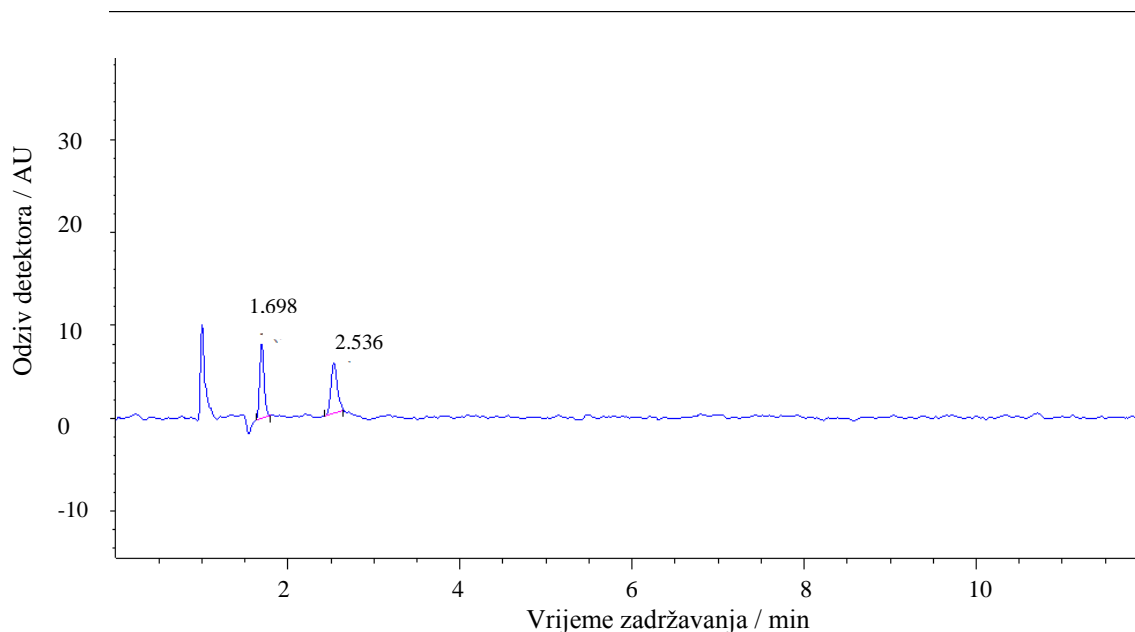
Specifičnost je parametar koji potvrđuje da razvijenom metodom možemo odrediti i razlikovati jedno onečišćenje od drugog onečišćenja i glavne tvari. Utvrđen je usporedbom snimljenih kromatograma standardnih otopina onečišćenja ON1 i ON2 zasebno s kromatogramom standardne otopine ON1 i ON2.



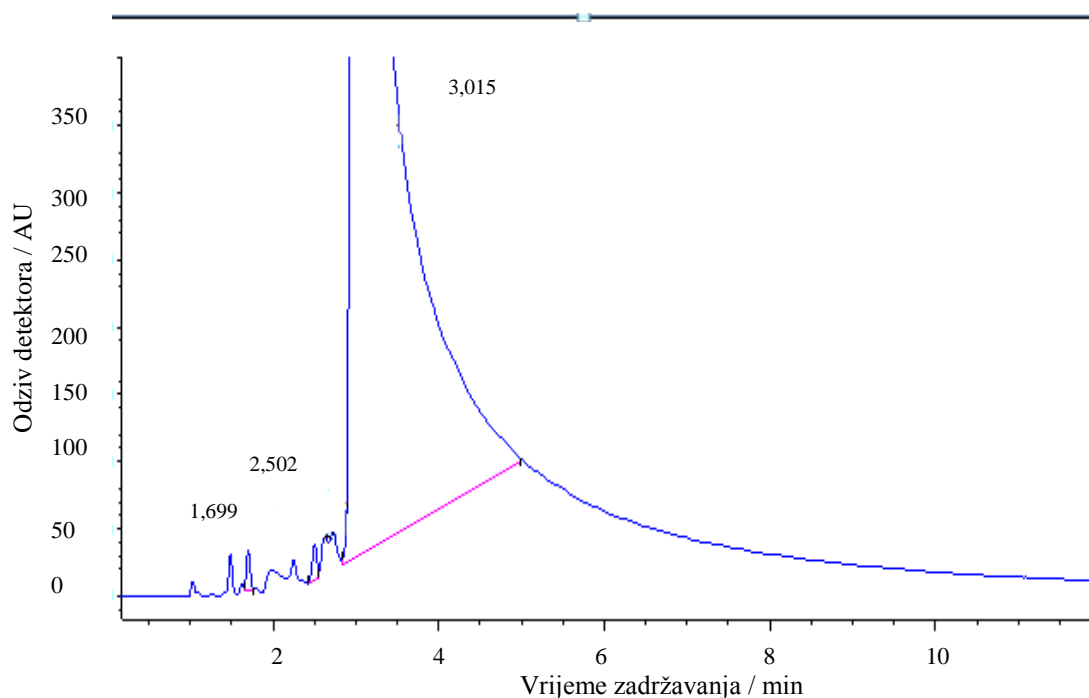
Slika 11. Kromatogram standardne otopine onečišćenja ON1



Slika 12. Kromatogram standardne otopine onečišćenja ON2



Slika 13. Kromatogram standardne otopine onečišćenja ON1 i ON2



Slika 14. Kromatogram otopine Elvitegravira u koji je dodana standardna otopina onečišćenja ON1 i ON2

#### 4.2.2. Granica kvantifikacije

Kako bi se ispitala najniža koncentracija analita koja se može kvantificirati pripremljene su standardne otopine onečišćenja ON1 i ON2 u vrlo niskoj koncentraciji. Svaka otopina je injektirana šest puta. Otopina onečišćenja ON1 pripremljena na koncentracijskoj razini 0,05 % rezultirala je omjerom signala kromatografskog pika i šuma bazne linije od minimalno 12

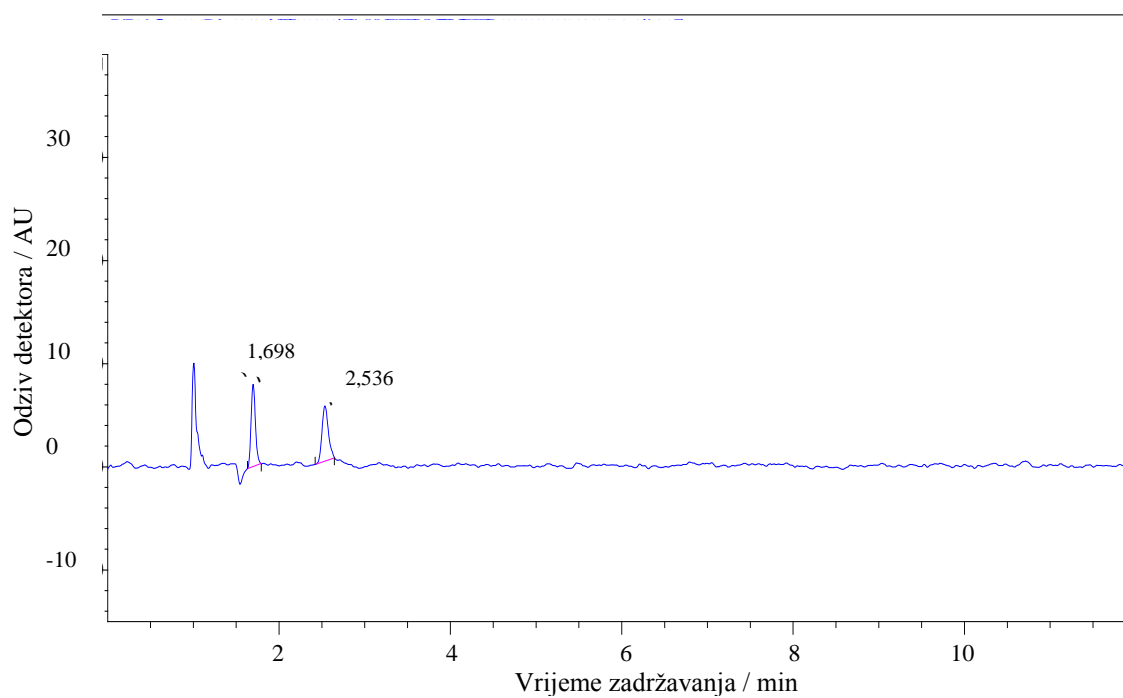
dok je otopina onečišćenja ON2 također pripravljena na koncentracijskoj razini 0,05 % rezultirala omjerom signala kromatografskog pika i šuma bazne linije od minimalno 13. Na temelju tog omjera i drugi sastojci prisutni u uzorku mogu se kvantitativno odrediti koristeći opisanu metodu. Granica kvantifikacije dodatno se potvrđuje validacijom parametara točnosti i linearnosti.

Tablica 24. Omjer signala kromatografskog pika i šuma bazne linije za određivanje granice kvantifikacije onečišćenja ON1

Broj injektiranja	Vrijednost površine ON1	S/N
1	28,02402	14
2	27,44103	12
3	29,03567	13
4	25,55023	18
5	26,62360	13
6	27,13322	17
<b>Srednja vrijednost</b>	27,80	14
<b>RSD površine / %</b>	3,3	/

Tablica 25. Omjer signala kromatografskog pika i šuma bazne linije za određivanje granice kvantifikacije onečišćenja ON2

Broj injektiranja	Vrijednost površine ON2	S/N
1	28,79023	20
2	28,22852	18
3	26,07594	13
4	25,39916	24
5	27,64178	19
6	27,64261	24
<b>Srednja vrijednost</b>	27,30	19
<b>RSD površine / %</b>	4,8	/



Slika 15. Kromatogram standardne otopine onečišćenja ON1 i ON2 za određivanje granice kvantifikacije (koncentracijska razina 0,05 %)

## 4.2.3. Preciznost

Ponovljivost sustava određena je analizom standardnih otopina onečišćenja pripremljenih na tri koncentracijske razine kako je prikazano u tablici 13. i tablici 14. Svaka otopina je injektirana tri puta. Očitane su površine ispod kromatografskog pika svakog onečišćenja te izračunata srednja vrijednost i relativno standardno odstupanje (RSD) površine. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 26. i tablici 27.

Tablica 26. Određivanje ponovljivosti sustava za analizu standardnih otopina onečišćenja ON1

Koncentracijska razina/ %	Broj injektiranja	Vrijednost površine ON1	Srednja vrijednost površine ON1	RSD površine ON1, %
0,05	1	28,02402	28,17	2,9
	2	27,44103		
	3	29,03567		
0,15	1	104,26159	105,87	3,5
	2	103,21146		
	3	110,12261		
0,23	1	163,64085	163,73	0,9
	2	162,35757		
	3	165,20113		

Tablica 27. Određivanje ponovljivost sustava za analizu standardnih otopina onečišćenja ON2

Koncentracijska razina/ %	Broj injektiranja	Vrijednost površine ON2	Srednja vrijednost površine ON2	RSD površine ON2, %
0,05	1	28,79023	27,70	5,2
	2	28,22852		
	3	26,07594		
0,15	1	87,96941	89,83	2,6
	2	89,0530		
	3	92,47467		
0,23	1	148,91757	146,55	3,9
	2	150,67189		
	3	140,07481		

Dobivene vrijednosti relativnoga standardnog odstupanja površine za tri injektiranja onečišćenja ON1 i ON2 zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti (RSD površine  $\leq 10\%$ ) što ukazuje na to da je SFC metoda precizna.

U svrhu ponovljivosti metode analizirano je šest otopina uzorka ELV u koji su dodana onečišćenja ON1 i ON2 na koncentracijskoj razini 0,15 %. U tablici 28. prikazani su dobiveni rezultati.

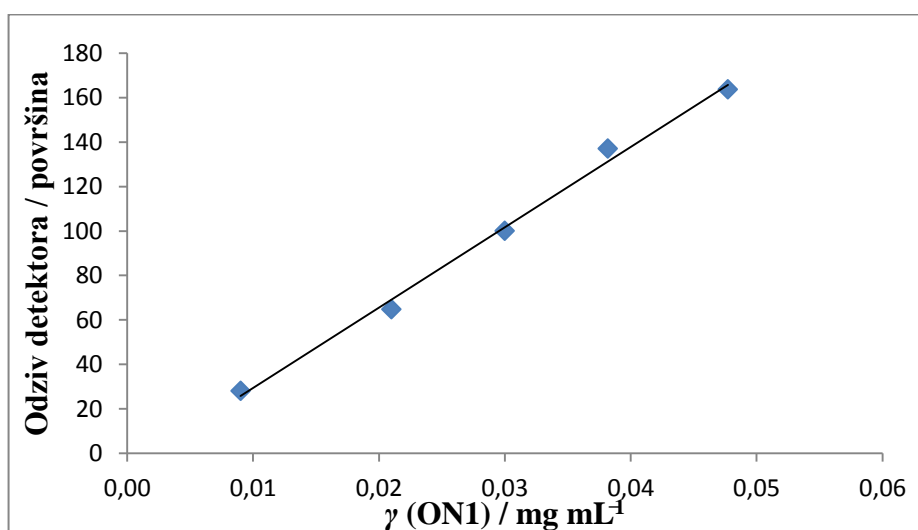
Tablica 28. Određivanje ponovljivosti metode za analizu otopine Elvitegravira.

Uzorak Elvitegravira	Postotak ON1 / %	Postotak ON2 / %
1	0,148	0,156
2	0,161	0,163
3	0,167	0,160
4	0,158	0,153
5	0,160	0,159
6	0,164	0,161
<b>Srednja vrijednost / %</b>	0,160	0,160
<b>RSD / %</b>	3,95	2,58

Iz dobivenih rezultata uočava se da je relativno standardno odstupanje (RSD) u granicama prihvatljivosti. Na temelju tog rezultata zaključujemo da je metoda za određivanje onečišćenja u uzorku Elvitegravira ponovljiva.

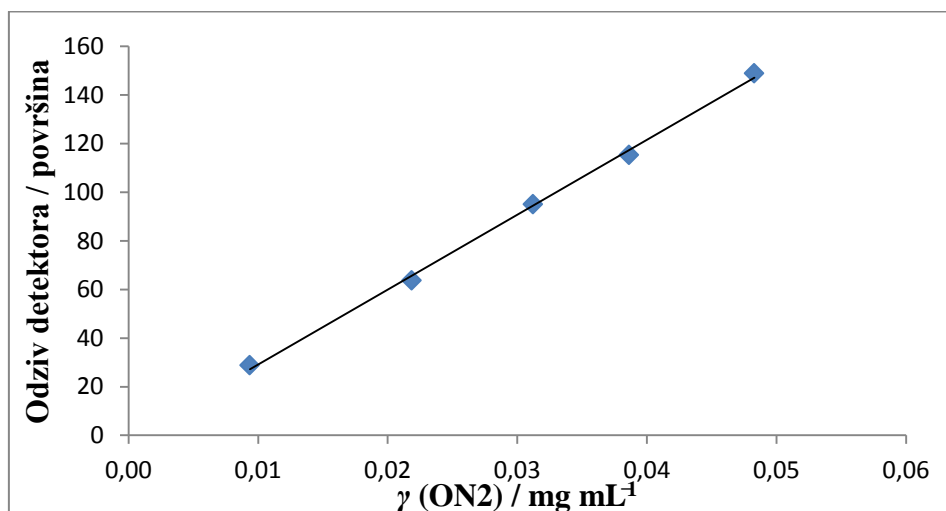
#### 4.2.4. Linearnost

Linearnost metode određena je na pet koncentracijskih razina. Ishodne otopine su tri standardne otopine onečišćenja ON1 i ON2 koje su pripravljene i dalje razrjeđivane kako je opisano u tablicama 17. i 18. Svaka standardna otopina analizirana je i očitane su površine ispod kromatografskog pika. Rezultati su prikazani grafički, a iz baždarnog dijagrama su određeni nagib pravca  $a$ , odsječak  $b$  i koeficijent linearne regresije  $R^2$ .



Slika 16. Linearnost odziva detektora za određivanje ON1 pri 260 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca s nagibom pravca  $a = 3616,6$  i odsječkom  $b = -6,8$ . Metoda je linearna u zadanom području od 0,05 % do 0,23 % testne koncentracije uz koeficijent linearne regresije od 0,9946.



Slika 17. Linearnost odziva detektora za određivanje ON2 pri 260 nm

Iz baždarnog dijagrama određena je jednadžba pravca s nagibom pravca,  $a = 3079,9$  i odsječkom  $b = -1,7$ . Metoda je linearna u zadanom području od 0,05 % do 0,23 % testne koncentracije uz koeficijent linearne regresije od 0,9984.

Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da je metoda linearna za određivanje onečišćenja u rasponu koncentracijskih razina od 0,05 % do 0,23 %. S obzirom na to da je u navedenom koncentracijskom području uočena linearna ovisnost odziva detektora o masenoj koncentraciji dovoljna je priprema standardne otopine na jednoj koncentracijskoj razini.

#### 4.2.5. Točnost

Točnost metode za određivanje onečišćenja ON1 i ON2 određena je na otopinama pripremljenim na tri koncentracijske razine. Svaka otopina injektirana je tri puta. Rezultati za točnost metode određeni kao odstupanje od linearnosti za određivanje onečišćenja prikazani su u tablicama 29. i 30.

Tablica 29. Određivanje točnosti metode na tri koncentracijske razine za onečišćenje ON1

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Vrijednost površine ON1	Srednja vrijednost površine ON1	RSD / %	Točnost, %	Srednja vrijednost točnosti / %
0,05	1	28,02402	28,17	2,9	107,10	107,5
	2	27,44103			105,31	
	3	29,03567			110,21	
0,15	1	104,26159	105,87	3,5	96,44	97,8
	2	103,21146			95,53	
	3	110,12261			101,53	
0,23	1	163,64085	163,73	0,9	98,77	98,8
	2	162,35757			98,03	
	3	165,20113			99,68	

Tablica 30. Određivanje točnosti metode na tri koncentracijske razine za onečišćenje ON2

Koncentracijska razina / %	Injektiranje	Vrijednost površine ON2	Srednja vrijednost površine ON2	RSD / %	Točnost, %	Srednja vrijednost točnosti / %
0,05	1	28,79023	27,70	5,2	105,55	101,8
	2	28,22852			103,60	
	3	26,07594			96,14	
0,15	1	87,96941	89,83	2,6	93,21	95,1
	2	89,05300			94,33	
	3	92,47467			97,89	
0,23	1	148,91757	146,55	3,9	101,22	99,6
	2	150,67189			102,40	
	3	140,07481			95,28	



Analitički povrat određen je dodavanjem standardnih otopina onečišćenja u otopinu uzorka Elvitegravira na tri koncentracijske razine: 0,05 %, 0,15 % i 0,23 %. Tablica 31. prikazuje rezultate određivanja točnosti metode određivanjem analitičkog povrata onečišćenja na prethodno navedene tri koncentracijske razine.

Tablica 31. Analitički povrati onečišćenja ON1 i ON2 određeni na tri koncentracijske razine

Otopine onečišćenja	Površina standardne otopine onečišćenja	Srednja vrijednost površine standardne otopine onečišćenja	Površine ON u otopini uzorka ELV + standardna otopina onečišćenja	Srednja vrijednost površine u otopini uzorka ELV + standardna otopina onečišćenja	Srednja vrijednost analitičkog povrata / %
<b>Koncentracijska razina 0,05 %</b>					
ON1	36,89281	35,56	35,13211	34,50	97,0
	34,38488		33,77029		
	35,41070		34,58384		
ON2	33,24277	32,52	36,47635	35,79	110,1
	33,13653		35,09956		
	31,16799		35,79433		
<b>Koncentracijska razina 0,15 %</b>					
ON1	116,63025	116,65	117,27477	117,50	100,7
	120,54436		117,47610		
	112,77867		117,76286		
ON2	94,89235	93,12	105,38364	104,28	112,0
	92,85899		103,45895		
	91,59830		103,99340		
<b>Koncentracijska razina 0,23 %</b>					
ON1	180,42386	181,01	188,50623	187,87	103,8
	178,01102		185,94496		
	184,01102		189,15138		
ON2	147,19141	149,94	158,52969	158,00	105,4
	152,14583		158,01651		
	150,49342		157,44191		

### 4.3. Sažetak rezultata validacije metode

Tijekom provođenja validacije metode svi određeni validacijski parametri zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti prema propisanim pravilima ICH, a sažeto su prikazani u tablici 32.

Tablica 32. Sažetak parametara i rezultata validacije metode za određivanje onečišćenja ON1 i ON2

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti	Rezultati		Zadovoljava kriterij - (DA / NE)	
		ON1	ON2		
<b>Linearnost</b>					
Koeficijent linearne regresije	$\geq 0,990$	0,9946	0,9984	<b>DA</b>	
Vrijednost odsječka u odnosu na izračunatu površinu testne koncentracije	$\leq 10,0\%$	6,7 %	1,8 %	<b>DA</b>	
<b>Granica kvantifikacije</b>					
S/N	$\geq 10$	12	13	<b>DA</b>	
RSD površine	$\leq 20\%$	3,3 %	4,8 %	<b>DA</b>	
<b>Točnost</b>					
Analitički povrat	0,05 %	70-150 %	97,0 %	110,1 %	<b>DA</b>
	0,15 %		100,7 %	112,0 %	<b>DA</b>
	0,23 %		103,8 %	105,4 %	<b>DA</b>
RSD	0,05 %	$\leq 10\%$	2,9 %	5,2 %	<b>DA</b>
	0,15 %		3,5 %	2,6 %	<b>DA</b>
	0,23 %		0,9 %	3,9 %	<b>DA</b>
<b>Ponovljivost</b>					
RSD	0,05 %	$\leq 20\%$	2,9 %	5,2 %	<b>DA</b>
	0,15 %		3,5 %	2,6 %	<b>DA</b>
	0,23 %		0,9 %	3,9 %	<b>DA</b>

## § 5. ZAKLJUČAK

Provedenim eksperimentima uspješno je razvijena brza i učinkovita metoda fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima za određivanje aktivne farmaceutske tvari Elvitegravira i njena dva procesna onečišćenja. Korišteno je izokratno ispiranje na analitičkoj koloni te detektor s nizom dioda.

U okviru ovog rada pokazano je da je razvijena metoda određivanja procesnih onečišćenja Elvitegravira fluidnom kromatografijom pri superkritičnim uvjetima linearna, točna i ponovljiva. Testirani su validacijski parametri: specifičnost, granica kvantifikacije, preciznost, linearnost i točnost. Specifičnost je evaluirana primjenom analitičkih kolona različitog punila te je za istraživanje ostalih validacijskih parametara odabrana kolona najboljeg razlučivanja između pikova Elvitegravira i njegovih procesnih onečišćenja. Granica kvantifikacije određena je na koncentracijskoj razini 0,05 % za oba onečišćenja i dobivene su prihvatljive vrijednosti ponovljivosti, odziva detektora, vrijednosti omjera signala i šuma te analitičkog povrata. Linearnost metode potvrđena je za oba onečišćenja u koncentracijskom rasponu od 0,05 % do 0,23 % uz odziv detektora linearno proporcionalan koncentraciji. Točnost metode određena je na tri koncentracijske razine: 0,05 %, 0,15 % i 0,23 % te je prikazana analitičkim povratom koji je u rasponu od 97,0 do 112,0 % za oba onečišćenja. Ponovljivost sustava određena je na tri koncentracijske razine te je prikazana relativnim standardnim odstupanjem (RSD) što se nalazi u rasponu od 0,9 % do 5,2 % za određivanje oba onečišćenja što zadovoljava postavljene kriterije prihvatljivosti. Višestrukim pripremama uzorka uz dodatak poznate količine onečišćenja ON1 i ON2 potvrđena je i ponovljivost metode.

Korištena tehnika fluidne kromatografije pri superkritičnim uvjetima primjenjiva je kao tehnika u zelenoj kemiji. Važna načela zelene kemije koja se primjenjuju korištenjem ove tehnike uključuju prevenciju otpada, korištenje manje štetnih otapala i povećanje energetske učinkovitosti. Ugljikov(IV)oksid upotrijebljen kao fluid pri superkritičnim uvjetima je netoksičan, nezapaljiv i inertan i na taj način pridonosi ekološkoj osviještenosti. Vrijeme analize i ponovno uravnoteženje kolone u fluidnoj kromatografiji pri superkritičnim uvjetima znatno su smanjeni u odnosu na druge slične kromatografske tehnike.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Oznaka	Naziv
<b>AIDS</b>	Sindrom stečene imunodeficijencije
<b><math>\alpha</math></b>	Faktor razdvajanja
<b>BEH čestice</b>	Hibridne čestice povezane etilenskim mostom (engl. <i>Bridged – Ethylene Hybrid Particles</i> )
<b>BPR</b>	Regulator povratnog tlaka (engl. <i>Back – Pressure Regulator</i> )
<b>DAD</b>	Detektor s nizom dioda
<b>DAP</b>	Dobra analitička praksa
<b>DLP</b>	Dobra laboratorijska praksa
<b>DNA</b>	Deoksiribonukleinska kiselina
<b>ELISA</b>	Imunoenzimska metoda (engl. <i>Enzyme – Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>ELV</b>	Elvitegravir
<b>EMA</b>	Europska agencija za medicinu
<b>FDA</b>	Organizacija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug administration</i> )
<b>FID</b>	Plamenoionizacijski detektor
<b>GC</b>	Plinska kromatografija (engl. <i>Gas Chromatography</i> )
<b>H</b>	Visina kromatografskog pika
<b>HAART</b>	Visokoaktivna antiretroviralna terapija
<b>HIV</b>	Virus humane imunodeficijencije
<b>HPLC</b>	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )

<b>ICH</b>	Međunarodna organizacija za harmonizaciju (engl. <i>International Conference on Harmonization</i> )
$k$	Faktor zadržavanja
<b>LOD</b>	Granica detekcije
<b>LOQ</b>	Granica kvantifikacije
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>NPD</b>	Dušik-fosfor detektor
$R_s$	Razlučivanje pikova
<b>SFC</b>	Fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima (engl. <i>Supercritical Fluid Chromatography</i> )
<b>TBDMS</b>	<i>tert</i> -butildimetilsilil
<b>TEA</b>	Trietilamin
<b>TFA</b>	Trifluoroctena kiselina
$t_R$	Vrijeme zadržavanja
$w_b$	Osnovica kromatografske krivulje
$w_h$	Polovica visine kromatografske krivulje
<b>UPLC</b>	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> )

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. K. Shimura, E. Kodama, Y. Sakagami, Y. Matsuzaki, W. Watanabe, K. Yamataka, Y. Watanabe, Y. Ohata, S. Doi, M. Sato, M. Kano, S. Ikeda, M. Matsuoka, *J. Virol.* **2** (2008) 764–774.
2. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3A\\_R2/Step4/Q3A\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf) (datum pristupa 18. siječnja 2019)
3. B. Nigović, M. Sertić: Onečišćenja u lijekovima, *Farm. Glas.* **68** (2012) 77–88.
4. S. Ramanathan, A. A. Mathias, P. German, B. P. Kearney, *Clin. Pharmacokin.* **50** (2016) 229–244.
5. K. Shimura, E. N. Kodama, *Antivir. Chem. Chemoth.* **20** (2009) 79–854.
6. P. E. Sax, E. DeJesus, A. Mills, A. Zolopa, C. Cohen, D. Wohl, J. E. Gallant, H. C. Liu, L. Zhong, K. Yale, K. White, B.P. Kearney, J. Szwarcberg, E. Quirk, A. K. Cheng, *Lancet* **379** (2012) 2439–2448.
7. J. Gallant, J. Brunetta, G. Crofoot etc., *J. Acquir Immune Defic Syndr.* **73** (2016) 294–298.
8. R. K. Gummalluri, T. V. N. Parthasarzhi, G. Anjanamadhulika, *Indian J. Pharm. Sci.* **78** (2016) 532–537.
9. Ž. Ivančević, MSD medicinski priručnik za pacijente, Placebo d.o.o, Split, 2008, 938–944.
10. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/316230.php> (datum pristupa 12. srpnja 2018.)
11. F. J. Palella, K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, J. Aschiman, S. D. Holmberg, *N. Engl. J. Med.* **338** (1998) 853–860.
12. P. A. Volberding, S. G. Deeks, *Lancet* **376** (2010) 49–62.
13. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb 1999, str. 645–674.
14. [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/) (datum pristupa: 12. srpnja 2018.)
15. N. Galić, V. Drevenkar, Kromatografija, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
16. M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, Mentor d.o.o., Zagreb, (2014) 97–99.

- 
17. M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb (2003), str. 217–235.
18. T. A. Berger, *J. Chromatogr. A* **785** (1997) 3–33.
19. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-5509EN.pdf> (datum pristupa: 6. srpnja 2018.)
20. L. Novákova, A. G. Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guilleme, *Anal. Chim. Acta* **824** (2014) 18–35.
21. E. Lesellier, C. West, *J. Chromatogr.* **1382** (2015) 1–59.
22. D. Pyo, *Bull. Korean Chem. Soc.* **27** (2006) 1429–1432.
23. <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html> (datum pristupa: 13. srpnja 2018.)
24.  
[https://www.chromacademy.com/lms/sco109/HPLC\\_Supercritical\\_Fluid\\_Chromatography.pdf](https://www.chromacademy.com/lms/sco109/HPLC_Supercritical_Fluid_Chromatography.pdf) (datum pristupa: 1. rujna 2018.)
25. ICH Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Secretariat, 2006, <http://www.ich.org> (datum pristupa 11. rujna 2018.)
26. V. Ravichandran, S. Shalini, K.M. Sundram, H. Rajak, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2** (2010) 18–22.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Antonija Radić

Datum rođenja: 05.12.1992.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

### Obrazovanje

1999.-2001. Osnovna škola „Ivan Goran Kovačić“

2001.-2007. „XI. osnovna škola“, Slavonski Brod

2007.-2011. Gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod, opći smjer

2011.-2016. Preddiplomski sveučilišni studij Kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Nagrade i priznanja

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

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012.- 2018. Otvoreni dan kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska

### Radno iskustvo

Od studenog, 2018. Rad u laboratoriju na odjelu TAPI Pliva R&D Analitika, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska