

Određivanje potencijalno genotoksičnih onečišćenja u ceritinibu vezanim sustavom tekućinska kromatografija-tandemna spektrometrija masa

Jurković, Vedrana

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:217:674676>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Vedrana Jurković

**ODREĐIVANJE POTENCIJALNO GENOTOKSIČNIH
ONEČIŠĆENJA U CERITINIBU VEZANIM SUSTAVOM
TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA - TANDEMNA
SPEKTROMETRIJA MASA**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2018. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Analitike istraživanja i razvoja Pliva, Prilaz b. Filipovića 25, Zagreb, pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim vodstvom Mislava Runje, dipl.kem.inž. u sklopu Sveučilišnog diplomskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Nives Galić na razumijevanju, strpljenju, brzim odgovorima na sva moja pitanja i nedoumice te stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala mome neposrednom voditelju Mislavu Runji, dipl. kem. inž. na pruženoj prilici, iznimnoj pomoći, svakom prijedlogu i uvažavanju mojih želja.

Najveće hvala upućujem Miji Antolčić, mag.chem. za ogromnu pomoć, savjete, uloženi trud, susretljivost i strpljenje. Hvala ti na nesebičnoj pomoći i prijateljskoj atmosferi u laboratoriju tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji koja je uz mene od prvog dana školovanja i bez čije podrške ovaj rad ne bi bio ostvaren.

Posebno hvala Marku što je uvijek uz mene. Hvala ti na podršci, ljubavi i ogromnom strpljenju.

Hvala i svim mojim prijateljima, kolegama koji su bili uz mene i pomogli mi svojim znanjem i ohrabrivanjem.

Sadržaj

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i svrha rada.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Ceritinib	2
2.2. Genotoksična onečišćenja.....	4
2.2.1. Kontrola genotoksičnih onečišćenja prema ICH M7	4
2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	5
2.4. Spektrometrija masa.....	8
2.5. Vezani sustav LC-MS	12
2.6. Validacija analitičkih metoda	13
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Opis polaznog materijala.....	16
3.2. Oprema i instrumenti	17
3.2.1. Parametri analitičke metode	17
3.3. Priprema pokretnih faza i otapala.....	20
3.3.1. Priprema vodene pokretne faze.....	20
3.4. Priprema otopina uzoraka	20
3.4.1. Priprema otopina za određivanje linearnosti	21
3.4.2. Priprema otopina za određivanje analitičkog povrata	22
3.4.3. Priprema uzoraka za određivanje točnosti	23
3.4.4. Priprema uzoraka za određivanje granica kvantifikacije i detekcije	24
3.5. Uvjeti mjerenja LC/MS analize	25
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Linearnost	26
4.2. Točnost	31
4.3. Ponovljivost	34
4.4. Analitički povrat	34
4.5. Granice kvantifikacije i detekcije	39
4.6. Robusnost.....	39
4.7. Rezultati analize LC-MS/MS	40

4.7.1. LC-MS/MS analiza onečišćenja pri granici kvantifikacije 1 ng mL ⁻¹	46
4.7.2. LC-MS/MS analiza onečišćenja na razini specifikacije 4 ng mL ⁻¹	48
§ 5. ZAKLJUČAK	50
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	51
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	XV
§ 8. ŽIVOTOPIS	XVII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ODREĐIVANJE POTENCIJALNO GENOTOKSIČNIH ONEČIŠĆENJA U CERITINIBU VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA-TANDEMNA SPEKTROMETRIJA MASA

VEDRANA JURKOVIĆ

Ceritinib je farmaceutik koji se koristi pri liječenju specifičnog oblika tumora pluća. Djeluje kao inhibitor kinaze aplastičnog limfoma (ALK). Razna onečišćenja koja nastaju tijekom proizvodnje ili razgradnjom djelatne tvari mogu utjecati na neka svojstva lijeka, stoga važeći standardi i zakonske regulative zahtijevaju od farmaceutske industrije proizvodnju djelatne tvari visoke čistoće, te detaljno poznavanje onečišćenja prisutnih u djelatnoj tvari i gotovom lijeku. Ubrzani razvoj moderne analitičke instrumentacije rezultirao je razvojem izrazito selektivnih i osjetljivih analitičkih metoda koje mogu odgovoriti na ove zahtjeve jer omogućavaju određivanje ne samo djelatne tvari nego i onečišćenja prisutnih u lijeku. U ovom radu validirana je metoda za kvantitativno određivanje genotoksičnih onečišćenja ceritiniba primjenom vezanog sustava tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS).

(62 stranica, 26 slika, 27 tablica, 23 literaturna 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, HPLC, MS/MS, onečišćenja, validacija

Mentor: prof.dr.sc. Nives Galić

Neposredni voditelj: Mislav Runje, dipl.kem.inž.

Ocjenitelji:

1. prof.dr.sc. Nives Galić
 2. Izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
 3. Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
- Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 28.02.2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF POTENTIALLY GENOTOXIC IMPURITIES IN CERITINIB BY LIQUID CHROMATOGRAPHY- TANDEM MASS SPECTROMETRY

VEDRANA JURKOVIĆ

Ceritinib is a pharmaceutical used to treat a specific type of lung cancer. This molecule acts as an inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK). Various pollutants that are formed during the production or degradation of active substances may affect some drug properties, so valid standards and legislation require production of highly pure active substances and detailed knowledge of the contaminants present in the active substance and in the final product. The accelerated development of modern analytical instruments has resulted in the development of highly selective and sensitive analytical methods that fulfil to these requirements because they enable the determination of not only active substances but also contaminants present in the drug. In this work, a quantitative method for the determination of genotoxic impurities in ceritinib by hyphenated system high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was validated.

(62 pages, 26 figures, 27 tables, 23 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, HPLC, MS/MS, impurities, validation

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

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
2. Dr. Biserka Prugovečki, Associate Professor
3. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
4. Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 28.02.2018.

§ 1. UVOD

1.1. Cilj i svrha rada

Ceritinib je monoterapija indicirana za prvu liniju liječenja odraslih bolesnika s uznapredovalim rakom pluća ne-malih stanica pozitivnim na kinazu anaplastičnog limfoma.

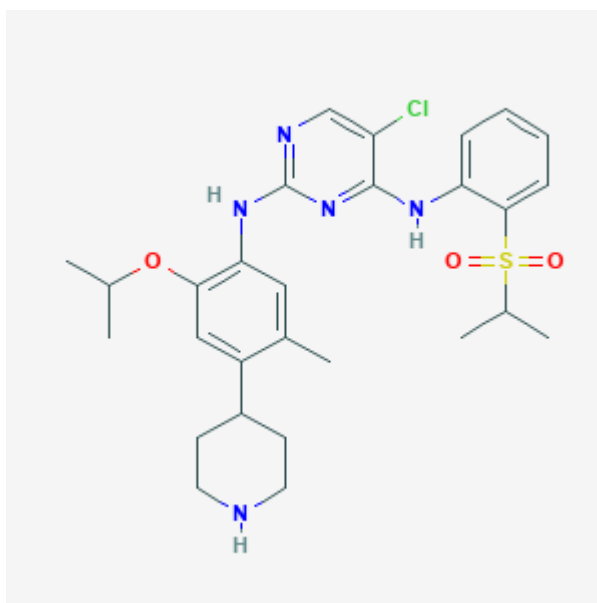
U aktivnim farmaceutskim supstancijama nalaze se onečišćenja koja su definirana kao tvari koje nemaju ljekoviti učinak, a mogu potencijalno izazvati neželjene učinke ili izazvati probleme u kvaliteti lijeka s obzirom da mogu utjecati na njegovu djelotvornost ili na sigurnost primjene. Zbog toga količina genotoksičnih onečišćenja u lijeku i pomoćnim tvarima mora biti strogo kontrolirana. Za kvantitativno određivanje genotoksičnih onečišćenja ceritiniba potrebna je validirana kvantitativna analitička metoda određivanja produkata ceritiniba. U ovom radu korištena je tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa. Kao analizator korišten je trostruki kvadrupol. Cilj i svrha ovog diplomskog rada je validacija LC-MS/MS metode koja uključuje ispitivanje sljedećih parametara: linearnost, točnost, robusnost, ponovljivost, granice detekcije i kvantifikacije. Prema dostupnim izvorima do sada nisu pronađeni podaci o određivanju potencijalno genotoksičnih onečišćenja u ceritinibu.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Ceritinib

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

Ceritinib je indiciran za prvu liniju liječenja odraslih bolesnika s uznapredovalim rakom pluća ne-malih stanica (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) pozitivnih na ALK. NSCLC je najučestaliji tip raka pluća. Gotovo 8 % pacijenata oboljelih od karcinoma NSCLC imaju mutaciju upravo na genu ALK. Status ALK-pozitivnog karcinoma NSCLC potrebno je utvrditi prije uvođenja terapije Zykadiom. Testiranje za ALK-pozitivan NSCLC mora se provoditi u laboratorijima sa dokazanim stručnim znanjem o specifičnoj tehnologiji koja se za to koristi.^{1,2}



Slika 1. Strukturna formula molekule ceritiniba³

Mehanizam djelovanja ceritiniba je inhibicija autofosforilacije proteina ALK, ALK-om posredovane fosforilacije silaznih signalnih proteina i proliferacije stanica raka ovisnih o proteinu ALK *in vitro* i *in vivo*. Translokacija proteina ALK određuje ekspresiju rezultirajućeg fuzijskog proteina i posljedičnu poremećenu signalizaciju proteina ALK kod karcinoma NSCLC. U većini slučajeva karcinoma NSCLC, EML4 (engl. *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) je translokacijski partner za ALK, te se stvara fuzijski protein EML4-ALK. Ceritinib se pokazao djelotvornim protiv aktivnosti fuzijskog proteina u staničnoj liniji karcinoma, što rezultira inhibicijom proliferacije stanica *in vitro* i regresijom tumora. Antineoplastičnom aktivnošću (tvari koje inhibiraju ili sprječavaju proliferaciju neoplazme) dolazi do inhibicije rasta stanica u tumorskim stanicama u kojima je ALK prekomjerno ekspimirana.¹ Navodi se kako ceritinib može uzrokovati neplodnost ili oštetiti nerođeni plod obzirom na mehanizam aktivnosti. Tijekom uzimanja lijeka dolazi do mučnine (82 %), proljeva (75 %), povraćanja (65%), nesvjestice (47 %) te povišenja bioloških markera poput razine alanin aminotrasferaze koja obično potječe iz oštećenih stanica zbog čega je osjetljiv pokazatelj jetrene lezije.⁴

Od 2011. godine crizotinib je na tržištu bio prva generacija standardne terapije za pacijente oboljele od karcinoma NSCLC, pokazujući dvostruku progresiju izlječenja u usporedbi s kemoterapijom. Međutim, s vremenom su neki pacijenti razvili rezistentnost na crizotinib zbog čega je ceritinib dobio ubrzano odobrenje od Organizacije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) 2014. godine na temelju kliničkog istraživanja na 163 pacijenta sa metastatskim ALK-pozitivnim karcinomom NSCLC nakon terapije sa crizotinibom. Rezultati su pokazali da je oko 50 % sudionika imalo smanjen tumor, a efekt je trajao u prosjeku 7 mjeseci.⁵

Ceritinib ima antitumorsku aktivnost kod pacijenata s progresijom nakon kemoterapije. Prema referenci 6, provedeno je istraživanje među 231 pacijenta, podijeljenih u dvije grupe. Jedna grupa primala je ceritinib, druga grupa kemoterapiju, te je ustanovljeno da su pacijenti dobili kliničku korist od inhibitora proteina ALK nakon korištenja crizotiniba. Produljeno je vrijeme do pogoršanja unaprijed određenih simptoma od interesa specifičnih za rak pluća. Također su imali značajna poboljšanja u odnosu na kemoterapiju u pogledu mjera općeg zdravstvenog stanja i opće kvalitete života. Ispitivanje je ispunilo svoj primarni cilj

dokazavši statistički značajno poboljšanje s procijenjenim smanjenjem rizika za 51% u Ceritinib skupini u usporedbi s kemoterapijskom skupinom.

O. Heudi i sur.⁷ u I fazi kliničkih studija utvrđivali su sigurnosna i farmakokinetička svojstva, kao i antitumorsku aktivnost ceritiniba. Korišten je LC-MS/MS metoda za kvantitativno određivanje ceritiniba u plazmi 168 sati nakon oralnog unosa 750 mg lijeka. Tijekom trodnevne procjene, ustanovljeno je da se maksimalna koncentracija ceritiniba u plazmi postiže nakon 6 sati od uzimanja dnevne doze, a vrijeme poluživota je otprilike 40 sati.⁷

2.2. Genotoksična onečišćenja

Onečišćenje se definira kao bilo koja komponenta nove ljekovite tvari koja nije kemijski definirana kao nova ljekovita tvar. Onečišćenja potječu iz različitih izvora, no najčešći potencijalni izvori onečišćenja su svi polazni materijali poput otapala, katalizatora, reagensa i dr. Izvor onečišćenja može biti proizvodna oprema ili pakiranje, a mogu nastati i nakon završetka proizvodnje kao razgradni produkti samog lijeka.⁸ Ponekad onečišćenja mogu biti mutagena, teratogena ili karcinogena.

Genotoksičnost obuhvaća sve vrste oštećenja DNA ili kromosoma uključujući lomove, preuređivanje adukata, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Pri tome se ošteti genetski sklop, tj. DNA, te nastaju mutacije. Sustavi popravka DNA imaju važnu ulogu u održanju integriteta nasljednog materijala i podcrtavaju njegov značaj za preživljavanje stanice. Česta izloženost genotoksičnim agensima može nadvladati kapacitete popravka DNA i uzrokovati oštećenja. Genotoksični agensi su tvari koje nemaju terapijski značaj, ali mogu uzrokovati neželjene nuspojave.⁹ Stoga je vrlo važno provoditi analize koje mogu biti vrlo zahtjevne obzirom na niske koncentracije analita u uzorku, oko 1-5 ppm (engl. *Parts Per Million*). Za takve potrebe koriste se vrlo osjetljivi analitički instrumenti sa iznimno visokom selektivnošću.

2.2.1. Kontrola genotoksičnih onečišćenja prema ICH M7

Posljednjih godina značajno je povećan broj propisa i zakona kojima se reguliraju toksične kemikalije. Između ostalih, najvažniji razlozi za to su veća svjesnost o ogromnom broju

toksikanata koje su ljudi raspršili u okolišu, napredak analitičkih metoda koje su omogućile detekciju vrlo niskih koncentracija toksikanata te utvrđivanje veze između nekih bolesti i kronične izloženosti određenim tvarima, često kod vrlo niskih koncentracija. Prije donošenja propisa nužna je procjena rizika (sigurnosti) toksikanta koja se temelji na znanstvenoj procjeni potencijalnih štetnih učinaka toksikanta. Integralni dijelovi procjene rizika su: identifikacija opasnosti (na temelju dokaza da toksikant može djelovati štetno za ljude), određivanje veze doze i odgovora (kao kvantifikacija toksičnog učinka), te procjena izloženosti (koje vrste, razine i trajanja izloženosti se mogu očekivati). Time se omogućuje kvalitetna karakterizacija rizika na temelju koje se zakonski regulira izloženost toksikantu. Kontrola elementarnih i genotoksičnih onečišćenja pri niskim koncentracijskim razinama postala je jedna od najbrže rastućih područja unutar istraživanja, razvoje i kontrole kvalitete ljekovite tvari i pomoćnih tvari.

Trenutne zakonske regulative zahtjevaju proizvodnju djelatne tvari visoke čistoće kao i detaljno poznavanje prisutnih onečišćenja u djelatnoj tvari, pomoćnim tvarima i gotovom lijeku. Određivanje onečišćenja obuhvaća identifikaciju, strukturnu karakterizaciju i kvantitativno određivanje onečišćenja u aktivnoj tvari i gotovom lijeku. Zbog toga je potrebno razviti visoko osjetljive i selektivne analitičke metode jer omogućavaju određivanje djelatnih tvari i onečišćenja prisutnih u lijeku.¹⁰

2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je separacijska analitička tehnika koja se koristi za odjeljivanje otopljenih komponenata iz smjese te za kvantitativno i kvalitativno određivanje različitih molekula u otopini. Princip tehnike temelji se na kemijskim interakcijama između analizirane tvari i stacionarne faze u koloni. Faktor zadržavanja pokazatelj je duljine zadržavanja analita na koloni u odnosu na pretpostavku da nema interakcije s nepokretnom fazom. Definiran je prema jednadžbi 1,

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

pri čemu je t_R vrijeme zadržavanja analita, a t_M zadržano vrijeme pokretne faze.¹¹

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti sastoji se od rezervoara mobilne faze, pumpe, sustava za obradu otapala pri čemu se uklanjaju otopljeni plinovi koji su prisutni u pokretnoj fazi pa se mogu pojaviti u drugim dijelovima uređaja, osobito u pumpama, detektoru, koloni; otplinjača (degazera), injektora, predkolone (zaštite od mehaničkih onečišćenja u uzorku), kolone i detektora, te sustava za obradu podataka (Slika 2.) Uzorak se može uvesti u kromatograf direktnim ubrizgavanjem injekcijskom špricom preko elastične membrane, tzv. septuma, ili se uvodi automatskim sustavom za injektiranje. Automatski sustav se koristi kada je potrebno analizirati veći broj uzoraka ili kada ručno injektiranje nije praktično. Vijale se napune otopinom uzorka i stave u automatski injektor (uređaj za automatsko ubrizgavanje). Automatski injektor izmjeri određeni volumen uzorka i injektira ga. Na koloni dolazi do razdvajanja komponenti uzorka te je zbog toga bitno odabrati odgovarajuću kolonu za određenu analizu. Razlikujemo preparativne i analitičke kolone koje mogu biti kapilarne i nano kolone. Učinkovitost kromatografske kolone izražava se brojem teoretskih tavana N , kojim je iskazan broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i stacionarne faze. Računa se prema jednadžbi 2,

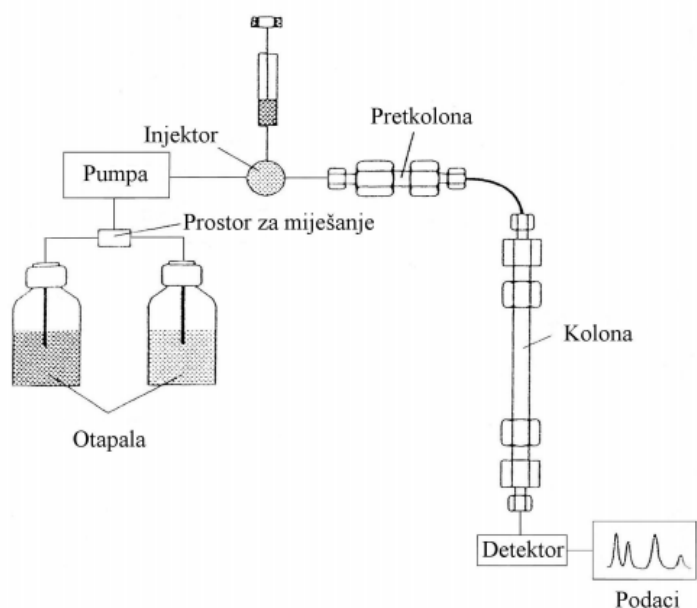
$$N = \frac{t_R^2}{w^2} \quad (2)$$

gdje je N broj teoretskih tavana, t vrijeme zadržavanja analita, te w_b širina pika pri osnovici kromatografskog pika. Učinkovitost se može izraziti i visinom tavana H koja se računa prema jednadžbi 3,

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

gdje je H visina tavana, L duljina kolone, a N broj teoretskih tavana.¹¹

Za punilo se najčešće upotrebljava silikagel na čiju se površinu fizikalno ili kemijski veže organska komponenta. Detektor ima važnu ulogu pri kojoj generira električni signal čiji intenzitet odgovara koncentraciji tvari koja se eluira. Ne postoji univerzalni sustav detektora u tekućinskoj kromatografiji, već ovisi o prirodi uzorka. Najzastupljeniji detektori u tekućinskoj kromatografiji obrnutih faza su apsorpcijski, fluorimetrijski detektori i spektrometri masa.¹¹⁻¹³ Na kraju analize tekućina pri izlazu iz kromatografa odlazi u spremnik za otpad.



Slika 2. Shematski prikaz HPLC-a¹³

Krajnji rezultat analize je kromatogram, ispis bilo koje funkcije koncentracije analita u ovisnosti o vremenu ili volumenu eluiranja. Iz površine ispod pika moguće je izračunati količinu svakog sastojka, a položaj kromatografskog pika služi za identifikaciju sastojka.¹¹

Prve kromatografske analize izvodile su se u staklenim kolonama u kojima su vremena odjeljivanja trajala i nekoliko sati. Brzine protoka su bile vrlo male. S vremenom je uočeno da se najveća djelotvornost postiže smanjenjem dimenzija zrna punila, a ne primjenom vakuuma ili pumpanjem, jer se povećanjem brzine protoka povećavala i visina tavana. Za postizanje odgovarajućih brzina protoka u kolonama ispunjenim punilima s promjerom zrna od 10 μm i manje, potrebni su tlakovi od nekoliko milijuna Pa.

Otopina uzorka injektirana u mobilnu tekuću fazu putuje kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom. Brzinu eluiranja i separaciju molekula u uzorku određuje interakcija uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom, kao i vrsta nepokretne faze. Prema mehanizmu odvajanja razlikujemo razdjelnu kromatografiju, adsorpcijsku kromatografiju, ionsku izmjenu, afinitetnu kromatografiju te odjeljivanje prema veličini čestica. Razdjelnu kromatografiju, koja se najviše primjenjuje od svih metoda tekućinske kromatografije, dijelimo na kromatografiju normalnih i obrnutih faza. U kromatografiji obrnutih faza, stacionarna faza je manje polarna od mobilne. Valja razlikovati i izokratnu od gradijentne tehnike HPLC: izokratni sustav

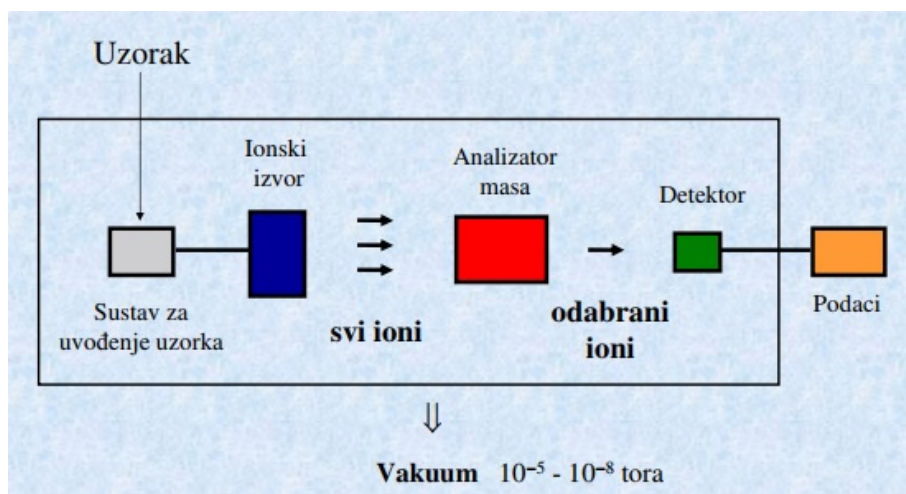
odjeljivanja koristi jedno otapalo stalnog sastava, ali bolje i brže odjeljivanje postiže se primjenom gradijentnog ispiranja kada se sastav pokretne faze mijenja. Učinak gradijenta otapala može se usporediti s temperaturnim gradijentom u GC.^{12,14}

Prednosti metode HPLC su osjetljivost, široki spektar uzoraka, analiza termički osjetljivih uzoraka, kao i široka mogućnost primjene u medicini, farmaciji, ekologiji, te analitičkoj kemiji. Koristi se za pročišćavanje i analizu uzoraka u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, te industriji polimera i biotehnologije. Koristi se i za određivanje sadržaja ljekovitih supstancija, praćenje stabilnosti ljekovitih supstancija i dozirnih oblika te određivanje sadržaja sintetskih međuprodukata i razgradnih produkata u dozirnim oblicima. Za strukturnu karakterizaciju onečišćenja često se koristi spregnuta tehnika tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*, LC-MS) gdje se analit detektira spektrometrom masa.

2.4. Spektrometrija masa

Jedna od najznačajnijih analitičkih tehnika u suvremenoj znanosti je spektrometrija masa. Tom tehnikom molekule se analiziraju na temelju omjera njihove mase i naboja. Molekule se prevode u molekulske ione koji sudjeluju u daljnjoj fragmentaciji na druge ione-fragmente. Koristi se za određivanje sastava nepoznatog uzorka i za određivanje količine određene tvari u uzorku, kao i za određivanje kemijskih i fizikalnih svojstava tvari.

Prvi korak pri analizi molekula je ionizacija molekula u ionizatoru. Dovođenjem energije molekuli dolazi do izbacivanja jednog ili više elektrona, te se molekule mogu fragmentirati u dva ili više fragmenata. Nastali ioni provode se kroz analizator, gdje se ioni razdvajaju u vremenu i/ili prostoru prema njihovim omjerima m/z . Izlazeći iz analizatora, ioni završavaju na detektoru, gdje se registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z i generira električni signali.¹⁵ Kao konačan rezultat dobije se spektar masa. Uređaj za analizu naziva se spektrometar masa te je prikazana njegova shema na Slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz spektrometra masa¹⁶

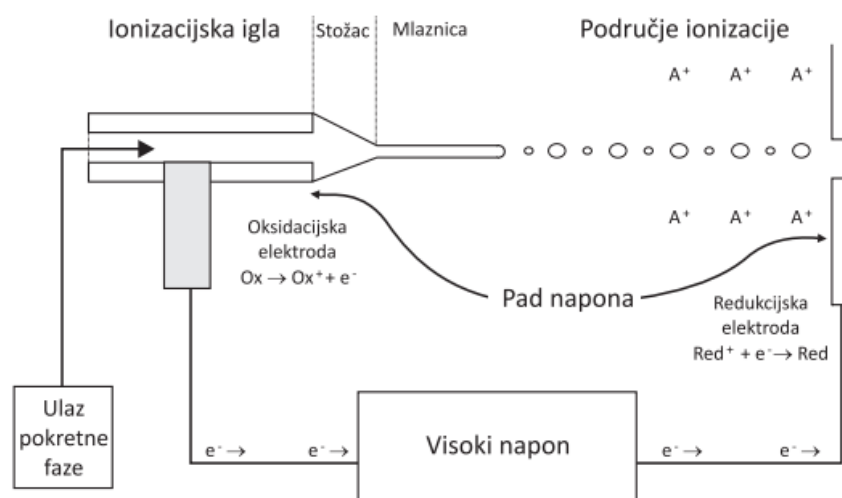
Ionizacijske tehnike koje se koriste u prvom koraku su; ionizacija elektronima (engl. *Electron Impact* – EI), kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionization* – CI), matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization* - MALDI), ionizacija brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment* – FAB), te elektroraspršenje (engl. *Electrospray Ionization* – ESI).¹⁶

Ovisno o primijenjenom naponu na kapilari, ionizacija elektroraspršenjem može biti pozitivna ili negativna. U pozitivnom načinu rada nastaju $[M+H]^+$ ioni, dok u negativnom načinu rada nastaju $[M-H]^-$ ioni. Strukturalne informacije dobivene pozitivnim i negativnim načinom snimanja su komplementarne i pomažu pri karakterizaciji nepoznatih analita. Napon u ovisnosti o naboju iona analita ili pokretne faze, te uzrokuje gradijent električnog polja potreban da bi došlo do razdvajanja naboja na površini tekućine. Kao rezultat toga, pri kritičnoj jakosti polja nastaje tzv. Taylorov stožac. Kada otopina koja tvori Taylorov stožac dosegne Rayleighev limit (točku pri kojoj su odbojne Coulombove sile naboja na površini jednake napetosti površine tekućine), kapljice koje sadrže višak pozitivnog ili negativnog naboja odvajaju se s vrha stošca.¹⁷

Postoje dva modela kojima se objašnjava nastajanje molekulskih iona. Model ostatka naboja pretpostavlja da povećana gustoća naboja i isparavanje otapala uzrokuje da se velike kapljice dijele u sve manje i manje, dok naposljetku ne ostane iznimno mala kapljica koja sadrži samo jedan ion. Isparavanjem molekula otapala nastaje ion u plinskoj fazi. Drugi model, poznat kao isparavanje iona, pretpostavlja da povećana gustoća naboja koja rezultira isparavanjem otapala uzrokuje Coulombovo odbijanje ne bi li se prevladala površinska

napetost, što rezultira isparavanjem iona s površine kapljica prije nego li kapljica dostigne Rayleighov limit i započne dijeljenje.^{17,18}

ESI je jedna od najčešće korištenih tehnika ionizacije. Često je povezan s uređajima za tekućinsku kromatografiju (LC) ili kapilarnu elektroforezu (CE) jer stvara ione direktno iz otopine. Protok otopine podvrgnute elektroraspršenju je 5 μ l -1000 μ l u minuti, a ovisi o elementima od kojih je sastavljen instrument. Analit se ionizira u obliku otopine, pri čemu se kao otapalo koristi hlapljivija tvar od analita. Pokretna faza i analit prolaze kroz kapilaru koja je ujedno i elektroda pod visokim naponom, u prostor pod vakuumom, kako je i prikazano na Slici 4. Otopina se raspršuje u aerosol pri ulasku u evakuiranu komoru. Jako nabijene kapi provode se kroz struju dušika koji pomaže uklanjanju molekula otapala. Naposljetku ostaju sve sitnije kapljice u kojima sile odbijanja postaju veće od napetosti površine kapljica te dolazi do njenog nesimetričnog dijeljenja koje se može ponavljati dok na kraju ne ostane samo jedna nabijena molekula analita.¹⁶⁻²⁰ Na Slici 4. prikazana je shema ESI ionizacije.



Slika 4. Shematski prikaz prijenosa naboja u ionizacijskoj tehnici ESI¹¹

Analizator je sastavni dio spektrometra masa koji razdvaja ione nastale u ionizatoru na temelju omjera m/z . Spektrometre masa možemo podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom, kod kojih je teorijski moguća analiza do MS^n (FTMS ili stupica iona), spektrometri masa s više analizatora (trostruki kvadrupol QqQ, engl. *Triple Quadrupole*), analiza moguća do MS^2 , te spektrometri masa s dva analizatora, između kojih se nalazi kolizijska ćelija (tzv. hibridni spektrometri masa npr. Q-TOF, engl. *Quadrupole Time of Flight*), kod kojih je moguća analiza do MS^2 . Najprimjenjeniji analizator je kvadrupol. Sastoji

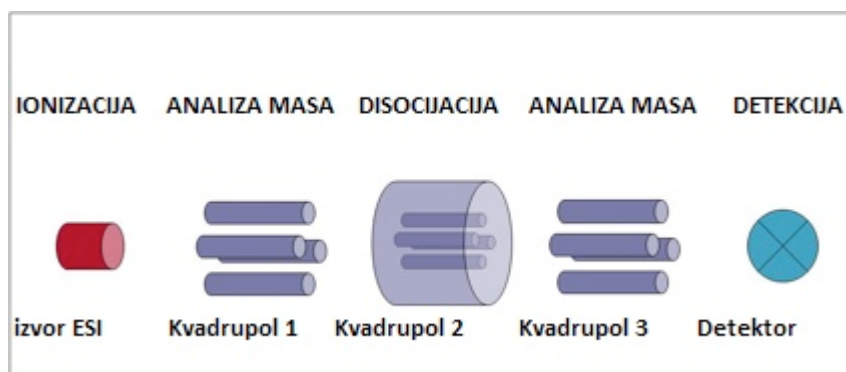
se od 4 cilindrične elektrode spojene u dva para, na koje se primjenjuje izmjenični ili istosmjerni napon, gdje jedan par ima pozitivni, a drugi negativni polaritet. Gornja i donja elektroda su pozitivno nabijene u prvom dijelu ciklusa izmjeničnog potencijala, pri čemu se pozitivno nabijeni ioni fokusiraju u horizontalnoj ravnini. U drugom dijelu ciklusa dolazi do promjene polariteta elektroda i ravnine u kojoj se ioni fokusiraju. Prilikom preklapanja istosmjernog i izmjeničnog napona, nastaje kvadrupolno električno polje. Mijenjanjem veličine potencijala sukcesivno se detektiraju ioni različitih masa.^{11,16} Kvadrupol može analizirati ione na dva načina: kompletno (Scan) ili snimanje odabranih iona (engl. *Selected Ion Monitoring*, SIM).

Kvadrupoli nisu najpogodniji za suvremena visokobrzinska izdvajanja kao ni za vrlo preciznu i točnu kvantifikaciju te nisu dobri selektori jako velikih masa. Kako bi se premostili ti nedostaci, osmišljen je trostruki kvadrupol (engl. *Triple Quadrupole*, QqQ) u kojem su povezana tri kvadrupola. Takva konfiguracija omogućuje provedbu analize tehnikama tandemne spektrometrije masa. Tandemna spektrometrija masa predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu ili prostoru, s ciljem izazivanja dodatne fragmentacije, s pomoću koje se kvalitetnije može odrediti struktura analiziranog iona.

Q1 i Q3 su klasični analizatori masa, dok središnji Q2 ima funkciju kolizijske ćelije gdje dolazi do interakcije iona s kolizijskim plinom (Ar, N₂, He) i kontrolirane fragmentacije iona (Slika 5). Prvi kvadrupol (Q1) radi u načinu rada SIM, odnosno izabire ione od interesa, određene m/z vrijednosti, koji se fragmentiraju, te samo najintenzivniji fragmenti prolaze dalje. U analizatoru Q2 nastaju fragmenti iona prekursora nakon sudara s molekulama plina koji se primjenom napona odvođe iz kolizijske ćelije te se na temelju omjera mase i naboja odvajaju u trećem kvadrupolu. Nakon odabira prekursor iona u Q1 analizatoru i fragmentacije u Q2, treći kvadrupol analizira fragmente iona (engl. *product*) te je postavljen da prati višestruke reakcije ili MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*), odnosno snimanje više određenih produkt iona. Kod MRM skeniranja ne skenira se cijelo područje mase nego se podesi nekoliko m/z vrijednosti tako da uređaju treba manje vremena za skeniranje, a rezultati su precizniji.^{19,20} Trostrukim kvadrupolom moguće je snimati sve ione, ali i kombinacije odabranih iona. Trostruki kvadrupol QqQ primjenjuje se u sudskoj medicini, farmaceutskoj industriji te kliničkoj kemiji.

Nakon izlaska iz masenog analizatora analizirana komponenta s jednim, točno određenim omjerom m/z , dolazi do detektora, koji uglavnom rade na principu proizvodnje

električnog signala kada ion dođe do njih. Dobivena informacija se bilježi pomoću računala i obrađuje pomoću odgovarajućeg softvera.



Slika 5. Shematski prikaz trostrukog kvadrupola.

Preuzeto i prilagođeno iz reference 20.

2.5. Vezani sustav LC-MS

LC i MS su dvije moćne analitičke tehnike, te se njihovim spajanjem omogućuje analiza još šireg spektra spojeva. Vezani sustav tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrometrija mase (HPLC-MS/MS, engl. *High Pressure Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Kod tandemске MS/MS kombinira se masena spektrometrija u dva koraka s analizatorom iste ili različite vrste, te fazom fragmentacije između. Jedna od najčešćih tehnika fragmentacije u kolizijskim ćelijama je CID (engl. *Collision-Induced Dissociation*) koja uključuje uvođenje inertnog plina (argona ili dušika) pri čemu dolazi do sudara između molekula plina i uzorka, uslijed čega se molekula raspada na sebi specifičan način.

Spajanje tehnika HPLC i MS omogućuje analizu najrazličitijih spojeva, uključujući termički nestabilne analite i analite s visokom molekularnom težinom, gdje je analiza pomoću GC-MS nemoguća. Za njihovo povezivanje koriste se različiti međuspojevi (engl. *Interface*), koji omogućuju djelomično uvođenje tekuće faze u spektrometar masa i djelotvorno uklanjanje suviška otapala prije uvođenja analita kako se ne bi narušio vakuumirani sustav. Spektrometrom masa detektiraju se odijeljeni sastojci koji se eluiraju s HPLC kolone. Detekcija se temelji na određivanju mase analita ili mase fragmenata karakterističnih za

određeni analit.^{12,16} U ovom radu je korišten vezani sustav tekućinska kromatografija tandemna spektrometrija masa (LC-MS/MS) koji je prikazan na Slici 6. Ovaj vezani sustav ima određene prednosti u odnosu na ranije korištene vezane sustave: veću osjetljivost, selektivnost, robusnost i širi raspon vrijednosti m/z čime se proširuje paleta mogućih analiziranih tvari. Za ionski izvor korišteno je elektroraspršenje, a kao analizator trostruki kvadropol.



Slika 6. Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadropolom, Agilent 6490

2.6. Validacija analitičkih metoda

Validacijom metode potvrđuje se točnost i pouzdanost analitičke metode kao i dobivanje konzistentnih podataka. Validacijom se dokazuje prikladnost određene metode za namijenjenu analitičku svrhu, odnosno skupljaju se objektivni dokazi da navedena metoda ispunjava određene kriterije. Postoji niz preporuka prema kojima se provodi validacija metode. Najčešće se koriste one koje propisuje Internacionalna organizacija za harmonizaciju (ICH, engl. *International Conference on Harmonization*) – poglavlje Q2 "Validacija analitičkih procedura" i Organizacija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) – "Analitičke procedure i validacija metoda lijekova". ICH čine

regulatorne agencije iz SAD-a, Europe i Japana. Postoje i regulatorni zahtjevi koji su spojeni u principe poput Dobre laboratorijske prakse (DLP, 1976. FDA), Dobre analitičke prakse (DAP), Dobre proizvođačke prakse (DPP), ISO norme po kojima je validacija metode postala obvezna.

Iako nisu svi validacijski parametri primjenjivi na sve vrste analiza i uzoraka, razlikujemo: selektivnost i specifičnost (engl. *Selectivity/Specificity*), linearnost (engl. *Linearity*), točnost (engl. *Accuracy*), preciznost (engl. *Precision*) i međupreciznost (engl. *Intermediate precision*), granica detekcije (engl. *Limit of detection*, LOD), granica kvantifikacije (engl. *Limit of quantification*, LOQ), radno područje (engl. *Range*), ponovljivost i robusnost.²¹ Kombinacijom ovih parametara oblikuje se plan analitičke validacije.

2.6.1. Parametri validacije analitičke metode

Linearnost analitičke metode je mogućnost metode da daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku unutar danog područja. Za potvrdu linearosti odabire se najmanje pet različitih koncentracija analita. U praksi se linearnost određuje mjerenjem odziva detektora za poznate koncentracije referentnog materijala. Procjenjuje se matematički i grafički.

LOD je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati uz odgovarajuću točnost i preciznost, a LOQ je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Parametar LOQ iznimno je važan kod metoda kojima se određuju analiti u tragovima koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu štetno djelovati na zdravlje ljudi i okoliš. Određuju se razrjeđivanjem osnovne otopine.

Točnost metode je mjera pouzdanosti analitičke metode i definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, odnosno prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primjenom analitičkog postupka. Potrebno je koristiti najmanje tri koncentracijske razine unutar radnog područja metode i provoditi analize najmanje tri puta.

Specifičnost je svojstvo metode da točno i specifično odredi željeni analit u prisutnosti ostalih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima ispitivanja. Specifična metoda je ona kojom se može odrediti samo jedan specifični analit.

Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Može biti iskazana kao ponovljivost, reproducibilnost i međupreciznost.

Robustnost se određuje kao mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta metode. Provodi se da bi se odredilo kako male promjene radnih uvjeta i provedbe utječu na rezultat analize.

Područje rada metode je parametar validiran potvrdom da metoda ima prihvatljivu linearnost, točnost i preciznost kada se primjenjuje na uzorke koji se nalaze na rubu područja rada kao i unutar njega.

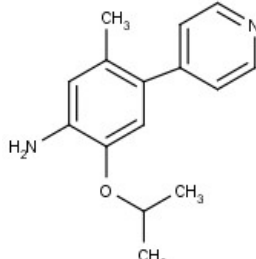
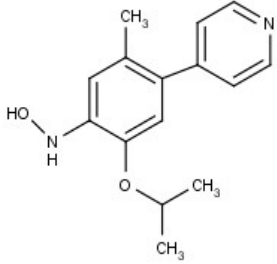
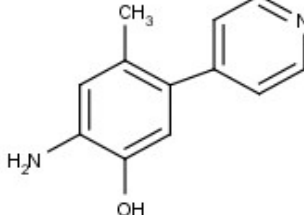
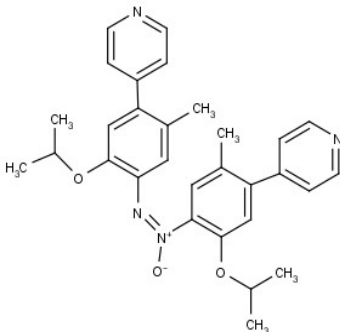
Najčešće korištene vrste analitičkih procedura su identifikacijski testovi, kvantitativni testovi za određivanje tragova, tj. nečistoća, te limit test za kontrolu nečistoća. Identifikacijski testovi su namijenjeni za identifikaciju analita u uzorku, što se postiže usporedbom svojstava uzorka sa referentnim uzorkom. Oba testa za analizu nečistoća daju informaciju o čistoći uzorka. Ukoliko dođe do promjene u sintezi aktivne tvari lijeka, ili promjenama u sastavu gotovog produkta, kao i promjenama u analitičkom postupku, potrebno je napraviti revalidaciju, koja će ovisiti o prirodi promjene.^{21,22}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opis polaznog materijala

Korišten je uzorak CRT-B-21 i 4 onečišćenja označena kao IMP 21 (TDM/3246/65-A1), IMP 22 (TDM/3246/76-C), IMP 24 (DŠ/12/20) i IMP 27 (TDM/3246/64-T4). U Tablici 1 prikazane su strukture onečišćenja koja su praćena u ovoj metodi.

Tablica 1. Prikaz struktura onečišćenja

IMP 21	
IMP 22	
IMP 24	
IMP 27	

3.2. Oprema i instrumenti

Instrument : LCMS88 Agilent

Kromatografska kolona: YMC-Triart C18, 100 mm × 2,0 mm, 1,9 μm (p/n TA12SP9-1002PT)

Računalni program: Agilent MassHunter

Aparati LC-MS/MS: HPLC Agilent 1290 i trostruki kvadrupol LC/MS 6490 TripleQuad opremljen s ESI sustavom za ionizaciju, te sa uređajem za samouzorkovanje povezanog s računalom i softverom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka.

Ostala oprema i kemikalije:

- Mikrovaga: UMX2, Mettler Toledo (preciznost ± 0,0001 mg)
- Ultrazvučna kupelj: BANDELIN SONOREX
- Laboratorijsko posuđe (čашice i odmjerne tikvice visoke čistoće, te ostalo stakleno posuđe)
- Automatske pipete za volumen od 10 μL do 5 mL, Eppendorf, AG, Njemačka
- Viale za instrument od 1,5 mL, PTFE čepovi sa silikonskom septom
- Uređaj za vodu: Millipore Milli-Q®
- Metanol, gradient grade for LC, reag. Ph Eur (Merck, Njemačka)
- Acetonitril, gradient grade for LC, reag. Ph Eur (Merck, Njemačka)
- Mravlja kiselina, Formic acid eluent additive for LC-MS (Honeywell, SAD)

3.2.1. Parametri analitičke metode

Kromatografski parametri UHPLC metode za identifikaciju genotoksičnih onečišćenja ceritiniba, koja je razvijena u sklopu doktorske disertacije Mie Antolčić opisani su u Tablici 2.

Tablica 2. Kromatografski parametri analize genotoksičnih onečišćenja ceritiniba

Kromatografska kolona	YMC Triart C18 100 × 2,0 mm, 1,9 μm		
Vodena pokretna faza "A"	1,0 mL mravlje kiseline u 1000 mL visoko pročišćene vode		
Organska pokretna faza "B"	Acetonitril		
Gradijent	Vrijeme	A%	B%
	0,00	100	0
	0,50	100	0
	2,50	80	20
	13,00	10	90
	15,00	10	90
	15,01	100	0
	17,00	100	0
Volumen injektiranja	1,0 μL		
Protok	0,5 mL/min		
Valna duljina detekcije	250 nm		
Temperatura kolone	30 °C		
Temperatura automatskog uzorkivača	15 °C		
Diluent	Metanol		

Tablica 3. Uvjeti snimanja QqQ MS

Parametar	Vrijednost (+)	Vrijednost (-)
Temperatura plina (°C)	100	100
Protok plina (l/min)	15	15
Raspršivač (psi)	15	15
Grijač plina nosioca	125	125
Protok plina nosioca	3	3
Napon na kapilari (V)	3000	3000

Parametri metode odabrani su usporedbom fragmentacije dobivene pri 4 različite kolizijske energije za koje su korišteni uzorci na koncentracijskoj razini $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ te su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Parametri QqQ MS/MS

Onečišćenja	Prekursor Ion	Produkt ion	Fragmentacija / V	Kolizijska energija / V	Napon / V	Ionizacija
IMP 24	201,1	201,1	380	0	4	Pozitivna
IMP 22	259,1	227	380	20	5	Pozitivna
IMP 21	243	201	380	20	5	Pozitivna
IMP 27	497,1	497,1	380	0	4	Pozitivna

Tablica 5. Kriteriji prihvatljivosti za pojedine parametre validacije

PARAMETAR	KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI
Linearnost	
<i>Koeficijent korelacije</i>	$\geq 0,990$
Granica određivanja kvantifikacije	$\leq 0,5 J$
<i>RSD</i>	$\leq 20 \%$
<i>Analitički prinos</i>	70-150 %
Točnost	
<i>Analitički prinos</i>	70-150 %
Preciznost	
<i>RSD</i>	$\leq 20 \%$
Ponovljivost	
<i>RSD</i>	$\leq 20 \%$

3.3. Priprema pokretnih faza i otapala

3.3.1. Priprema vodene pokretne faze

Za pripravu vodene pokretne faze pipetiran je 1,0 mL mravlje kiseline (HCOOH) u 1000 mL vode, miješanjem na magnetskoj miješalici.

3.4. Priprema otopina uzoraka

Prije pripreme uzoraka, potrebno je odrediti topljivost onečišćenja u otapalu. Acetonitril se nije pokazao kao dobro otapalo za navedena onečišćenja. Korišten je čisti metanol kao otapalo. Za pripravu radnih otopina masene koncentracije $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ izvagano je približno 10 mg uzorka svakog onečišćenja na mikrovagi te stavljeno u tikvice od 20 ml. U Tablici 6 prikazane su mase uzoraka. Odvagani uzorci onečišćenja ubačeni su zajedno s lađicom u odmjerne tikvice. Dodana je mala količina metanola kako bi se uzorci otopili, te su tikvice stavljene u ultrazvučnu kupelj na 2 minute. Nakon toga nadopunjene su metanolom do oznake.

Tablica 6. Odvagani uzorci

IMP 21	9,848 mg
IMP 22	10,9025 mg
IMP 24	9,9285 mg
IMP 27	10,2553 mg

Dobivene su 4 otopine onečišćenja u čistom metanolu masene koncentracije $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ u odmjernim tikvicama od 20 ml.

3.4.1. Priprema otopina za određivanje linearnosti

Za svaku komponentu pripravljena je stock otopina koja se dalje razrjeđivala na 3 koncentracijska nivoa da bi se dobile otopine željene koncentracije. Stock otopine priređene su otapanjem oko 10 mg svakog poznatog onečišćenja u tikvici sa 20 mL metanola.

Tako pripravljene stock otopine razrijeđene su 500 puta na način koji je prikazan u Tablici 7.

Tablica 7. Priprema otopina onečišćenja ceritiniba za podešavanje parametara analize

Razrjeđenje	Odmjerna tikvica / mL	Volumen pipetiranja / mL	Konačna masena koncentracija / mg mL^{-1}
*	25	1	$0,02 \text{ mg mL}^{-1}$
*	20	1	$1 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$

Mješavina otopina onečišćenja ceritiniba na razini $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ pripravljena je u odmjernoj tikvici od 20 mL. Otpipetiran je po 1 mL otopine svakog onečišćenja iz odmjernih tikvica prvog razrjeđenja (25 mL) te je tikvica nadopunjena čistim metanolom do oznake.

Za određivanje linearnosti metode priređena je standardna otopina glavne aktivne komponente ceritiniba i onečišćenja konačne masene koncentracije $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Iz otopine

masene koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ priređene su otopine nazivnih koncentracija kao što je prikazano u Tablici 8.

Tablica 8. Priprema otopina ceritiniba i poznatih onečišćenja za studiju linearnosti

Oznaka	Konačna masena koncentracija / ng mL ⁻¹	Priprema*		
		V _{RS} /mL	Iz otopine	V _{UK} / mL
L1	0,5	1	L5	20
L2	1	2	L5	20
L3	4	2	L7	20
L4	6	2	L8	20
L5	10	2	L10	20
L6	20	1	L10	5
L7	40	1	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	25
L8	60	3	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50
L9	80	2	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	25
L10	100	2	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	20

*Otopine L1 i L2 priređene su iz otopine L5. Otopine L5 i L6 priređene su iz otopine L10. Otopina L3 priređena je iz otopine L7. Otopina L4 priređena je iz otopine L8. Otopine L7, L8, L9, L10 priređene su iz otopine masene koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Otopine su rastočene u viala. Svaka od ovih otopina je analizirana i određena je površina ispod kromatografske krivulje. Nacrtna je baždarni dijagram iz kojeg je određen nagib pravca, odsječak i koeficijent regresije. Parametar prihvatljivosti koji se promatra je koeficijent korelacije regresijskog pravca.

3.4.2. Priprema otopina za određivanje analitičkog povrata

Priređeno je 12 odmernih tikvica od 10 mL. U svaku tikvicu dodano je približno po 20 mg CRT-B-21. Dodan je po 1 mL odgovarajuće stock otopine u svaku tikvicu te su nadopunjene do oznake s diluentom (9 mL) kako je prikazano u Tablici 9. Otopine su rastočene u viala.

Tablica 9. Priprema otopina za određivanje analitičkog povrata*

Konačna koncentracijska razina / ng mL ⁻¹	Masa CRT-b-21 / mg	Masena koncentracija stock otopine	Volumen stock otopine	Odmjerna tikvica / mL	Volumen metanola
4	20	40 ng mL ⁻¹	1	10	9
1	20	10 ng mL ⁻¹	1	10	9
100	20	1 µg mL ⁻¹	1	10	9
10	20	100 ng mL ⁻¹	1	10	9

*Sve otopine napravljene su u triplikatu

3.4.3. Priprema uzoraka za određivanje točnosti

Otopina masene koncentracije 1 ng mL⁻¹ pripremljena je iz stock otopine koncentracije 10 ng mL⁻¹ na način da je otpipetirano 2 mL stock otopine u tikvicu od 20 mL koja je nadopunjena metanolom do oznake. Navedena koncentracija odgovara granici kvantifikacije. Otopina masene koncentracije 4 ng mL⁻¹ priređena je na način da su otpipetirana 2 mL otopine masene koncentracije 40 ng mL⁻¹ u odmjernu tikvicu od 20 mL i nadopunjeno diluentom do oznake. Otopina masene koncentracije 40 ng mL⁻¹ pripremljena je pipetiranjem 1 mL otopine koncentracije 100 ng mL⁻¹ u odmjernu tikvicu od 25 mL te je također nadopunjena diluentom do oznake. Priprema otopina za studiju linearnosti masenih koncentracija 100 ng mL⁻¹, 40 ng mL⁻¹ i 10 ng mL⁻¹ navedena je u Tablici 8. Navedene otopine za određivanje studije točnosti pripremljene su u triplikatu. Priređene otopine analizirane su prema kromatografskim parametrima opisanim u točki 3.2.1.

Tablica 10. Priprema otopina za određivanje studije točnosti

Otopina	Volumen pipetiranja / mL	Stock otopina / ng mL ⁻¹	Odmjerna tikvica / mL
1 ng mL ⁻¹	2	10	20
4 ng mL ⁻¹	2	40	20
40 ng mL ⁻¹	1	100	25

3.4.4. Priprema uzoraka za određivanje granica kvantifikacije i detekcije

Granice detekcije i kvantifikacije još je jedan od načina za utvrđivanje karakteristike metode u kojem se u obzir uzimaju odzivi analita utvrđeni pri najnižim ispitivanim koncentracijama. Prema uputi za dozvoljene količine genotoksičnih onečišćenja u uzorcima aktivne tvari, limit(u ppm) računa se prema formuli: ²³

$$\text{Koncentracijski limit (ppm)} = \frac{TTC}{\text{doza}}$$

Gdje je TTC (engl. *Threshold of Toxicological Concern*) [$\frac{\mu\text{g}}{\text{dan}}$], a doza izražena u [$\frac{\text{g}}{\text{dan}}$].

Kako je dnevna doza ceritinib aktivne tvari 750 mg, a TTC dozvoljena razina dnevne doze unosa genotoksičnih onečišćenja 1,5 $\mu\text{g}/\text{dan}$, specifikacija za genotoksična onečišćenja u ceritinibu postavljena je na razini od 2 ppm, odnosno 4 ng mL^{-1} .

Priredene otopine analizirane su prema kromatografskim parametrima te im je određen omjer signala kromatografskog pika i šuma bazne linije. Kako bi se ispitala najniža koncentracija analita koja se može detektirati i kvantificirati, analiziran je niz otopina onečišćenja standarda vrlo niskih koncentracija.

S obzirom na specifikaciju postavljenu na 4 ng mL^{-1} , otopina masene koncentracije 1 ng mL^{-1} (0,5 ppm radne koncentracije uzorka) odabrana je kao granica kvantifikacije. Sve komponente prisutne u uzorku u udjelu većem od 0,5 ppm mogu se kvantitativno odrediti koristeći opisanu metodu. Granica kvantifikacije dodatno je potvrđena validacijom točnosti i linearnosti opisanim u točki 2.6. Otopina masene koncentracije 0,5 ng mL^{-1} (0,25 ppm radne koncentracije uzorka) odabrana je kao granica detekcije. Sve komponente prisutne u uzorku u udjelu većem od 0,25 ppm mogu biti detektirane ovom metodom.

3.5. Uvjeti mjerenja LC/MS analize

Uvjeti mjerenja navedeni su u tablicama 2, 3 i 4. Korišten je tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa s trostrukim kvadropolom Agilent 6490 s binarnom pumpom i kromatografskom kolonom YMC Triart C18, 100 mm × 2,0 mm, 1,9 μm, opremljen s ESI sustavom za ionizaciju, s uređajem za samouzorkovanje povezani s računalom sa softverom za upravljanje instrumentima, prikupljanje i obradu podataka. Mobilna faza A bila je 0,1 % HCOOH, a mobilna faza B acetonitril.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Linearnost

Ispitivanje linearnosti provedeno je za sva 4 onečišćenja te se postupak linearnosti procjenjuje u rasponu koncentracije od 0,5 do 100 ng mL⁻¹ pripremljenog analita u otapalu koristeći 10 točaka u kalibracijskoj krivulji. Razrjeđenja su napravljena kao što je opisano u točki 3.4.1. Kao donja granica ispitivanja linearnosti uzeta je granica detekcije masene koncentracije 0,5 ng mL⁻¹. Gornja granica postavljena je na 100 ng mL⁻¹. Rezultati su prikazani u tablicama 11-14.

Tablica 11. Rezultati studije linearnosti provedeni na **IMP 21**

Uzorak	Nivo* / ppm	Masena koncentracija / ng mL ⁻¹	Površina /AU**	R _f ***
L10	50	100	379706	3797060000
L9	40	80	300872	3760900000
L8	30	60	230125	3835416666
L7	20	40	151112	3777800000
L6	10	20	66142	3307100000
L5	5	10	45210	4521000000
L4	3	6	24312	4052000000
L3	2	4	13871	3467750000
L2	0,5	1	4648	4648000000
L1	0,25	0,5	3581	7162000000

*Koncentracijski nivo izražen s obzirom na masenu koncentraciju onečišćenja u uzorku za analizu (0,5 mg mL⁻¹)

**AU – proizvoljne jedinice

***R_f - faktor odgovora (engl. *Response factor*): omjer površine pika i koncentracije

Tablica 12. Rezultati studije linearnosti provedeni na IMP 22

Uzorak	Nivo / ppm	Masena koncentracija / ng mL ⁻¹	Površina /AU	R _f
L10	50	100	23478	234780000
L9	40	80	18645	233062500
L8	30	60	14131	235516666
L7	20	40	9395	234875000
L6	10	20	4841	242050000
L5	5	10	2534	253400000
L4	3	6	1398	233000000
L3	2	4	823	205750000
L2	0,5	1	226	226000000
L1	0,25	0,5	164	328000000

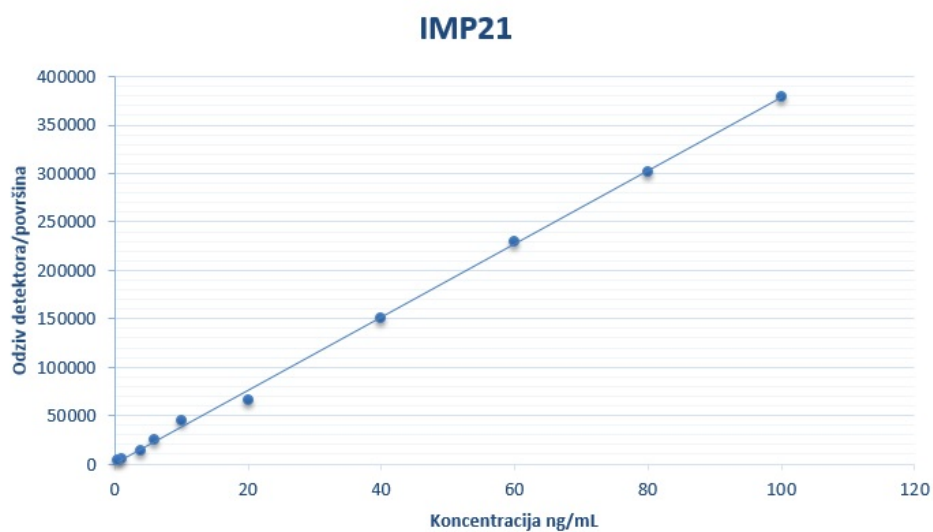
Tablica 13. Rezultati studije linearnosti provedeni na IMP 27

Uzorak	Nivo / ppm	Masena koncentracija / ng mL ⁻¹	Površina /AU	R _f R _f
L10	50	100	21035	210350000
L9	40	80	17012	212650000
L8	30	60	12578	209633333
L7	20	40	8374	209350000
L6	10	20	4251	212550000
L5	5	10	2095	209500000
L4	3	6	1098	183000000
L3	2	4	872	218000000
L2	0,5	1	212	212000000
L1	0,25	0,5	93	186000000

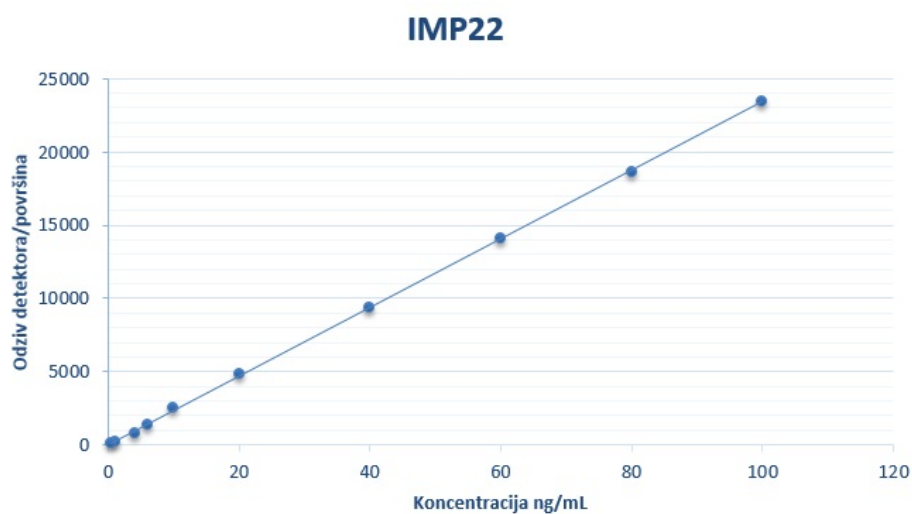
Tablica 14. Rezultati studije linearnosti provedeni na **IMP 24**

Uzorak	Nivo / ppm	Masena koncentracija / ng mL⁻¹	Površina /AU	Rf
L10	50	100	64957	649570000
L9	40	80	51911	648887500
L8	30	60	39011	650183333
L7	20	40	25792	644800000
L6	10	20	12516	625800000
L5	5	10	6521	652100000
L4	3	6	4278	713000000
L3	2	4	2897	724250000
L2	0,5	1	556	556000000
L1	0,25	0,5	354	708000000

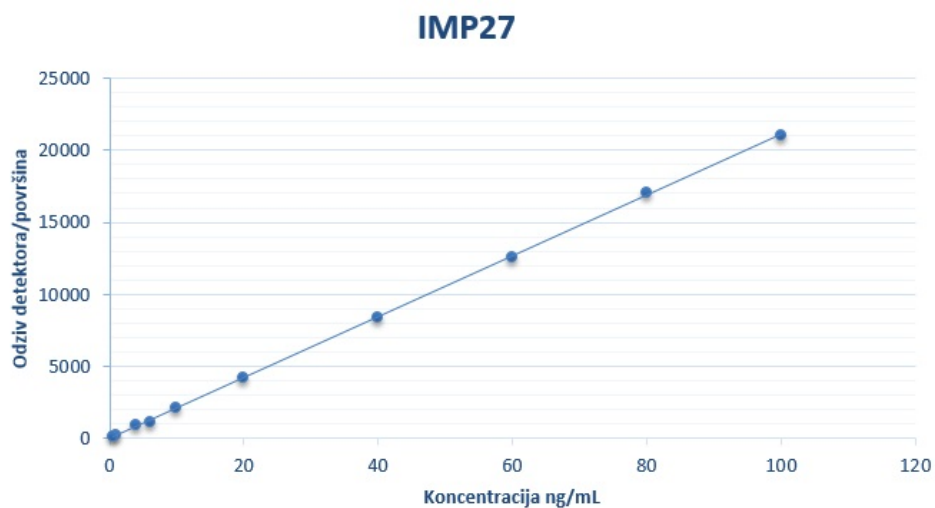
Na temelju rezultata prikazanih u Tablicama 11-14 provedene studije linearnosti grafički je prikazana ovisnost površine kromatografskog pika o koncentraciji standarda. Iz dobivenih površina nacrtani su dijagrami (Slike 7-10) iz kojih su određeni nagib pravca, odsječak i koeficijent regresije (Tablica 15).



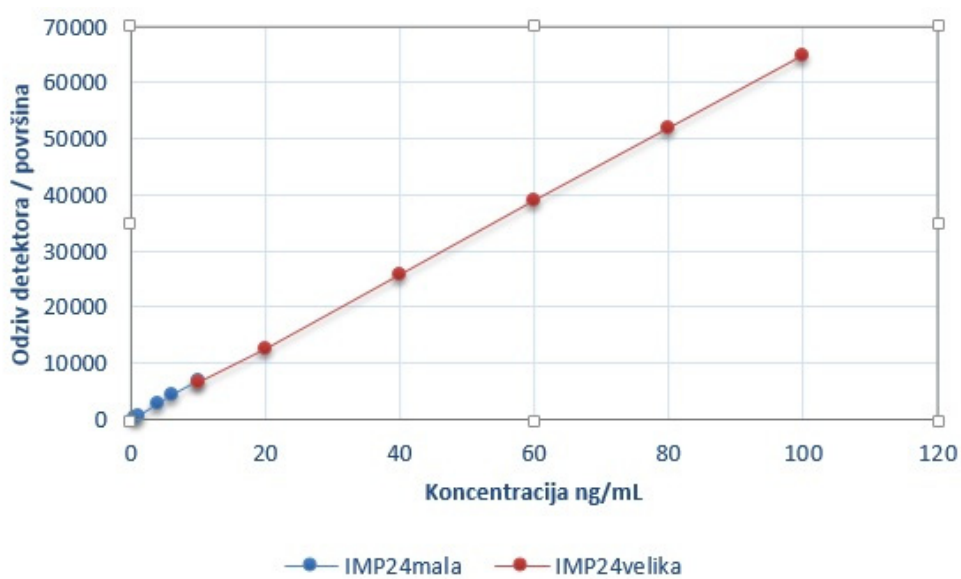
Slika 7. Grafički prikaz ovisnosti površine kromatografskog pika onečišćenja **IMP21** o koncentraciji



Slika 8. Grafički prikaz ovisnosti površine kromatografskog pika onečišćenja **IMP22** o koncentraciji



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti površine kromatografskog pika onečišćenja **IMP27** o koncentraciji



Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti površine kromatografskog pika onečišćenja **IMP24** o koncentraciji

Tablica 15. Linearnost onečišćenja

Onečišćenja	Jednadžba pravca	Odsječak (b)	Nagib pravca (a)	Koeficijent pravca regresije (R) ²
IMP21	$y = 3779,8x + 438,37$	438,37	3779,8	0,9991
IMP22	$y = 234,03x + 39,424$	39,424	234,03	0,9999
IMP27	$y = 211,26x - 29,891$	-29,891	311,26	0,9999
IMP24	$y = 652,03x - 237,06$	-237,06	652,03	0,9999

Na temelju dobivenih podataka vidljivo je da je metoda linearna za tri onečišćenja, IMP21, IMP22 i IMP27 u području od 0,5 ng mL⁻¹ do 100 ng mL⁻¹. Za onečišćenje IMP24 studija linearnosti podijeljena je na dvije; „malu“ (od razine 0,5 ng mL⁻¹ do 10 ng mL⁻¹) i „veliku“ (od 10 ng mL⁻¹ do 100 ng mL⁻¹) linearnost.

Za svaki analit, kalibracijska krivulja je linearna s koeficijentom pravca regresije (R²) većim od 0,9991. Može se zaključiti da je linearnost metode zadovoljavajuća u validiranom području.

Obzirom da je u navedenom rasponu koncentracija komponenti zabilježena linearna ovisnost odaziva detektora o koncentraciji, u svakodnevnoj analizi uzoraka nije potrebno pripremati kalibracijski pravac, već je dovoljna priprema standarda na jednom koncentracijskom nivou.

4.2. Točnost

Za određivanje točnosti metode pripremljene su otopine na tri koncentracijska nivoa, 1 ng mL⁻¹, 4 ng mL⁻¹ i 40 ng mL⁻¹ unutar radnog područja metode. Otopine su pripremljene u

triplikatu za svaki koncentracijski nivo. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 16-19. Za pripremu navedenih otopina, stock otopine su razrjeđene na način opisan u 3.4.3.

Tablica 16. Izračun studije točnosti za onečišćenje **IMP 21**

Uzorak	Masena koncentracija	Iskorištenje / %	<Iskorištenje> / %
IMP 21_1	1 ng mL ⁻¹	107,25	106,4
IMP21_2		107,73	
IMP21_3		104,28	
IMP 21_1	4 ng mL ⁻¹	87,85	92,2
IMP 21_2		89,38	
IMP 21_3		99,41	
IMP 21_1	40 ng mL ⁻¹	99,61	100,1
IMP 21_2		100,46	
IMP 21_3		100,28	

Tablica 17. Izračun studije točnosti za onečišćenje **IMP 22**

Uzorak	Masena koncentracija	Iskorištenje / %	<Iskorištenje> / %
IMP 22_1	1 ng mL ⁻¹	96,26	95,1
IMP22_2		89,00	
IMP22_3		100,10	
IMP 22_1	4 ng mL ⁻¹	85,43	92,3
IMP 22_2		95,14	
IMP 22_3		96,21	
IMP 22_1	40 ng mL ⁻¹	100,02	99,4
IMP 22_2		100,23	
IMP 22_3		98,02	

Tablica 18. Izračun studije točnosti za onečišćenje **IMP 24**

Uzorak	Masena koncentracija	Iskorištenje / %	<Iskorištenje> / %
IMP 24_1	1 ng mL ⁻¹	87,11	85,6
IMP24_2		88,39	
IMP24_3		81,26	
IMP 24_1	4 ng mL ⁻¹	104,21	102,6
IMP 24_2		102,67	
IMP 24_3		100,82	
IMP 24_1	40 ng mL ⁻¹	99,80	100,3
IMP 24_2		101,05	
IMP 24_3		99,99	

Tablica 19. Izračun studije točnosti za onečišćenje **IMP 27**

Uzorak	Masena koncentracija	Iskorištenje / %	<Iskorištenje> / %
IMP 27_1	1 ng mL ⁻¹	114,76	101,8
IMP27_2		99,14	
IMP27_3		91,57	
IMP 27_1	4 ng mL ⁻¹	106,79	107,1
IMP 27_2		109,75	
IMP 27_3		104,66	
IMP 27_1	40 ng mL ⁻¹	99,45	99,9
IMP 27_2		99,88	
IMP 27_3		100,37	

Iskorištenje u rasponu od 85,6 % do 107,1 % upućuje na to da se metoda može koristiti za rutinske analize onečišćenja u ceritinib aktivnoj supstanciji. Kroz provedenu studiju točnosti potvrđeno je da matrica ceritinib aktivne supstancije ne interferira s poznatim onečišćenjima, te ne utječe na njihovo kvantitativno određivanje. Ovi rezultati pokazuju dobru točnost metode.

4.3. Ponovljivost

Da bi se ispitala ponovljivost metode i pripreme uzorak ceritinib aktivne supstancije cijepljen je sa 4 onečišćenja – IMP21, IMP22, IMP24 I IMP27 na nivoima 0,5 ppm, 2 ppm i 20 ppm.

Rezultati su prikazani u Tablici 20.

Tablica 20. Ponovljivost metode

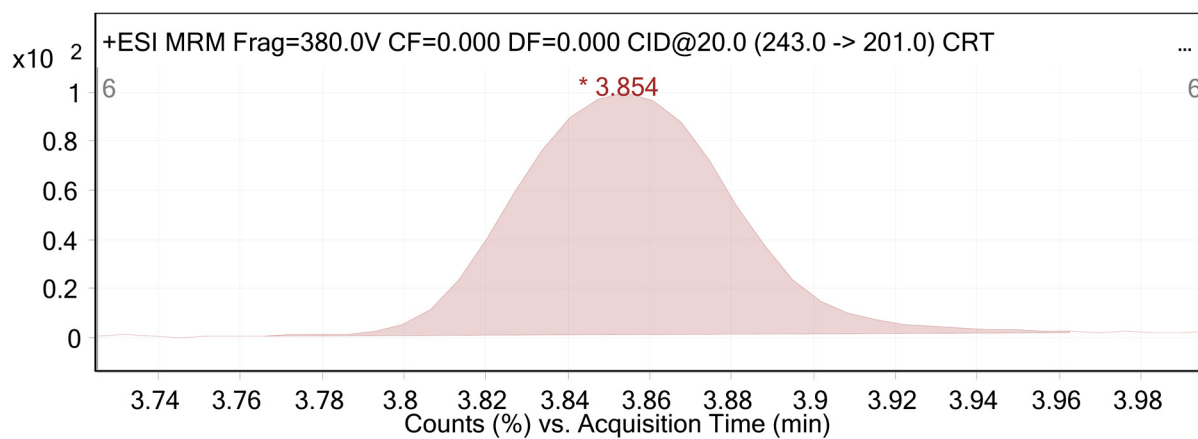
Onečišćenje	Masena koncentracija / ng mL ⁻¹	RSD / %
IMP21	1	1,5
	4	6,5
	40	0,4
IMP22	1	5,4
	4	6,3
	40	1,2
IMP24	1	4,6
	4	1,7
	40	0,7
IMP27	1	13,5
	4	2,5
	40	0,5

Na temelju dobivenih rezultata, s više injektiranja uzoraka potvrđeno je da je metoda ponovljiva, što je jedna od komponenata parametra validacije metode. Potvrđeno radno područje metode je u rasponu koncentracija 0,5 –100 ng mL⁻¹.

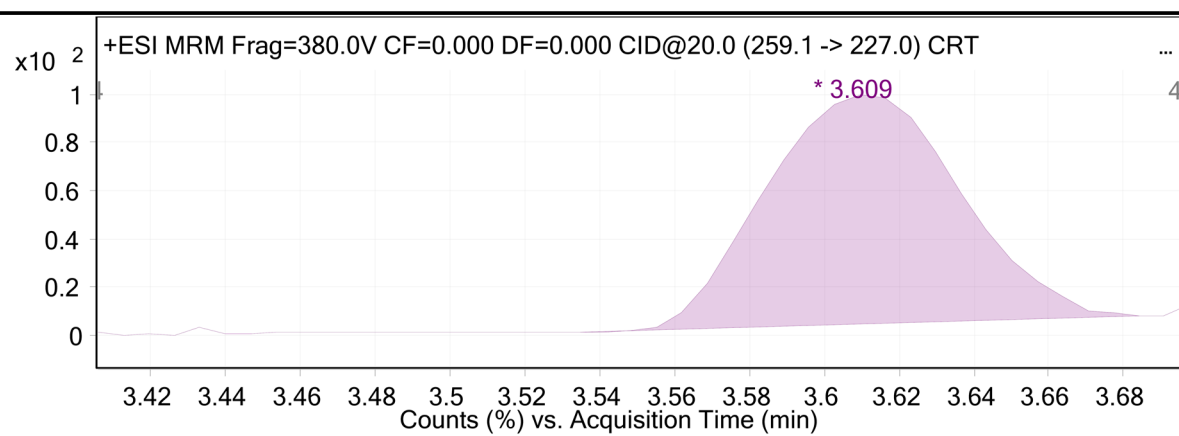
4.4. Analitički povrat

Određen je analitički povrat (engl. *Recovery*) 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 kao i one na samom vrhu kalibracijske krivulje.

Slike 11-14 prikazuju MS/MS spektre onečišćenja. Tablice 21-24 prikazuju recovery onečišćenja pri sljedećim razinama: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, 10 ng mL^{-1} , 40 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} .

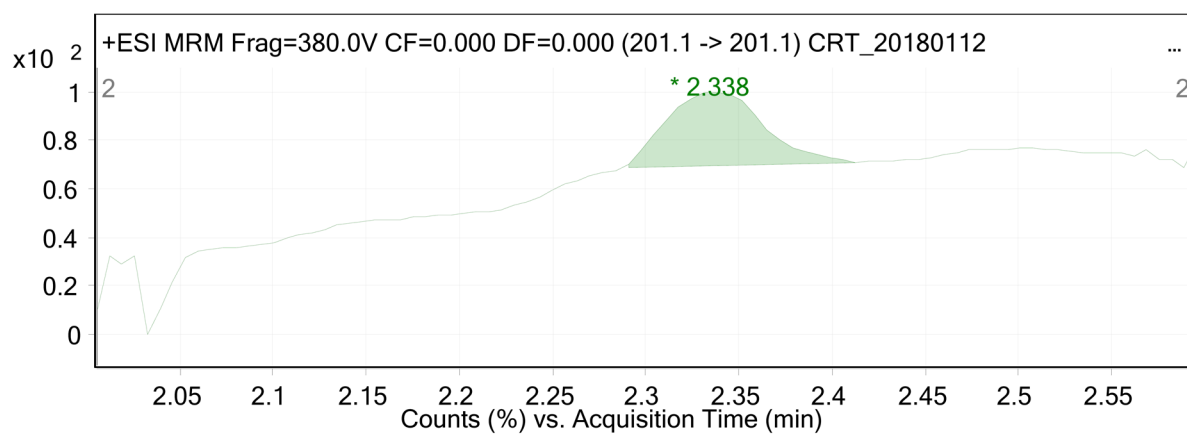


Slika 11. MS/MS spektar onečišćenja **IMP21**

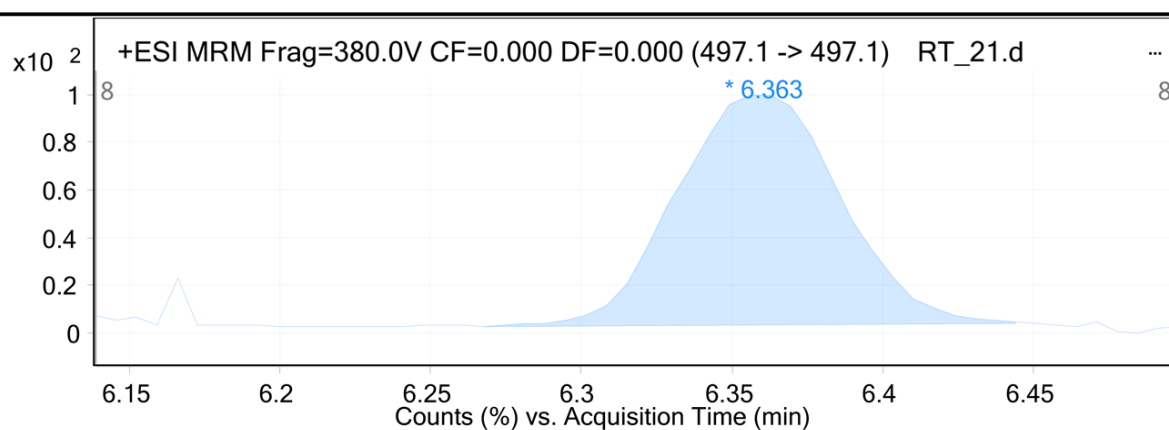


Slika 12. MS/MS spektar onečišćenja **IMP22**

Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



Slika 13. MS/MS spektar onečišćenja IMP24



Slika 14. MS/MS spektar onečišćenja IMP27

Tablica 21. Analitički povrat onečišćenja pri 10 ng mL⁻¹

Onečišćenja	Standardna otopina onečišćenja (prosjeak površina)	RSD / %	Cijepljene otopine (prosjeak površina)	RSD / %	Analitički povrat / %
IMP21	45238,00	0,3	45498,33	1,0	100,6
IMP22	2544,33	0,9	2428,33	1,1	95,4
IMP24	6879,33	0,5	6965,00	0,2	101,2
IMP27	2033,67	1,1	2103,00	0,9	103,4

Tablica 22. Analitički povrat onečišćenja pri razini specifikacije 40 ng mL⁻¹

Onečišćenja	Standardna otopina onečišćenja (prosjeak površina)	RSD / %	Cijepljene otopine (prosjeak površina)	RSD / %	Analitički povrat / %
IMP21	380707,00	0,2	407475,33	0,2	107,0
IMP22	23737,00	1,1	23987,33	0,1	101,1
IMP24	65028,33	0,1	60335,00	1,2	92,8
IMP27	21312,33	1,2	21959,67	0,2	103,0

Tablica 23. Analitički povrat onečišćenja pri razini 100 ng mL⁻¹

Onečišćenja	Standardna otopina onečišćenja (prosjek površina)	RSD / %	Cijepljene otopine (prosjek površina)	RSD / %	Analitički povrat / %
IMP21	14530,33	6,5	15581,00	0,5	107,2
IMP22	887,00	6,3	860,33	2,7	97,0
IMP24	2851,00	1,7	2621,00	1,6	91,9
IMP27	874,33	2,5	904,00	0,7	103,4

Tablica 24. Analitički povrat onečišćenja pri razini 1 µg mL⁻¹

Onečišćenja	Standardna otopina onečišćenja (prosjek površina)	RSD / %	Cijepljene otopine (prosjek površina)	RSD / %	Analitički povrat / %
IMP21	4616,67	1,5	4620,67	1,1	100,1
IMP22	245,33	5,4	226,67	5,1	92,4
IMP24	560,67	4,3	454,00	5,9	81,00
IMP27	184,67	13,5	189,00	4,3	102,3

4.5. Granice kvantifikacije i detekcije

Prihvatljivi omjer S/N za granicu kvantifikacije je 10:1. U Tablici 25. prikazane su vrijednosti omjera S/N svih onečišćenja u određivanim uzorcima.

Tablica 25. Prikaz omjera signala šuma i signala kromatografskog pika

UZORAK*	Prosjek S/N 1 ng mL ⁻¹	Prosjek S/N 0,5 ng mL ⁻¹
CRT IMP 21	229	102
CRT IMP 22	11	9
CRT IMP 24	25	11
CRT IMP 27	12	9

*Prosječna vrijednost 6 injektiranja svakog onečišćenja

Za granicu kvantifikacije određena je vrijednost 1 ng mL⁻¹, a za granicu detekcije vrijednost 0,5 ng mL⁻¹.

4.6. Robusnost

Ovaj parametar označava rezistentnost analitičkog postupka na male, namjerne promjene parametara metode. Kod ispitivanja robusnosti mijenjaju se radni parametri unutar realnih granica te se prati kvantitativna promjena rezultata. Potrebno je držati pod nadzorom parametre koji bi mogli utjecati na rezultate metode. Pri ispitivanju robusnosti metode korišten je tradicionalni pristup na način da se mijenjao parametar po parametar analize. Mijenjani su parametri prema sljedećoj tablici:

Tablica 26. Varijacije analitičkih parametara

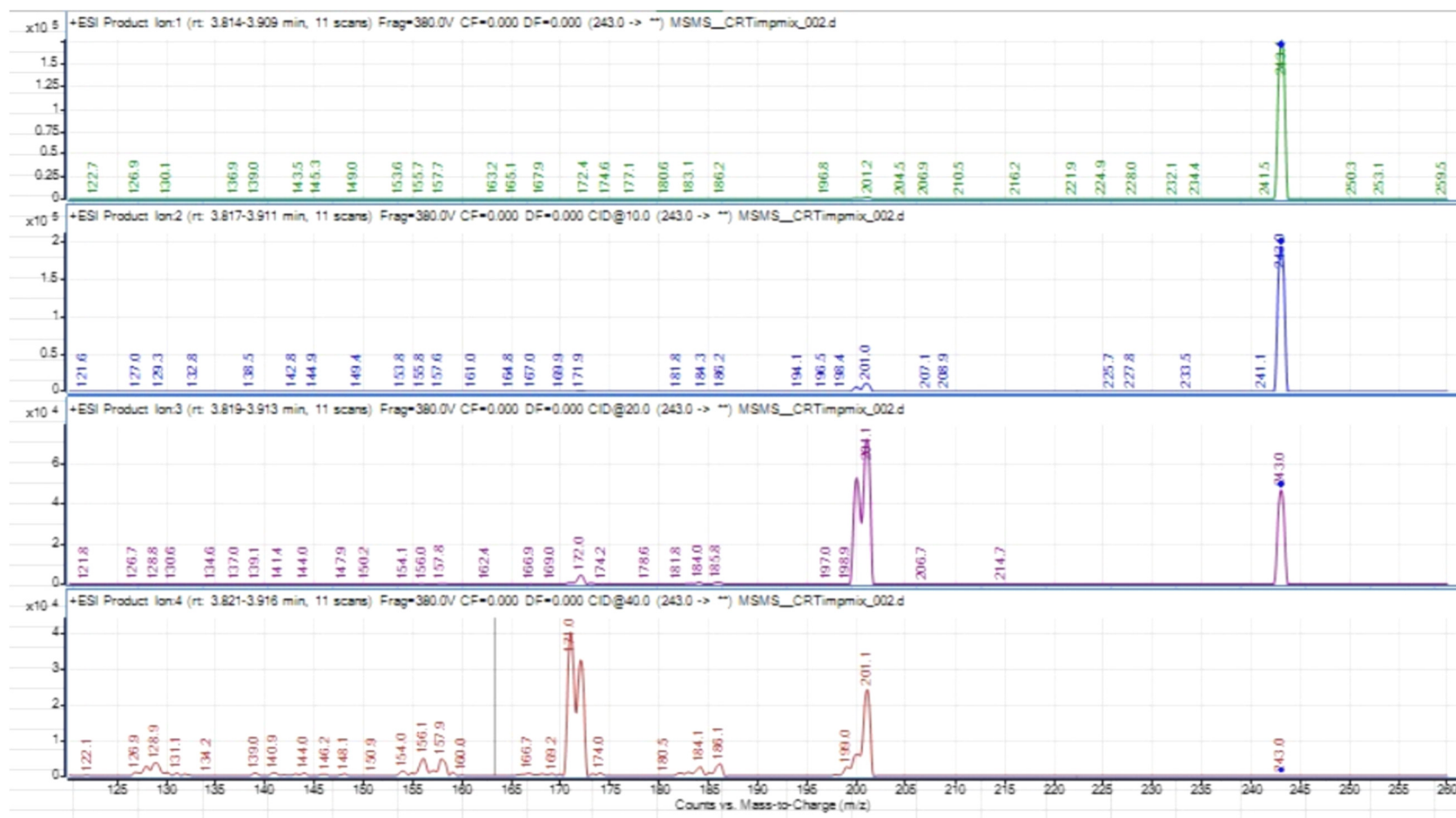
Kromatografska kolona	Protok / mL min ⁻¹	Temperatura kolone/ °C
YMC Triart C18 100 x 2.0 mm, 1.9 μm	0,45	33
YMC Triart C18 100 x 2.0 mm, 1.9 μm	0,55	27

Koristile su se nove kromatografske kolone no iste veličine kao i pri validaciji metode. Analitička metoda je otporna na varijacije analitičkih parametara.

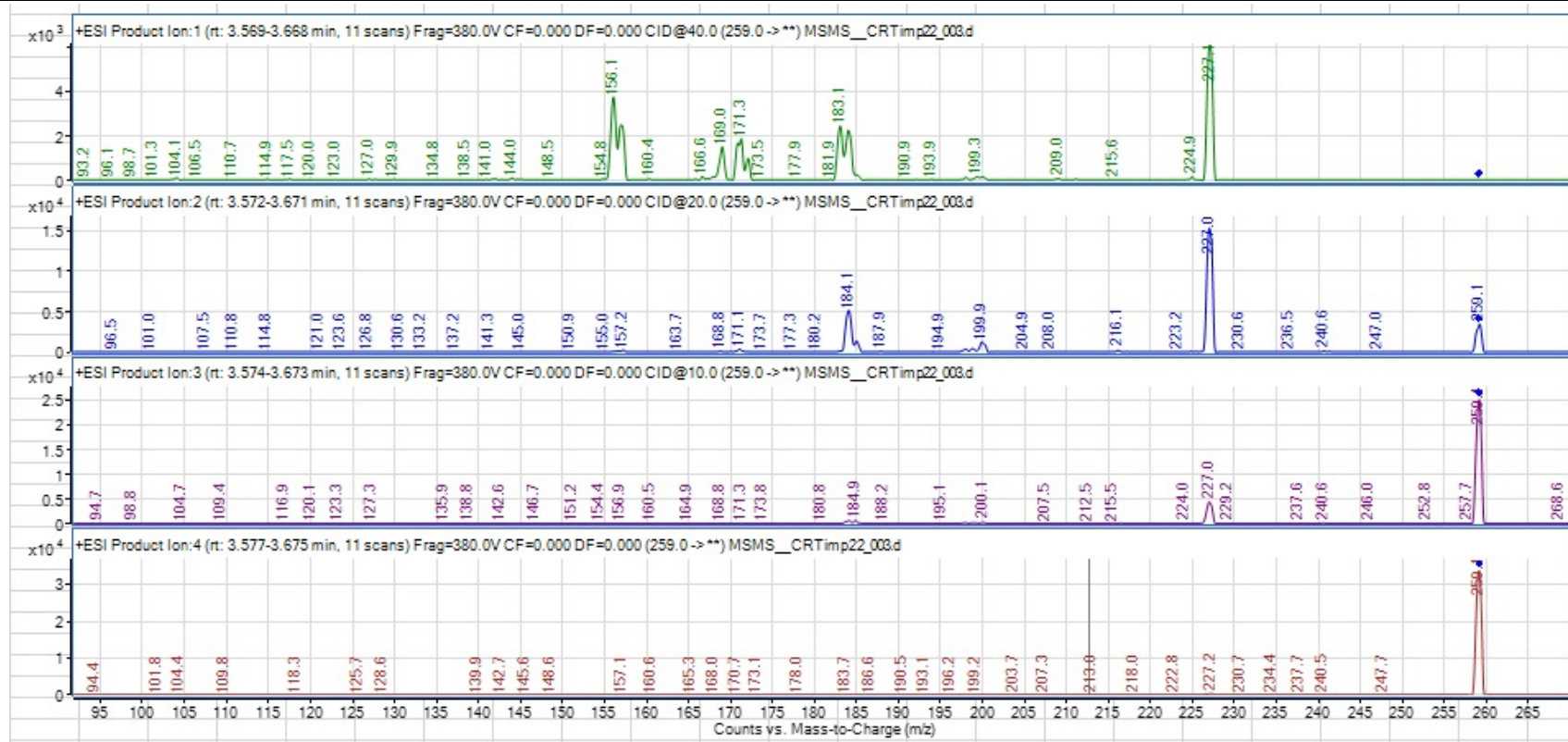
4.7. Rezultati analize LC-MS/MS

Analiza otopina onečišćenja provedena je metodom tekućinske kromatografije – tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS). Korišten je sustav HPLC Agilent 1290 i trostruki kvadrupol LC/MS 6490 TripleQuad, a tekućinskokromatografski uvjeti navedeni su u točki 3.2.1. Prilikom MS/MS analize uzorka primjenjeno je praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple reaction monitoring*, MRM), što je ujedno i najčešći način u rutinskoj tandemnoj spektrometriji masa.

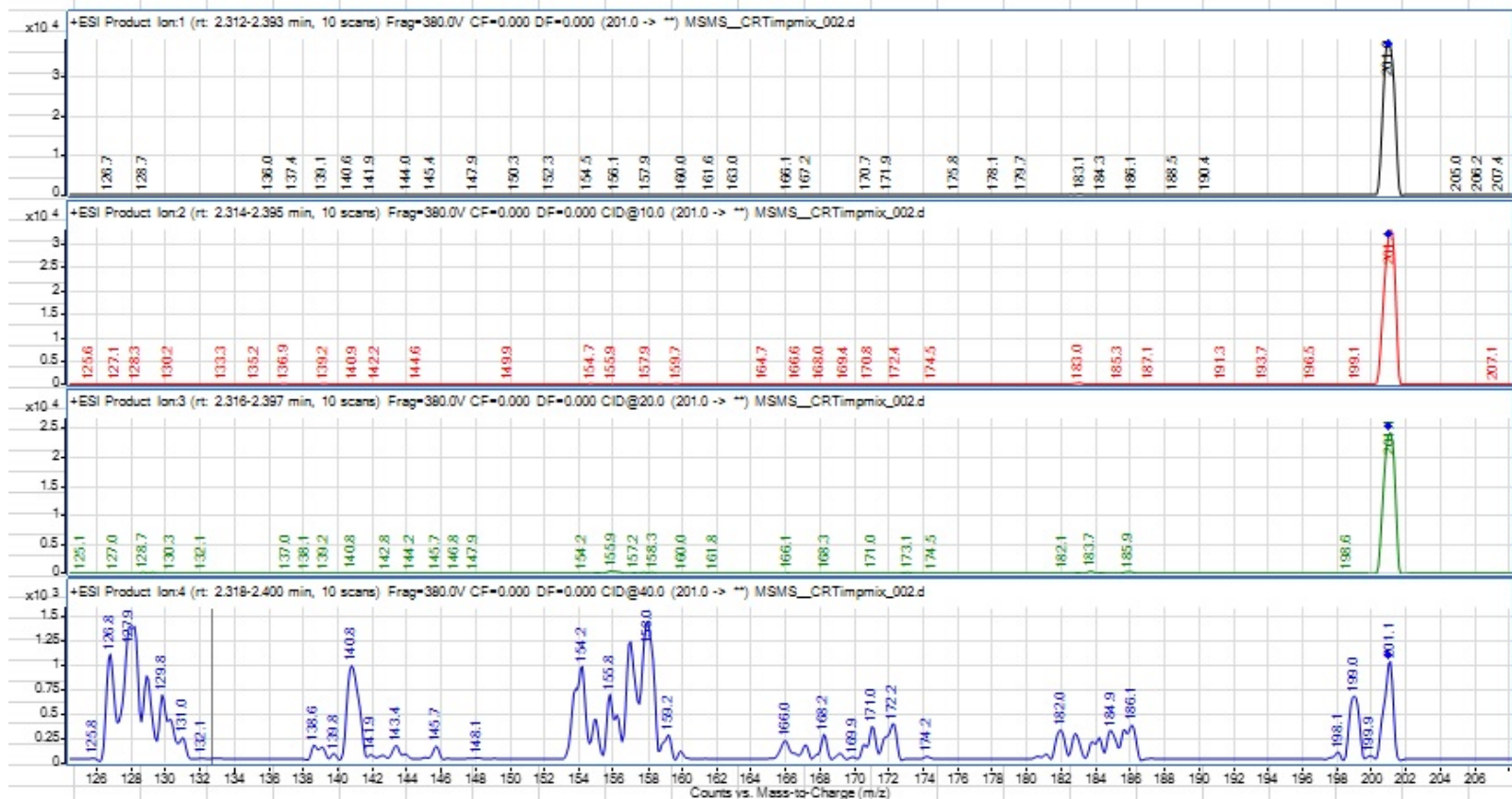
Analizirale su se otopine masene koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ uz primjenu različitih energija sudara. Kolizijske energije iznosile su: 0, 10, 20 i 40 eV. Snimanjem spektra uzorka pri kolizijskoj energiji od 0 eV potvrđena je masa svakog onečišćenja. Ukoliko je došlo do fragmentacije pri određenim kolizijskim energijama, iz spektra su očitane mase fragmenata. Spektri masa sva 4 onečišćenja pri navedenim kolizijskim energijama dani su na slikama 15-18, a mase fragmentnih iona u Tablici 26.



Slika 15. MS/MS spektar onečišćenja IMP21 pri svim kolizijskim energijama (0, 10, 20, 40 eV)



Slika 16. MS/MS spektar onečišćenja IMP22 pri svim kolizijskim energijama (0, 10, 20, 40 eV)



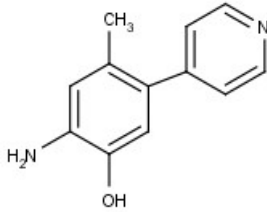
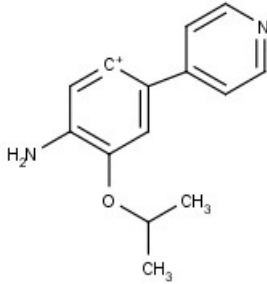
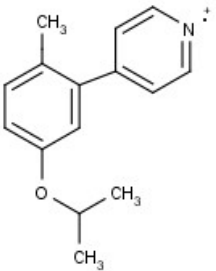
Slika 17. MS/MS spektar onečišćenja IMP24 pri svim kolizijskim energijama (0, 10, 20, 40 eV)



Slika 18. MS/MS spektar onečišćenja IMP27 pri svim kolizijskim energijama (0, 10, 20, 40 eV)

Na Slikama 15-18 prikazani su MS/MS spektri svih onečišćenja pri svim navedenim kolizijskim energijama. Nakon toga odabrane su dvije kolizijske energije te je jedna u konačnici odabrana za metodu i validaciju metode.

Tablica 27. Prikaz strukture dobivenih fragmenata na odabranim energijama

ONEČIŠĆENJA	Odabrana kolizijska energija	Tip mjerenja	Strukture fragmenata	Masa
IMP21	20 eV	MRM		Masa = 200,2365 Točna masa = 200,094963016
IMP22	20eV	MRM		Masa = 227,2817 Točna masa = 227,118438112
		MRM		Masa = 227,3016 Točna masa = 227,131014171
IMP24	0 eV	SIM*	/	/
IMP27	0 eV	SIM*	/	/

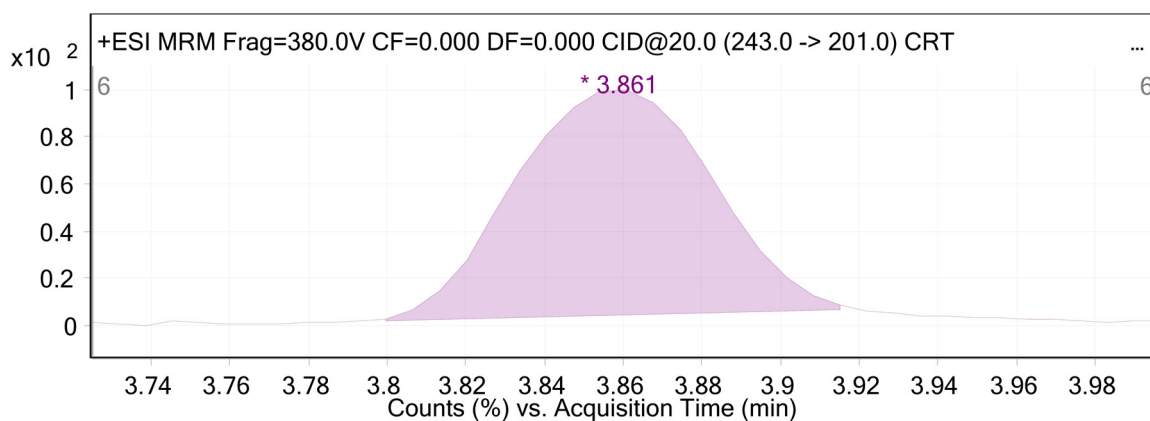
*Praćen je samo molekularni ion preko SIM načina mjerenja, te pri kolizijskoj energiji 0 eV nije došlo do fragmentacije onečišćenja IMP24 i IMP27.

Za onečišćenje IMP21 isprobane su 0 i 20 kolizijske energije te je odabrana 20 eV. Za onečišćenje IMP22 isprobane su 10 i 20 kolizijske energije te je odabrana 20 eV. Za onečišćenje IMP24 isprobane su 0 i 20 kolizijske energije te je odabrana 0 eV. Za onečišćenje IMP27 isprobane su 0 i 20 kolizijske energije te je odabrana 0 eV.

4.7.1. LC-MS/MS analiza onečišćenja pri granici kvantifikacije 1 ng mL⁻¹

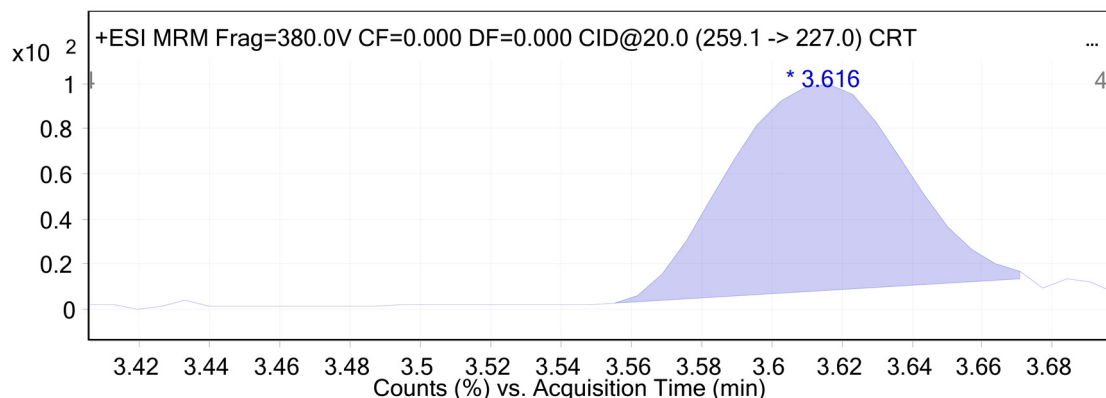
Pripremljene su otopine sva 4 onečišćenja pri granici kvantifikacije 1 ng mL⁻¹. Otopine su pripremljene razrjeđivanjem stock otopine koncentracije 100 ng mL⁻¹, na način da je otpipetirano 2 mL stock otopine u odmjernu tikvicu od 20 mL te je nadopunjena metanolom do oznake. Dobivena otopina masene koncentracije 10 ng mL⁻¹ korištena je za pripravu otopina svih onečišćenja pri granici kvantifikacije 1 ng mL⁻¹ tako da su otpipetirana 2 mL u tikvicu od 20 mL te je nadopunjena metanolom do oznake. Prikazani su pikovi dobiveni MRM (IMP 21, IMP22) I SIM (IMP24, IMP27) načinom snimanja pri odabranim kolizijskim energijama na razini kvantifikacije na Slikama 19-22.

Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 20 Ionization Mode ESI



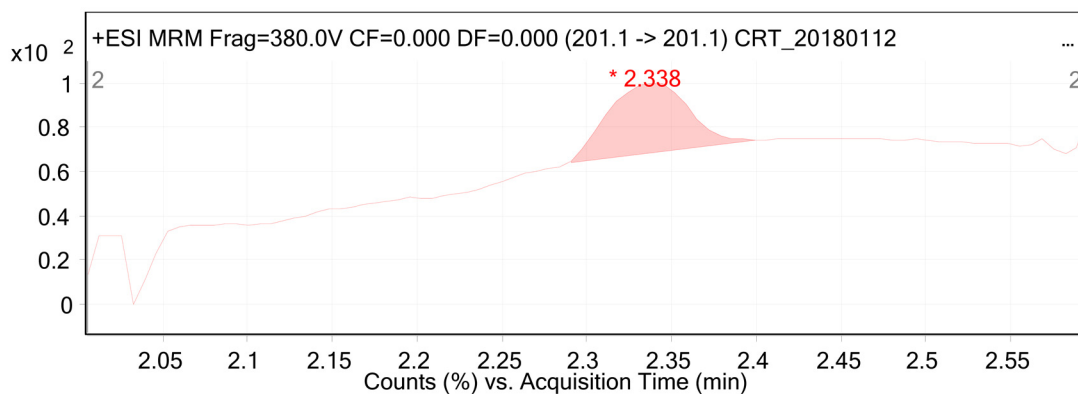
Slika 19. MS/MS analiza IMP21

Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 20 Ionization Mode ESI



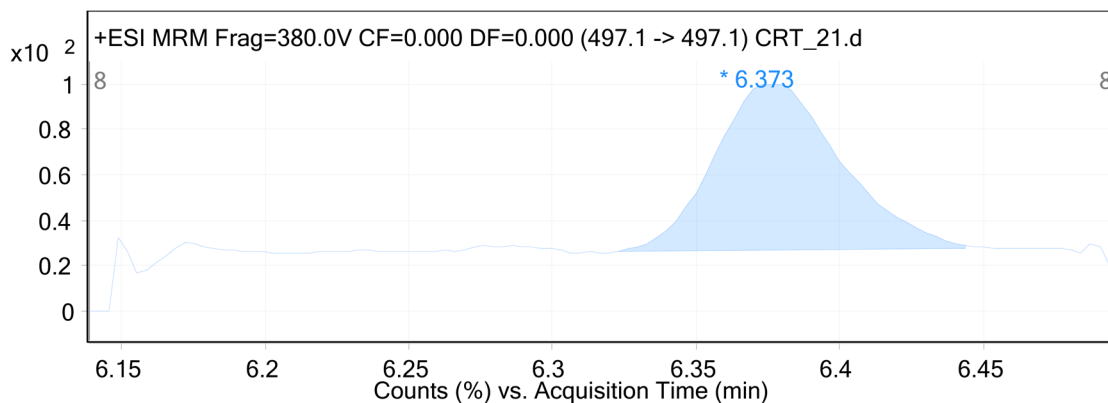
Slika 20. MS/MS analiza IMP22

Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



Slika 21. MS/MS analiza IMP24

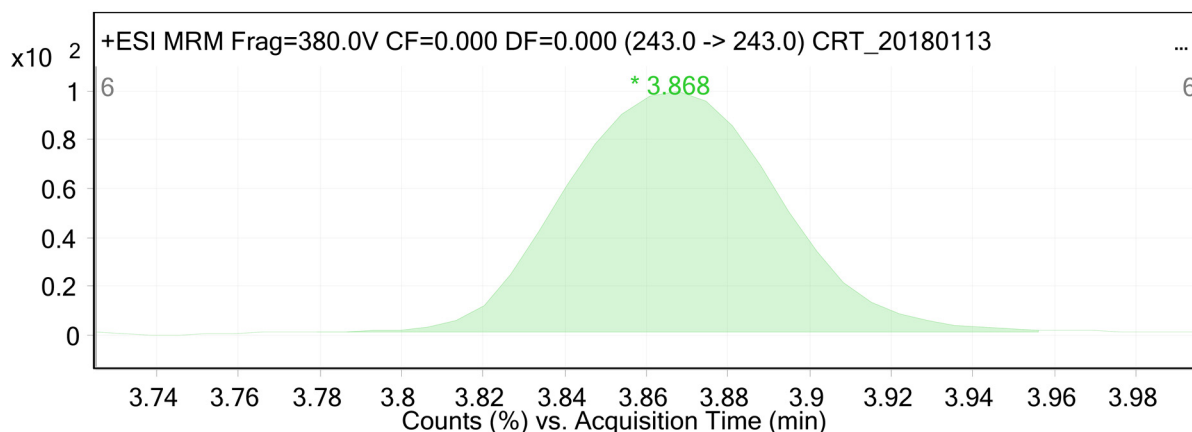
Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



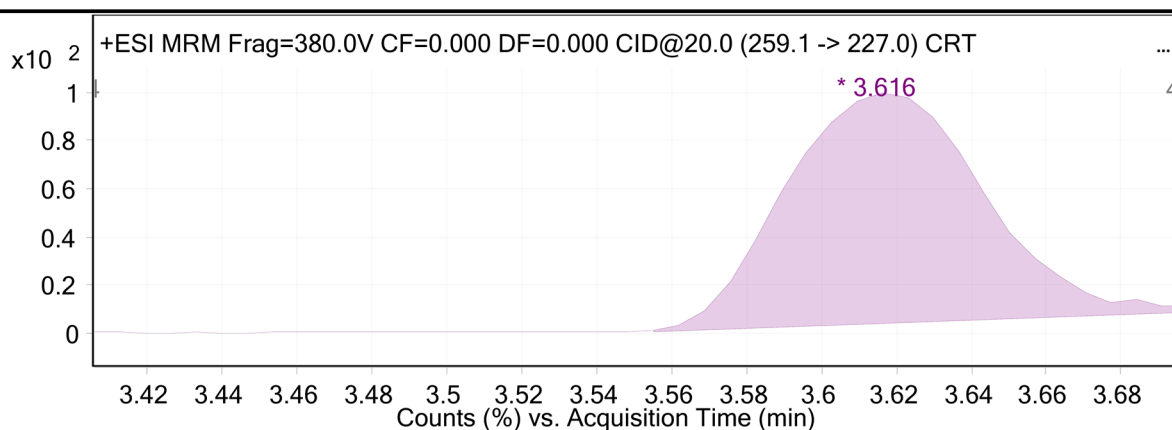
Slika 22. MS/MS analiza IMP27

4.7.2. LC-MS/MS analiza onečišćenja na razini specifikacije 4 ng mL⁻¹

Pripremljene su otopine sva 4 onečišćenja na razini specifikacije 4 ng mL⁻¹. Otopine su pripremljene razrjeđivanjem stock otopine koncentracije 1 µg mL⁻¹, na način da je otpipetiran 1 mL stock otopine u odmjernu tikvicu od 25 mL te je tikvica nadopunjena metanolom do oznake. Dobivena otopina masene koncentracije 40 ng mL⁻¹ korištena je za pripravu otopina svih onečišćenja na razini specifikacije 4 ng mL⁻¹ tako što su otpipetirana 2 mL stock otopine u tikvicu od 20 mL te je ista nadopunjena metanolom do oznake. Prikazani su pikovi dobiveni MRM (IMP 21, IMP22) I SIM (IMP24, IMP27) načinom snimanja pri odabranim kolizijskim energijama na razini specifikacije na Slikama 19-22.

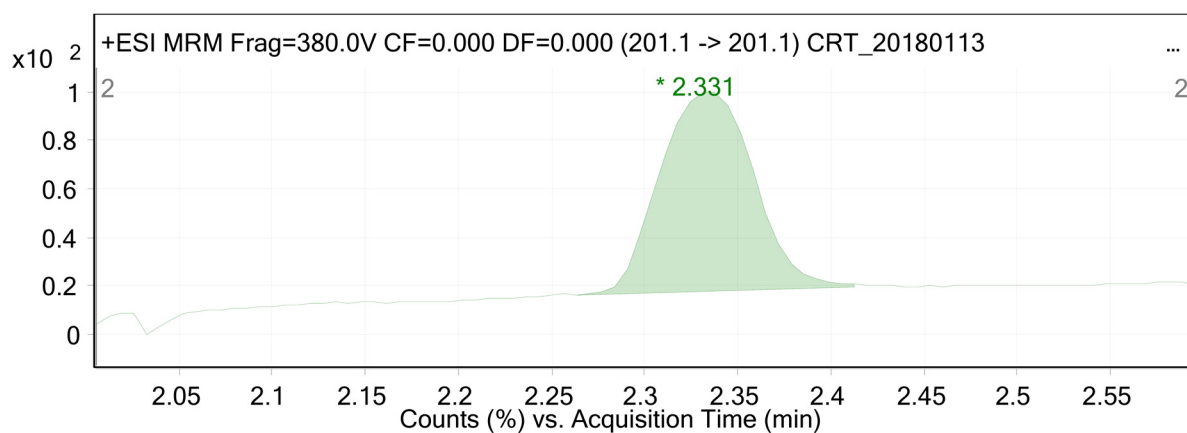


Slika 23. MS/MS analiza IMP21



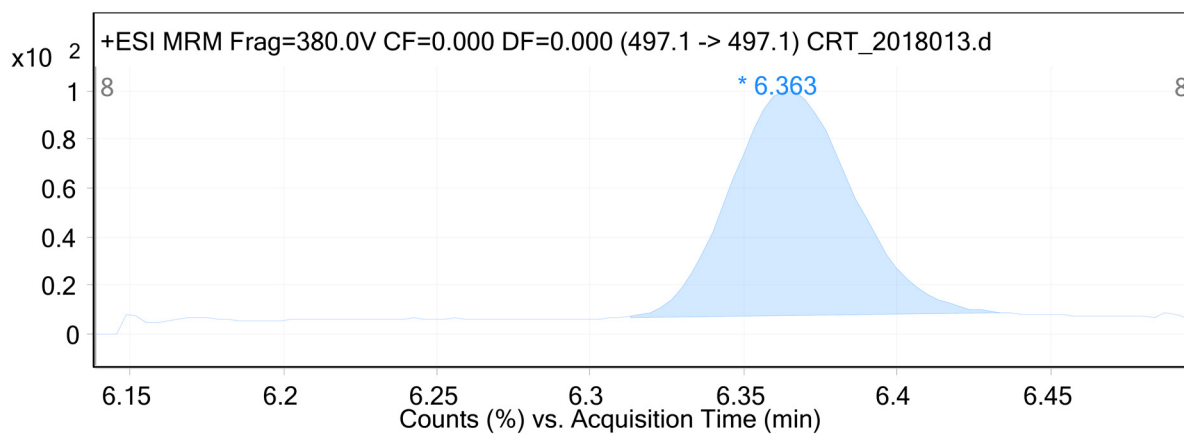
Slika 24. MS/MS analiza IMP22

Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



Slika 25. MS/MS analiza **IMP24**

Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



Slika 26. MS/MS analiza **IMP27**

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu potvrđeno je da je metoda određivanja potencijalnih genotoksičnih onečišćenja ceritiniba tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti linearna, točna i robusna. LC-MS/MS metoda je potvrdna metoda za analizu onečišćenja koja je točna, osjetljiva, selektivna, precizna i automatizirana, kao i primjenjiva na širok raspon analita i vrstu uzoraka. Određene su granice detekcije i kvantifikacije te iznose $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ i 1 ng mL^{-1} . Ispitivanjem odziva detektora za sva 4 onečišćenja u rasponu od $0,5$ do 100 ng mL^{-1} potvrđena je odgovarajuća linearnost metode za onečišćenja IMP21, IMP22 i IMP27. Za onečišćenje IMP24 dobivene su dvije linearnosti; „mala“ linernost u rasponu od $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ do 10 ng mL^{-1} , i „velika“ linearnost u području od 10 ng mL^{-1} do 100 ng mL^{-1} . Točnost metode ispitana je na tri koncentracijska nivoa, 1 ng mL^{-1} , 4 ng mL^{-1} i 40 ng mL^{-1} te je prikazana postotkom iskorištenja koji se kreću u rasponu od $85,6 \%$ do $107,1 \%$. U eksperimentu robusnosti potvrđeno je da manje promjene kromatografskih parametara kao što su temperatura kolone, nova kolona i brzina protoka faze ne utječu na efikasnost kromatografskog razdvajanja analita od ostalih komponenti matrice.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

OZNAKA	NAZIV
ALK	Kinaza aplastičnog limfoma
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
ICH	Internacionalne konferencije za harmonizaciju (engl. <i>International Conference on Harmonisation</i>)
ESI	Ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>ElectroSpray Ionization</i>)
FDA	Organizacija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
LC	Tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS/MS	Tekućinska kromatografija- tandemna spektrometrija masa (engl. <i>Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry</i>)
LOD	Granica detekcije (engl. <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Granica kvantifikacije (engl. <i>Limit of Quantification</i>)
MRM	Praćenje višestrukih reakcija (engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
SIM	Praćenje odabranih iona (engl. <i>Selected Ion Monitoring</i>)
M/Z	Omjer mase i naboja (engl. <i>Mass-Charge ratio</i>)

NSCLC	Rak pluća ne-malih stanica (engl. <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
PPM	Engl. Parts per Million
S/N	Omjer signala i šuma
QQQ	Trostruki kvadrupol (engl. <i>Triple Quadrupol</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. 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.
2. http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170726138214/anx_138214_hr.pdf (datum pristupa 16.01. 2018.)
3. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ceritinib#section=2D-Structure> (datum pristupa 15.01.2018.)
4. J. Kaczmar, R. Mehra, *Ther. Adv. Respir. Dis.* **9** (2015) 236–241.
5. S. Khozin, G. M. Blumenthal, L. Zhang, S. Tang, M. Brower, E. Fox, W. Helms, R. Leong, P. Song, Y. Pan, Q. Liu, P. Zhao, H. Zhao, D. Lu, Z. Tang, A. Al Hakim, K. Boyd, P. Keegan, R. Justice, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **21** (2015) 2436–2439.
6. A. T. Shaw, T. M. Kim, L. Crino, C. Gridelli, K. Kiura, G. Liu, S. Novello, A. Bearz, O. Gautschi, T. Mok, M. Nishio, G. Scagliotti, D. R. Spigel, S. Deudon, C. Zheng, S. Pantano, P. Urban, C. Massacesi, K. Viraswami-Appanna, E. Felip, *J.-Lancet*, **18** (2017) 874–886.
7. O. Heudi, D. Vogel, Y.Y. Lau, F. Picard, O. Kretz, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406** (2014) 7389–7396.
8. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf
9. Genotoxic impurities in pharmaceutical products, Agilent technologies, 2013 <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-1876EN.pdf>
10. ICH harmonised guideline M7, 2015 http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Addendum_Step_2.pdf
11. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina* **45** (2009) 218–232.
12. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.

-
13. N. Galić, V. Drevenkar, Kromatografija, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
 14. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm (datum pristupa 21.01.2018.)
 15. J. H. Gross, Mass Spectrometry, Springer, Heidelberg, 2004.
 16. N. Galić, Spektrometrija masa, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
 17. N. Galić, *Kem. u Ind.* **53** (2004) 117–123.
 18. N. B. Cech, C. G. Enke, *Mass. Spectrom. Rev.* **20** (2001) 362–387.
 19. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry, Principles and Applications 3th*, Wiley, 2007.
 20. https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass_sp (datum pristupa 05.02.2018.)
 21. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf> (datum pristupa 05.02.2018.)
 22. ICH Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Secretariat, 2006, <http://www.ich.org> (datum pristupa 06.02.2018.)
 23. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf (datum pristupa 14.02.2018.)

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Vedrana Jurković

Datum rođenja: 29.05.1993.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2000.-2008. Osnovna škola „Antun Mihanović“, Slavonski Brod

2008.-2012. Opća gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod

2012.-2015. Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera, Osijek

2015.-2018. Sveučilišni diplomski studij kemije- istraživački smjer (analitička kemija i biokemija), Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2015./2016. Rektorova nagrada Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

Travanj, 2016. *Otvoreni dan PMF-a*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Radno iskustvo- ostalo

Od travnja, 2017. Rad u odjelu Farmakovigilancije, PLIVA HRVATSKA d.o.o.