

# Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu razgradnih produkata lijeka dasatiniba

---

Šestan, Davor

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:128694>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-01**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Davor Šestan

**RAZVOJ METODE TEKUĆINSKE  
KROMATOGRFIJE ULTRAVISOKE  
DJELOTVORNOSTI ZA ANALIZU  
RAZGRADNIH PRODUKATA LIJEKA  
DASATINIBA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2017.



Ovaj diplomski rad izrađen je u TAPI Pliva R&D Analitika, pod mentorstvom prof. dr. sc.  
Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Mislava Runje, dipl. kem. inž.





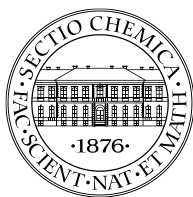
## **Zahvale**



## Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Dasatinib</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. <i>Kronična mijelocitna leukemija – uzrok, simptomi i liječenje</i> .....	4
2.1.2. <i>Određivanje dasatinib-a</i> .....	5
<b>2.2. Tekućinska kromatografija<sup>12</sup></b> .....	<b>6</b>
2.2.1. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti</i> .....	7
2.2.2. <i>Kromatografski parametri</i> .....	8
2.2.3. <i>UHPLC</i> .....	10
<b>2.3. Spektrometrija masa</b> .....	<b>11</b>
2.3.1. <i>Spektrometar masa</i> .....	11
<b>2.4. Primjena vezanog sustava UPLC-MS u farmaceutskoj industriji</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5. Forsirana razgradnja aktivnih farmaceutskih tvari</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6. DryLab metoda</b> .....	<b>17</b>
<b>2.7. Metoda SIM</b> .....	<b>18</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Popis polaznog materijala</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Priprava otopina za UHPLC analizu</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3. Priprava otopina za forsiranu degradaciju</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4. Uvjeti mjerenja UHPLC analize</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5. DryLab metoda</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6. Uvjeti mjerenja LC-MS i LC-MS/MS analize</b> .....	<b>36</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1. Rezultati UHPLC analiza</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2. Rezultati DryLab metode i analize robusnosti</b> .....	<b>39</b>
<b>4.3. Analiza razgradnih produkata dasatiniba vezanim sustavom LC-MS</b> .....	<b>42</b>
<b>4.4. Analiza razgradnih produkata dasatiniba vezanim sustavom LC-MS/MS</b> .....	<b>49</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>58</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)</b> .....	<b>59</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI</b> .....	<b>60</b>
<b>§ 8. DODATAK</b> .....	<b>XV</b>

<b>8.1.</b>	<b>Kromatogrami smjesa dasatiniba i poznatih onečišćenja na različitim kolonama .....</b>	<b>xv</b>
<b>8.2.</b>	<b>Kromatogrami slijepe probe, dasatiniba i poznatih onečišćenja na koloni <i>Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm</i> pri uvjetima: temperatura kolone = 30 °C, pH fosfatnog pufera = 2 i vremene gradijentnog eluiranja = 25 min.....</b>	<b>xix</b>
<b>8.3.</b>	<b>Kromatogrami slijepih proba i otopine dasatiniba i poznatih nečistoća u ovisnosti o pH-vrijednosti, temperaturi kolone (Tg) i vremenu gradijenog eluiranja (tg) na koloni <i>Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm × 2,1 mm × 100 mm</i>.....</b>	<b>xxi</b>
<b>8.4.</b>	<b>Kromatogrami slijepih proba i otopine dasatiniba i poznatih nečistoća u ovisnosti o pH-vrijednosti, temperaturi kolone (Tg) i protoku mobilne faze na koloni <i>Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm × 2,1 mm × 100 mm</i>.....</b>	<b>xli</b>
<b>8.5.</b>	<b>Kromatogrami kontrolnog uzorka i uzoraka otopine dasatiniba podvrgnutog forsiranog razgradnji na koloni <i>Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm</i> pri uvjetima: temperatura kolone (Tg) = 50 °C, vremene gradijentnog eluiranja (tg) = 25 min i pH-vrijednosti fosfatnog pufera = 2 .....</b>	<b>xlvi</b>
8.5.1.	<i>Kontrolni uzorak .....</i>	<i>xlvi</i>
8.5.2.	<i>Razgradnja u kiselom.....</i>	<i>xlvi</i>
8.5.3.	<i>Razgradnja u lužnatom .....</i>	<i>xlix</i>
8.5.4.	<i>Razgradnja s peroksidom.....</i>	<i>l</i>
8.5.5.	<i>Razgradnja na povišenoj temperaturi.....</i>	<i>l</i>
<b>8.6.</b>	<b>Rezultati LC-MS analize .....</b>	<b>li</b>
8.6.1.	<i>Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji.....</i>	<i>li</i>
8.6.2.	<i>Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s 0,1 mol dm<sup>-1</sup> HCl. lii</i>	<i>lii</i>
8.6.3.	<i>Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s 1 mol dm<sup>-1</sup> HCl...liv</i>	<i>liv</i>
8.6.4.	<i>Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s 0,1 mol dm<sup>-1</sup> NaOHlvi</i>	<i>lvi</i>
8.6.5.	<i>Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s 1 mol dm<sup>-1</sup> NaOHlviii</i>	<i>lviii</i>
8.6.6.	<i>Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</i>	<i>lix</i>
8.6.7.	<i>Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji pri povišenoj temperaturi ( 60°C ).....</i>	<i>lxi</i>
8.6.8.	<i>Rezultati LC-MS/MS analize .....</i>	<i>lxiii</i>
<b>§ 9.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>LXVIII</b>



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

Diplomski rad

## SAŽETAK

Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu razgradnih produkata lijeka dasatiniba

Davor Šestan

U ovom diplomskom radu razvijena je učinkovita i osjetljiva metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za analizu onečišćenja i razgradnih produkata lijeka dasatiniba. DryLab je korišten za određivanje optimalnih uvjeta temperature, vremena gradijentnog eluiranja i sastava pokretne faze kromatografskog odijeljivanja metodom UHPLC. Najprikladnija kolona bila je *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm*. Optimalni uvjeti su: temperatura kolone = 50 °C, pH pokretne faze = 2 (fosfatni pufer za UHPLC, mravlja kiselina za LC-MS/MS analizu) i ukupno vrijeme trajanja analize: 27,5 min.

Forsirana razgradnja dasatiniba provedena je u kiselom i lužnatom mediju, uz prisutnost vodikovog peroksida te na povišenoj temperaturi. Za analizu razgradnih produkata korišten je vezani sustav LC-MS/MS. Na temelju MS i MS/MS spektara pretpostavljene su strukture razgradnih produkata i predložene odgovarajuće sheme fragmentiranja.

(61 + LXVIII stranica, 31 + 124 slike, 33 tablica, 34 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: dasatinib, MS/MS, onečišćenja, forsirana razgradnja, UHPLC metoda

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
3. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin

Zamjena:

Datum diplomskog ispita:





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF DASATINIB DEGRADATION PRODUCTS

Davor Šestan

In this diploma thesis efficient ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) method for determination of impurities and degradation product of dasatinib was developed. DryLab software was used to determine the optimal conditions for UHPLC separation like temperature, time of gradient elution and composition of the mobile phase. The most efficient chromatographic column was *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm*. The optimal condition were: column temperature = 50 °C, pH of mobile phase = 2 (phosphate buffer for UHPLC and formic acid for LC-MS/MS analysis), and total time of analysis = 27.5 min.

Forced degradation of dasatinib was performed in acid and basic conditions, upon addition of hydrogen peroxide, and on the elevated temperature. The LC-MS/MS system was used for the analysis of the degradation products. Based on the MS and MS/MS spectra, the structures of degradation products, as well as fragmentation schemes were proposed.

(61 + LXVIII pages, 31 + 124 figures, 33 tables, 34 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: dasatinib, MS/MS, contaminants, degradation products, forced degradation, UHPLC method

Mentor: Prof. Dr. Nives Galić

Reviewers:

1. Prof. Dr. Nives Galić
2. Dr. Vesna Petrović Peroković. M., Associate Professor
3. Dr. Željka Soldin, Associate Professor

Substitute:

Date of exam:





## § 1. UVOD

Analiza stabilnosti farmaceutski aktivnih tvari od velikog je značaja za kvalitetu i ispravnost gotovih farmaceutskih proizvoda. Dvije krovne organizacije za regulaciju lijekova, Agencija za hranu i lijekove (FDA) i Internacionalno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu (ICH), preporučuju uvjete (temperatura, izloženost svjetlu, kiseli ili bazični uvjeti itd.) pri kojima se istražuje stabilnost lijekova. Ukoliko je poznata stabilnost farmaceutski aktivne tvari tada se može poboljšati način pakiranja lijeka, odrediti način propisnog skladištenja lijeka te dozvoljen rok valjanosti lijeka što je vrlo važno za sigurnu primjenu lijeka. Također je važno kvalitativno i kvantitativno analizirati degradacijske produkte farmaceutski aktivne tvari kako bi se dobio detaljniji uvid u smanjenje učinkovitosti lijeka ili genotoksična, kancerogena i mutagena svojstva degradacijskih produkata. Razvoj instrumentnih analitičkih metoda omogućuje selektivna i osjetljiva određivanja koja odgovaraju zahtjevima agencija za regulaciju lijekova.<sup>1-3</sup>

Dasatinib je specifični inhibitor tirozin kinaze koji se primjenjuje pri liječenju pacijenata koji imaju kronični i uznapredovali stadij mijeloidne leukemije, a otporni su ili intolerantni na druge lijekove. Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu dasatiniba može se koristiti tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti, dok je za analizu njegovih degradacijskih produkata potreban sustav spregnut sa spektrometrijom masa.<sup>4,5</sup>

U ovom radu razvijena je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za određivanje dasatiniba i njegovih degradacijskih produkata nastalih forsiranom degradacijom. Pri razradi metode korišten je programski paket DryLab koji na osnovi dvije ili više varijabli (iz prethodno određenih eksperimentalnih podataka) pomoću matematičkih metoda optimira uvjete pri kojima se postiže najbolje razdvajanje sastojaka smjese, odnosno razlučivanje pikova. Pri razvoju metode analize dasatiniba i njegovih razgradnih produkata korištene su različite kolona. Na odabranoj koloni smjesa analita analizirana je pri različitim temperaturama kolone, pH-vrijednostima pokretne faze i vremenu trajanja analize. Navedenim računalnim paketom i na temelju eksperimentalnih podataka odabrani su uvjeti koji su korišteni kao početni uvjeti za analizu vezanim sustavom tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti - spektrometrija masa, a kojom su određeni degradacijski produkti nastali forsiranom degradacijom dasatiniba u lužini, kiselini, vodikovom peroksidu i pri

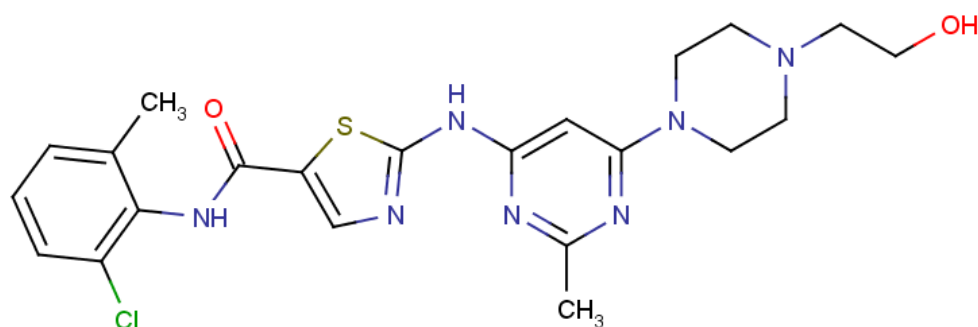
povišenoj temperaturi. Analizom spektara masa netretiranog uzorku, kao i onog podvrgnutog forsiranoj razgradnji, pretpostavljene su strukture degradacijskih produkata te predložene sheme fragmentiranja.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Dasatinib

Dasatinib (DAS) je aktivna farmaceutska tvar koja se koristi zasebno ili s drugim lijekovima za liječenje kronične mijeloicitne leukemije (CML). Molekulska formula dasatiniba je  $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$ , a molarna masa 488,01 Da (Slika 1).

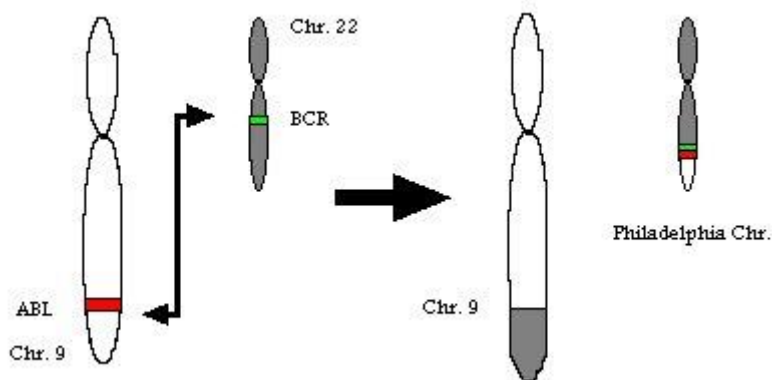
Dasatinib je molekula koja inhibira tirozin kinazu. Lijek je druge generacije koji pokazuje značajno inhibiranje u slučaju “divljeg” tipa KIT receptorskog gena kao i onkoproteinske mutacije. Potvrđeno je djelovanje dasatiniba na receptore tirozin kinaze DDR1 oksidoreduktaze NQO2. Točan mehanizam djelovanja još uvijek nije poznat, ali se pretpostavlja da se imunološke modifikacije koje uzrokuje dasatinib očituju u povećanoj raznolikosti T stanica, što je potvrđeno određivanjem visoke koncentracije CD4+ T stanica kod pacijenata koji su primali dasatinib. Prema drugoj teoriji dasatinib ima puno kompleksniji mehanizam djelovanja od prethodno navedenog, kao i lijekova prve generacije, što se potkrjepljuje činjenicom da dasatinib inducira defekte u stvaranju vretena, zaustavljanju staničnih ciklusa kao i promjeni cetosoma u bolesnim ali i zdravim stanicama.<sup>6</sup>



Slika 1. Struktura dasatiniba

### 2.1.1. Kronična mijelocitna leukemija – uzrok, simptomi i liječenje

Kronična mijelocitna leukemija (CML) je bolest koja pogađa 20% svih odraslih osoba koje imaju leukemiju te je vrlo vjerojatno najproučavanija ljudska maligna bolest. To je mijeloproliferativna bolest koja uzrokuje veliku proizvodnju abnormalnih odnosno kancerogenih mijeloidnih stanica. Mehanizam nastanka CML-a nije poznat, međutim u Philadelphiji je 1960. godine otkriven kromosom nazvan po tom američkom gradu, Philadelphia kromosom, koji predstavlja recipročnu kromosomsku translokaciju, odnosno razmjenu genskih segmenata između dva kromosoma prilikom čega nastaju dva nova kromosoma. Kod kronične mijelocitne leukemije dolazi do zamjene dijelova između kromosoma 9 i 22, te nastaje kromosom 9 koji je neprirodno dugačak i kromosom 22 koji je skraćen. Kromosom 22 koji je tako izmijenjen naziva se Philadelphia kromosom (Slika 2). Proces izmjene dijelova kromosoma se ne odvija na nasumičan način, već dolazi do izmjene dijela kromosoma 9 koji počinje s ABL genom sa djelom kromosoma 22 koji počinje s BCR genom.



Slika 2. Prikaz izmjene dijelova između kromosoma 9 i 22 te nastanak Philadelphia kromosoma

Navedeni BCR-ABL gen kodira protein nazvan BCR-ABL protein koji je konstantno aktivan te može djelovati na druge proteine koji kontroliraju stanične procese i ubrzava diobu stanica, inhibira popravak DNK lanaca ali i katalizira prekomjernu aktivnost tirozin kinaze koja je odgovorna za prirodnu staničnu komunikaciju te u fazi bolesti uzrokuje nastanak patoloških, prekomjernih i nereguliranih mijelocitnih stanica.

Simptomi kronične mijelocitne leukemije su uvećana slezena i bolovi u gornjoj lijevoj strani trbuha, osjećaj umora, povišena temperatura, povišena temperatura, infekcije, gubitak na težini, gubitak apetita, blijeda koža, pojačano znojenje i krvarenje nakon vrlo slabih abrazija na koži.<sup>7</sup>

Do prije nekoliko godina smatralo se da je kronična mijelocitna leukemija neizlječiva bolest, te da je jedini medicinski postupak koji može dovesti do izlječenja transplantacija koštane srži. Sam postupak transplantacije koštane srži vrlo je rizičan jer ostavlja pacijenta bez koštane srži, koji je prirodni generator imuno sistema, čime osoba postaje podložna i osjetljiva čak i na najslabije bolesti. Uz takvo rizično liječenje potrebno je specijalizirano osoblje, te ionizirajuće zračenje u svrhu uništavanja abnormalnih stanica. 2001. godine je odobreno korištenje novog lijeka imatinib mezilat, lijeka prve generacije koji je inhibitor BCR-ABL tirozin kinaze. Korištenjem imatinib mezilata izbjegava se kemoterapija koja uništava maligne i zdrave stanice, a preveniraju se mehanizmi koji dovode do bolesti te je uspješnost liječenja potvrđena. Negativna strana u liječenju imatinib mezilatom je ta što je kod nekih osoba primijećena propagacija BCR-ABL mutacija otpornih na imatinib. Zato se istražuju i testiraju lijekovi druge generacije na koje ne postoji otpornost, a među tim lijekovima je i dasatinib.<sup>8,9</sup>

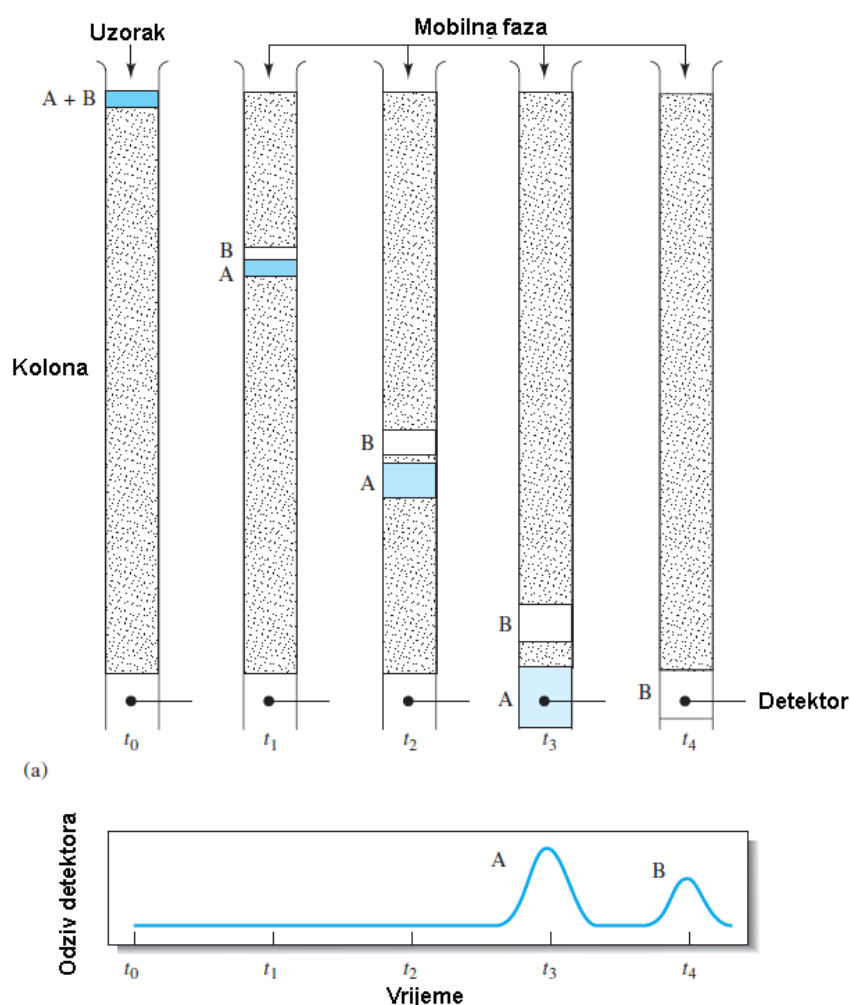
### *2.1.2. Određivanje dasatinib-a*

Pregledom literature ustanovljeno je da je do sada razvijena HPLC metoda za određivanje dasatiniba u uzorcima tableta dasatiniba. Tom metodom moguće je uz detektor s nizom dioda detektirati dasatinib pri 315 nm u koncentracijskom području od 5 do 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>10</sup>

Također je istražena i razvijena HPLC metoda za detekciju dasatiniba u uzorcima koji su podvrgnuti forsiranoj razgradnji.<sup>11</sup> Međutim, pregledom literature nije pronađeno ni jedno istraživanje koje je orijentirano na detekciju i karakterizaciju produkata forsirane razgradnje.

## 2.2. Tekućinska kromatografija<sup>12</sup>

Tekućinska kromatografija važna je analitička tehnika koja omogućuje separaciju analita od drugih tvari u smjesi. Tekućinska kromatografija može se provoditi u koloni ili na tankom sloju. U koloni se nalazi punilo koje utječe na brzinu kojom će sastojci smjese A i B prolaziti kroz kolonu. Otopina koja se dodaje na vrh kolone zove se pokretna ili mobilna faza, a također utječe na djelotvornost razdvajanja sastojaka. Razdvojeni sastojci se po izlazu iz kromatografske kolone detektiraju (Slika 3.). Ovisno odziva detektora o vremenu potrebnom da se sastojak ispere s kolone ili o volumenu eluata zove se kromatogram.



Slika 3. a) Odjeljivanje sastojaka A i B na koloni; b) kromatogram

Podjela tekućinske kromatografije prema mehanizmu odjeljivanja sastojaka smjese dana je u tablici 1.

Tablica 1. Podjela tekućinske kromatografije prema mehanizmu odvajanja.

Vrsta tekućinske kromatografije	Princip separacije
Adsorpcijska kromatografija	Razdvajanje nepolarnih spojeva na temelju različite adsorpcije na površini čvrstog adsorbensa
Razdjelna kromatografija	Razdvajanje na temelju različite topljivosti spojeva u pokretnoj i nepokretnoj fazi
Ionsko izmjenjivačka kromatografija	Razdvajanje se temelji na različitom afinitetu sastojaka prema ionskoj izmjeni
Kromatografija isključenjem	Razdvajanje se temelji na razlikama u veličini i/ili obliku molekula ili naboju; molekule određene veličine ne mogu ući u pore nepokretne faze i tako se odvajaju od manjih molekula
Afinitetna kromatografija	Razdvajanje se temelji na specifičnim interakcijama analita i molekula vezanih za nepokretnu fazu

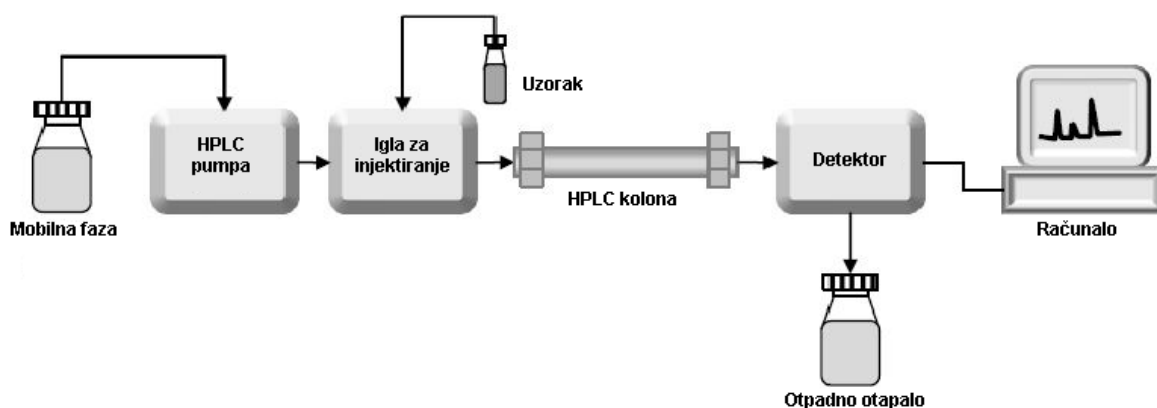
### 2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je moderna inačica klasične tekućinske kromatografije. U modernoj farmaceutskoj industriji tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koristi se u istraživanju, razvoju i proizvodnji lijekova. HPLC je tehnika kojom se uobičajeno provjerava čistoća novih kemijskih spojeva, prate promjene tijekom sintetskih procesa na maloj i velikoj skali te određuje kvaliteta farmaceutskog proizvoda. Također se koristi za razdvajanje, kvalitativnu i kvantitativnu analizu aktivne farmaceutske tvari, reakcijskih onečišćenja, sintetskih intermedijera i produkata degradacije.<sup>13</sup>

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (Slika 4.) sastoji se od jednog ili više spremnika mobilne faze, ovisno o tome koliko kanala ima vakuumska pumpa s kojom su spojeni spremnici mobilnih faza. Prije pumpe postavljen je degazer, a u kućištu pumpe odnosno neposredno prije dijela u kojem se miješaju mobilne faze, filter koji sprečava da eventualne nečistoće i čestice uđu u pumpu i nakon toga u kolonu. Protok koji generira pumpa može biti izokratan (protok mobilne faze je konstantan) ili gradijentan (mijenja se sastav mobilne faze u vremenu). HPLC sustav sadrži automatski uzorkivač za injektiranje uzorka u



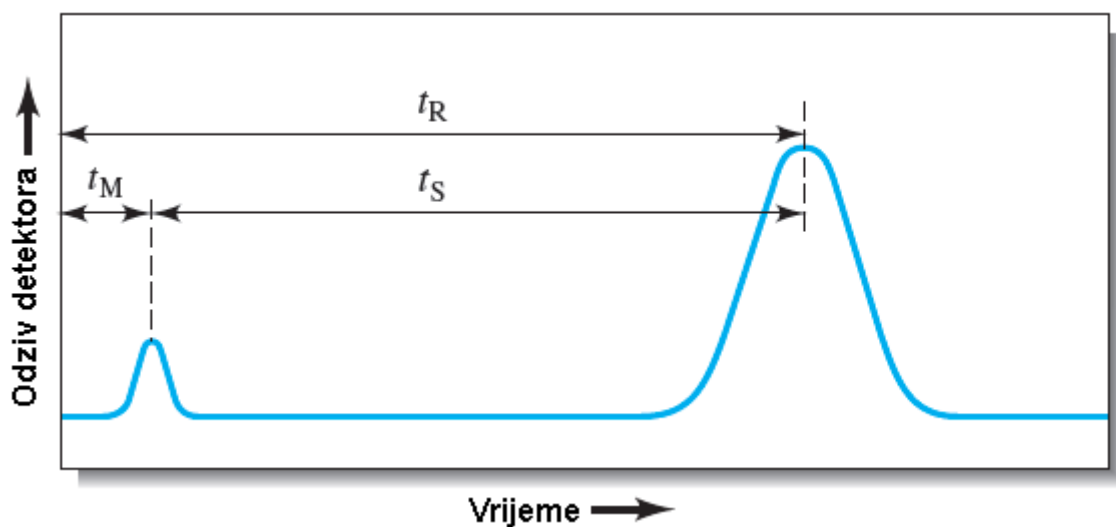
pokretnu fazu prije ulaska u kolonu. Protok mobilne faze i količinu injektiranog uzorka moguće je definirati putem računalnog softverskog paketa za upravljanje HPLC-om. Kolona je obično metalna cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza, čiji parametri - veličina čestica stacionarne faze, duljina i unutarnji promjer kolone mogu biti različiti. Uobičajeno je da kolone budu duljine od 100 mm do 250 mm, a promjer kolone od 2 mm do 4,6 mm. Nakon prolaska analiza kroz kolonu pod visokim tlakom analit se analizira detektorom koji je najčešće UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski detektor ili spektrometar masa. Svaki od navedenih detektora ima određena specifična svojstva te se pojedini detektor koristi ovisno o prirodi analita.<sup>14</sup>



Slika 4. Dijelovi HPLC kromatografa

### 2.2.2. Kromatografski parametri

Odjeljivanje sastojaka smjese tekućinskom kromatografijom, odnosno tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, ovisit će o prirodi sastojaka koje je potrebno odijeliti, vrijednosti pH mobilne faze, temperaturi, tlaku, punilu kolone, a time i mehanizmu razdvajanja. Najbitniji podatak analize je svakako ukupno vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) koje je specifično za zadanu tvar i sustav, ali se također koristi i prilagođeno vrijeme zadržavanja ( $t'_R$ ) koje predstavlja razliku ukupnog vremena zadržavanja i vremena zadržavanja nezadržanog sastojka ( $t_M$ ) (slika 5.).



Slika 5. Kromatogram smjese dvaju sastojaka od kojih prvi prolazi kroz kolonu bez zadržavanja te je njegovo vrijeme zadržavanja ( $t_M$ ) jednako vremenu potrebnom da molekule pokretne faze prođu kroz kolonu

Selektivnost kromatografske kolone izražava se separacijskim faktorom ( $\alpha$ ). Kolona je selektivnija što su vremena zadržavanja dva analita koji se odjeljuju različitija. Separacijski faktor definiran je izrazom 1.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (1)$$

Sljedeći važan parametar u tekućinskoj kromatografiji je razlučivanje ( $R_S$ ) koji je mjera razdvajanja dvaju pikova, a u sebi uključuje selektivnost i djelotvornost kolone. Što je veće vrijednost razlučivanja kolone to je manje preklapanje pikova, odnosno oni su bolje odijeljeni. Razlučivanje se izračunava prema izrazu (2):

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

gdje su  $w_{b1}$  i  $w_{b2}$  širine pikova pri osnovici. Ako su širine pikova pri osnovici jednake dobiva se izraz (3):

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b2}} \quad (3)$$

Parametri koji utječu na kromatografsko razlučivanje su broj teorijskih tavana (mjera djelotvornosti kolone) i separacijski faktor (mjera selektivnosti kolone).

Broj teorijskih tavana ( $N$ ) odnosno broj uspostavljenih ravnoteža između mobilne faze i nepokretne faze, definiran je izrazom (4):

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (4)$$

Iz izraza 4 vidljivo je da se u slučaju velikog broj teorijskih tavana dobivaju pikovi koji su oštiji i čija širina osnovice pika je uža te se dobiva bolja separacija, koja je izrazito bitna ukoliko dva analita imaju vrlo slična vremena zadržavanja ( $t_R$ ).<sup>12</sup>

Separacijski faktor dan je izrazom (5) i dogovorom je uvijek veći od 1:

$$\alpha = \frac{(t_{R(A)} - t_M)}{(t_{R(B)} - t_M)} \quad (5)$$

Mobilna faza u kromatografiji na obrnutoj fazi je obično kombinacija vode ili vodenih pufera s organskim otapalom (najčešće metanol ili acetonitril), te veliki utjecaj na rezultate kromatografije ima pH mobilne faze koji treba biti  $\text{pH} \pm 2$  u odnosu na  $\text{p}K_a$  vrijednost analita.<sup>15</sup>

### 2.2.3. UHPLC

Kako su se postavljali sve veći zahtjevi pri analizi složenih smjesa 2004. godine unaprijeđena je tehnika HPLC-a, u početku nazvana UPLC (ime je patentno zaštićeno od strane proizvođača Waters), dok je kasnije nazvana UHPLC (eng. *Ultra-high performance liquid chromatography*). UHPLC se razlikuje od HPLC-a po tome što sustav može izdržati tlakove u koloni do  $10^8$  Pa pa punila u koloni u slučaju UHPLC-a mogu biti promjera manjeg od 2  $\mu\text{m}$ . Sve to dovodi do bolje selektivnosti i osjetljivosti (2-3 puta bolje nego u HPLC), pa je prema tome i volumen injektiranog uzorka u UHPLC kolonu nekoliko puta manji nego kod HPLC-a. Također isto ili bolje razdvajanje se dobiva korištenjem UHPLC-a uz manju potrošnju mobilnih faza, što čini pozitivan korak u uštedi i očuvanju okoliša. Istraživanja govore da je od 2008. do 2012. godine 73 % analiza farmaceutskih pripravaka u krutom stanju analizirano UHPLC-om.

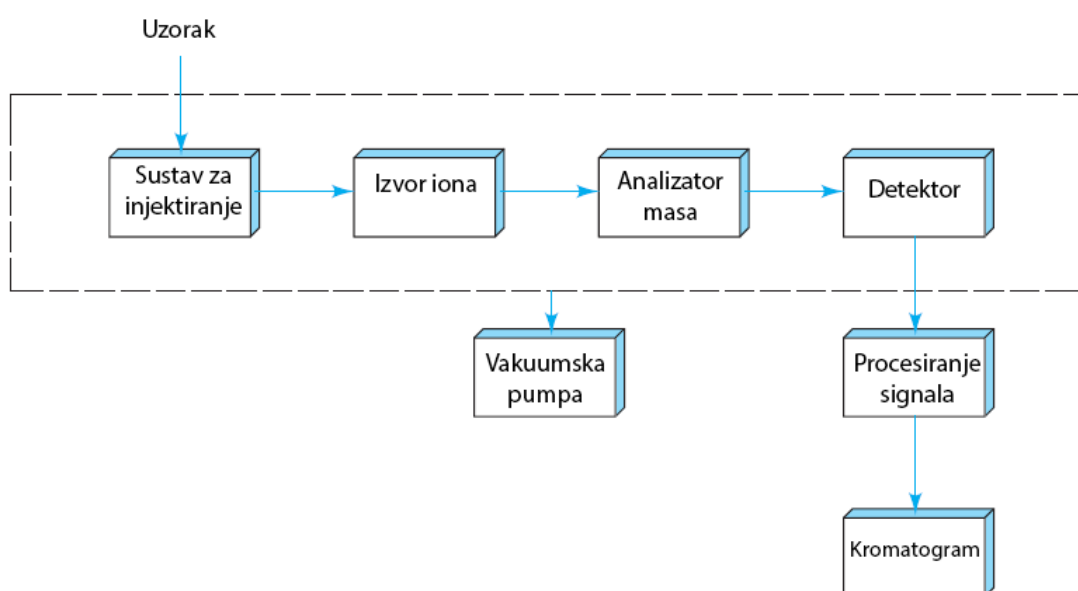
### 2.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (MS) je moderna analitička instrumenta tehnika za analizu molekula na temelju njihovog omjera mase i naboja. Koristi se za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju malih molekula (obično do 1500 Da). Vrlo je pogodna jer je moguće analizirati vrlo male količine analita - volumeni u nekim slučajevima iznose samo 1  $\mu\text{L}$ , a granice detekcije sežu i do femtomolarnih koncentracija.<sup>16,17</sup>

Spektrometrija masa može se koristiti kao zasebna metoda ili biti dio vezanog sustava i koristiti se kao detektor u primjerice tekućinskoj kromatografiji. Prednost takvih vezanih sustava je da se pri analizi gubi malo uzorka. Sustav se postavlja tako da se prvo rade nedestruktivne analize u kojima analit ostaje nepromijenjen, a tek na kraju niza u vezanim sustavu se eventualno dodaju destruktivne metode, kao što je i spektrometrija masa. Na temelju spektara masa može se odrediti struktura analiziranog spoja.<sup>18</sup>

#### 2.3.1. Spektrometar masa

Spektrometrom masa mogu se analizirati krutine, tekućine i plinovi, ovisno o dostupnim ionizacijskim izvorima. Sastoji se od tri ključna djela: ionski izvor, analizator masa i detektor (Slika 6.)

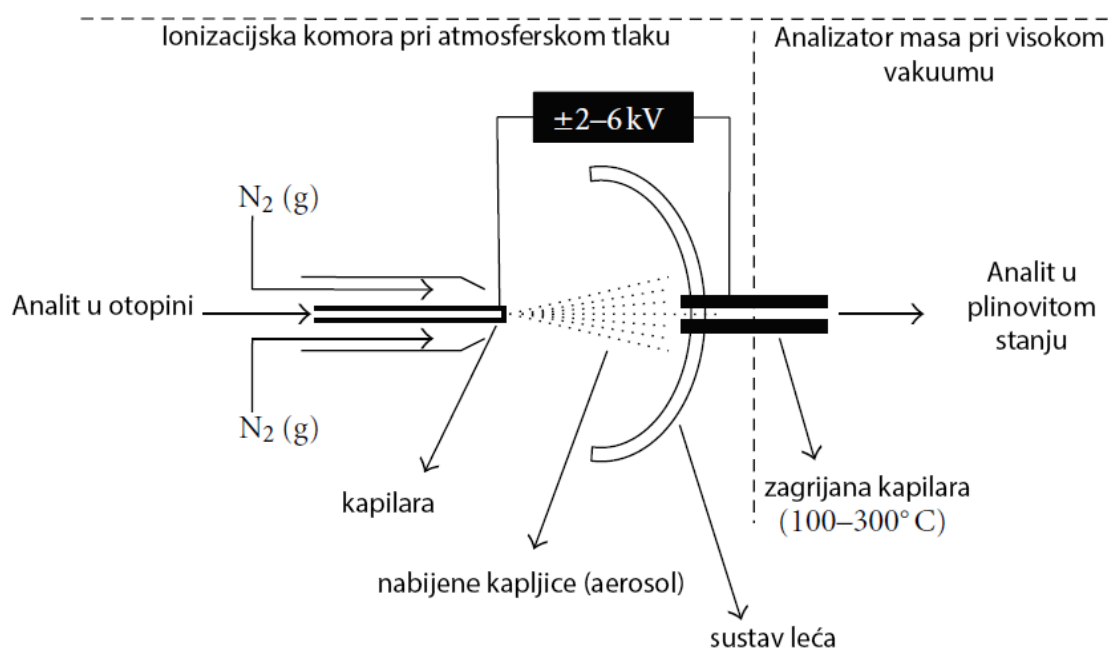


Slika 6. Shematski prikaz spektrometra masa

Prvi vrlo važan dio spektrometra masa je ionski izvor, u kojemu dolazio do ionizacije molekula. Ionizacija može biti: ionizacija elektronima (EI), kemijska ionizacija (CI), ionizacija brzima atomima (FAB), ionizacija sekundarnim ionima (SIMS), desorpcija poljem (FB), desorpcija plamenom (PD), desorpcija laserom (LD), matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI), termoraspršenje (TS), elektroraspršenje (ES) i kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI). Ionizacijske tehnike mogu se podijeliti na tvrde i blage tehnike pri čemu blage ionizacije djeluju na molekulu analita s malo energije te je i fragmentacija molekulskog iona manje izražena. Ovisno o vrsti ionizacije molekulski ion je u obliku  $(M+H)^+$  ili  $M^+$ .<sup>12</sup>

Jedna od ionizacija koja ne uzrokuje jaku fragmentaciju analita je matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI). U navedenoj tehnici laserskim zračenjem ozrači se smjesa analita pomiješanog s matricom te dolazi do desorpcije i ionizacije analita u plinskoj fazi.<sup>19</sup> Još jedna od blagih tehnika ionizacija je ionizacija sekundarnim ionima (SIMS) u kojoj se za ionizaciju analita koriste ioni argona,  $Ar_n^+$ .<sup>20</sup>

U vezanim sustavima tekućinska kromatografija spektrometrija masa (LC-MS) ključna je ionizacija uzorka direktno iz otopine, pa se prema tome koriste tehnike pri atmosferskom tlaku poput termoraspršenja (TSP), elektroraspršenja (ESI) i kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI). Za tehnike ionizacije koje se odvijaju na atmosferskom tlaku vrlo je bitno da se ne naruši vakuum u analizatoru masa kako bi ioni prošli nesmetano, bez neželjenih sudara do detektora. Jedna od najkorištenijih tehnika ionizacije u veznim sustavima LC-MS je ionizacija elektroraspršenjem (ESI). Analit se s tekućinsko-kromatografske kolone dovodi u metalnu kapilaru na koju se primjenjuje jako električno polje (2-6 kV) pod čijim utjecajem se odvajaju pozitivni i negativni naboj u otopini. Ukoliko je kapilara u koju ulazi otopina analita priključena na pozitivan kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine. Pri kritičnoj jakosti polja nastaje tzv. Taylerov stožac u kojem se kontinuirano proizvode kapljice obogaćene nabijenim ionima. Nesimetričnim dijeljenjem kapljice nastaju manje, a iz njih ioni u plinskoj fazi koji se pod utjecajem električnog potencijala usmjeravaju kroz sustav leća prema kapilari koja vodi u analizator masa (Slika 7.). Primjenom negativnog potencijala na kapilaru nastaju negativno nabijeni ioni.<sup>21</sup>



Slika 7. Shematski prikaz elektroraspršenja

U analizatoru masa odjeljuju se ioni analita ili njegovi fragmenti na temelju njihovog omjera mase i naboja (Slika 6). Danas se najčešće koriste četiri vrste analizatora masa: linearni kvadrupol (Q), kvadrupolna ionska stupica (QIT), analizator koji mjeri vrijeme leta (TOF) i analizator u Fourier transformiranoj ionsko-ciklotronskoj rezonanciji (FT-ICR).<sup>22</sup>

Jedna od često korištenih analizatora je analizator koji mjeri vrijeme leta (TOF). Koristi se sam ili u kombinaciji s kvadrupolnim analizatorom masa (Q-TOF). U Q-TOF instrumentu ioni prolaze kroz kvadrupolni analizator, zatim kroz sustav leća ulaze u analizator koji mjeri vrijeme leta u kojem se ubrzavaju, postižu brzinu ovisnu o masi, te se na kraju detektiraju na temelju vremena potrebnog da stignu do detektora. Takav sustav ima čitav niz dobrih karakteristika poput točnosti određivanja masa (pogreška je manja od 5 ppm-a), velike osjetljivosti (granica kvantifikacije je na skali ng/mL), preciznosti na širokoj dinamičkoj skali (dinamička skala od 1 do  $10^3$ ) te omogućuje brzo snimanje što je neophodno u vezanim sustavima. Provođenje tandemne spektrometrije masa instrumentom TOF postiže se kombinacijom linearnog načina snimanja i snimanjem uz ionskog zrcala (reflektron). Takvim načinom snimanja mogu se razlikovati ioni koji imaju istu brzinu, a različit omjer mase i naboja.<sup>23,24</sup>

Kvadrupolni analizator masa (Q) je u periodu od 1970. do 1999. bio najviše upotrebljavan analizator masa. Popularnost kvadrupolnog analizator masa bila je vrlo visoka

zbog relativno niske cijene instrumenta i lake automatizacije. Kvadrupolni analizator sastoji se od četiri elektrode međusobno spojene u paru na koje se primjenjuje kombinacija istosmjernog i izmjeničnog potencijala i koje određuje kretanje iona između elektroda. Samo ioni određenog omjera mase i naboja će nesmetano proći kroz analizatora do detektora, dok će oni s neodgovarajućim omjerom mase i naboja udariti u stijenke elektroda. Kvadrupol se obično koristi u vezanim sustavima GC-MS i LC-MS.

Kvadrupolna ionska stupica (QIT) je analizator vrlo sličan linearnom kvadrupolnom analizatoru uz razliku da postoje tri elektrode: gornja, donja i prstenasta. Na elektrode se primjenjuje kombinacija izmjeničnog i istosmjernog potencijala te nastaje električno polje u tri dimenzije u kojem se ioni kreću. Odabirom pogodne jačine električnog polja putanja elektrona u kvadrupolnoj stupici iona postaje nestabilna (kad se zadovolji Mathieu-ova nestabilnost koja opisuje kretanje iona) te se odabrani ion izbacuje kroz pukotinu iz analizatora.<sup>25</sup>

Spektrometrija masa temeljena na Fourier-transformiranoj ionsko-ciklotronskoj rezonanciji (FT-ICR) koristi ionsku stupicu smještenu u magnetskom polju. U stupici ioni kruže oko osi okomite na smjera polja. Stabilna putanja iona predstavlja ravnotežu magnetske i centrifugalne sile koje djeluju na ion. Ukoliko radijus putanje iona postane veći od radijusa ionske ćelije on se izbacuje. Kad se električnim poljem djeluje se na ione, ioni čija ciklotronskoj frekvenciji odgovara frekvenciji polja se ubrzavaju i povećava im se radijus putanje. Na ostale ione polje ne utječe. Da bi se svi ioni u ćeliji simultano pobudili, primjenjuje se široko područje frekvencija. Time se postiže koherentno gibanje iona čije putanje su blizu detekcijski elektroda. Oscilirajuća struja nastala na detekcijskim elektrodama prevodi se u oscilirajući napon koji se detektira i daje signal u vremenskoj domeni. Upotrebom Fourierove transformacije signal u vremenskoj domeni prevodi se u signal u frekvencijskoj domeni i konačno u signal masa – odnosno kromatogram.<sup>26</sup>

#### **2.4. Primjena vezanog sustava UPLC-MS u farmaceutskoj industriji**

U farmaceutskim ispitivanjima, a izrazito u ispitivanjima stabilnosti aktivnih farmaceutski tvari, koristi se sustav UHPLC-MS/MS, pri čemu se za masenospektrometrijski dio sustava koristi ESI-Q-TOF. Prednost takvog sustava je blaga ionzacija elektroraspršenjem, kojim nastaju pozitivni ioni bez ili uz malu fragmentaciju i visoko razlučivanje masa (Q-TOF) koje

omogućuje određivanje strukture razgradnih produkata. Budući da mogu nastati male količine degradacijskih produkata, umjesto tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), koristi se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) jer se tom tehnikom postiže bolja separacija sastojaka smjese (pikovi su bolje razdvojeni), a samim time bolja osjetljivost metode.

Dobro optimiziranom metodom za UHPLC-MS ili UHPLC-MS/MS analize potrebno je zadovoljiti standarde koji su propisani za analizu farmaceutskih proizvoda, u što je uključena kvalitativna i kvantitativna analiza aktivne farmaceutske tvari kao i njezinih onečišćenja te degradacijskih produkata.

## 2.5. Forsirana razgradnja aktivnih farmaceutskih tvari

Poznavanje kemijske stabilnosti aktivnih farmaceutskih tvari vrlo je važno za proizvodnju i sigurnosti lijeka. Stoga su dvije najveće svjetske organizacije za regulaciju lijekova, Agencija za hranu i lijekove (FDA) i Internacionalno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu (ICH), regulirale potrebna istraživanja i dokumentaciju koju je potrebno priložiti u slučaju komercionalnog plasiranja određenog lijeka. Istraživanje stabilnosti lijeka omogućuje spoznaje o promjenama lijeka i dodatnih tvari u lijeku prilikom cijelog niza različitih uvjeta.

Jedna od stavki koju je važno ispitati je forsirana degradacija. Forsirana degradacija je proces koji uključuje promjenu (degradaciju) aktivne farmaceutske tvari i tvari koje se nalaze u lijeku u kontroliranim žestokim uvjetima, koji će ubrzati prirodnu degradaciju ili katalizirati kemijsku promjenu kako bi se dobila informacija o stabilnosti aktivne farmaceutske tvari i proizvoda u cijelosti. Upute ICH i FDA trenutno ne sadrže informacije o striktno definiranim uvjetima forsirane degradacije. Uobičajeni uvjeti za forsiranu razgradnju dani su u tablici 2.<sup>1,27-29</sup> Osim hidrolize u kiselom i lužnatom mediju te oksidaciji peroksidom obično se ispituje stabilnost aktivne tvari pri povišenoj temperaturi i izloženosti svjetlu.



Tablica 2. Najčešće korišteni uvjeti za forsiranu degradaciju aktivne farmaceutске tvari

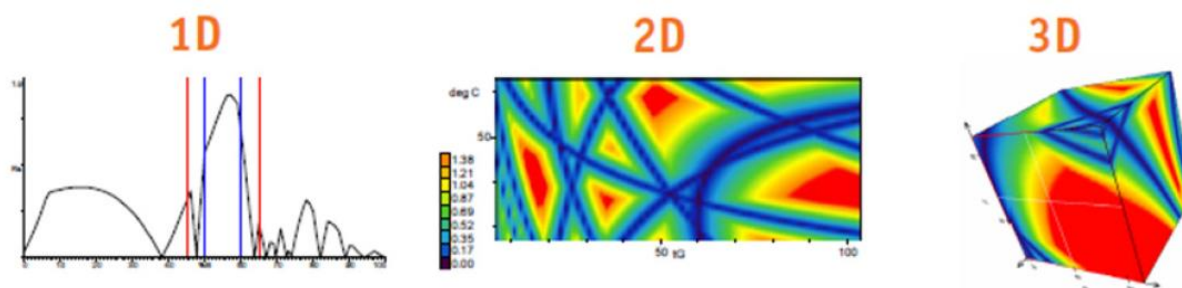
Tip degradacije	Eksperimentalni uvjeti	Uvjeti skladištenja	Vrijeme uzorkovanja
<b>Hidroliza</b>	Kontrolni uzorak (samo API u otapalu)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana
	0.1 mol/L HCl	40 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana
	0.1 mol/L NaOH	40 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana
	Kontrola kiselosti (bez API)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana
	Kontrola bazičnosti (bez API)	40 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana
	pH: 2, 4, 6, 8	40 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana
<b>Oksidacija</b>	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana
	Kontrola peroksida (bez API)	25 °C, 60 °C	1, 3, 5 dana

## 2.6. DryLab metoda

U farmaceutskim istraživanjima i razvoju nužan je razvoj metoda separacije kojima će se odrediti nastali razgradni produkti i nečistoće nastale prilikom sinteze. Stoga je idealna kromatografska metoda (HPLC, UHPLC) ona koja daje najviše informacija o analitu i ostalim tvarima u uzorku. Uobičajeno je da se važni parametri vezani uz razvoj HPLC metode, kao što su pH, gradijent, stacionarna i mobilna faza, odabiru na temelju vještina i mišljenja kemičara koji razvija metodu. Najveći izazov nastaje ukoliko je sastav uzorka nepoznat te je teško odabrati parametre bez mnogo prethodnog istraživanja i rada na upoznavanju sustava. Postupak razvijanja HPLC metode sastoji se od istraživanja niza stacionarnih faza (različite kromatografske kolona po sastavu i po dimenzijama) te odabira najprikladnije, odabira mobilne faze, pH i prikladnog reagensa za kromatografiju ionskih parova. Tako razvijena metoda može biti robusna, ali ponekad zbog dodatka reagensa, protuiona ili pufera nije pogodna za detekciju odijeljenih sastojaka spektrometrijom masa.

Da bi se skratilo vrijeme potrebno za razvoj metode u posljednjih 20 godina razvijena je nekolicina računalnih paketa za simulaciju i predikciju kromatografskih uvjeta i rezultata. Jedan od takvih računalnih paketa je DryLab koji uz mali broj dobro definiranih eksperimenata na odabranoj stacionarnoj fazi generira teoretske podatke o separaciji u sustavu gdje su varijable: način eluiranja (izokratno ili gradijentno), temperatura i udio pojedinog otapala u pokretnoj fazi (ukoliko se koristi više od jednog otapala).<sup>30</sup>

Moguće je praćenje površine, oblika i vremena zadržavanja pikova prilikom promjene nekog od parametara pri čemu se računalnim paketom izračunava teoretski kromatogram.<sup>30</sup> Teoretski model odabranog sustava sadrži informaciju o kritičnom rezolucijskom modelu (CRM) koji daje numeričku informaciju o separaciji signala. Prema definiciji kritična rezolucija je najmanja vrijednost faktora rezlučivanja ( $R_s$ ) između dva analita koji su najslabije razdvojeni. Rezultat se predstavlja u funkciji jednog parametra (1D rezolucijska mapa), dva parametra (2D rezolucijska mapa) i tri parametra (3D rezolucijska mapa – 3D kocka), gdje su prema bojama označene kritične vrijednosti faktora razdvajanja (slika 8.).<sup>31,32</sup>



Slika 8. Grafički prikaz rezultata 1D, 2D i 3D mape kritičnih faktora razolucija određenih računalskim paketom DryLab, gdje plava boja označava nisku vrijednost kritične rezolucije, a crvena zadovoljavajuću, odnosno visoku vrijednost kritične rezolucije

## 2.7. Metoda SIM

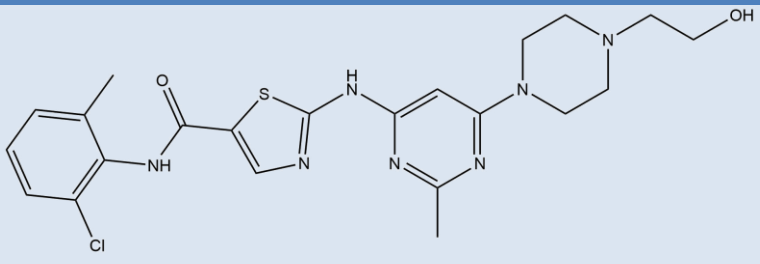
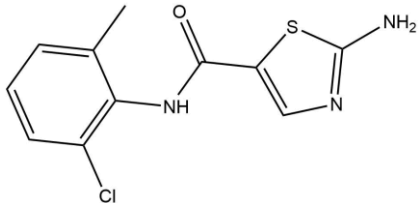
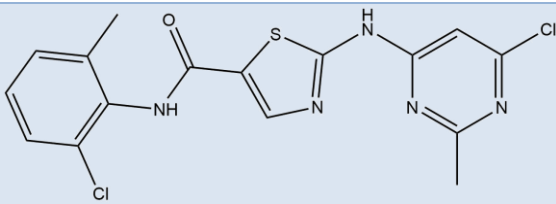
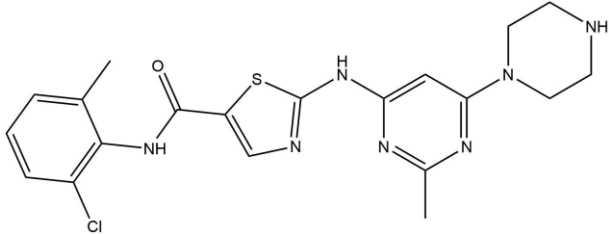
Metoda određivanja stabilnosti, SIM (engl. *Stability indicating method*), je prema FDA-ovim napucima validacijski postupak kojim se određuje stabilnost farmaceutski aktivnih tvari tijekom vremena. Tom metodom mjere se promjene u aktivnoj farmaceutskoj tvari bez utjecaja ostalih degradacijskih produkata i nečistoća. Validacija metode SIM uključuje: obradu uzorka, razvoj metode, optimizaciju i validaciju metode. Prema ICH, SIM-om je potrebno da se izoliraju, identificiraju i kvantificiraju degradacijski produkti pronađeni u udjelu iznad određenog praga od 0,1%. Tijekom optimizacije metode provjerava se čistoća pikova na način da se provjerava ukoliko postoji pik koji koeleluira s glavnim pikom. Analiza se provodi tako da se provjerava spektralna čistoća pika, odnosno provjerava se postoji li promjena u apsorpcijskom spektru duž svakog pika, pri čemu se koristi detektor s nizom fotodioda.<sup>1,33</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Popis polaznog materijala

Polazni materijali su sintetizirani, izolirani i pročišćeni u TAPI Pliva. Strukture dasatiniba i tri pripadajuća poznata onečišćenja nalaze se u tablici 3.

Tablica 3. Popis i strukture analiziranih spojeva

Oznaka uzoraka	Kratica	Struktura	Proizvođač
Dasatinib	DAS		TAPI Pliva Hrvatska
Dasatinib 5	DAS-5		TAPI Pliva Hrvatska
Dasatinib 6	DAS-6		TAPI Pliva Hrvatska
Dasatinib PIP	DAS-PIP		TAPI Pliva Hrvatska

### 3.2. Priprava otopina za UHPLC analizu

Za UHPLC analizu pripremljene su 4 otopine te potreban pufer i diluent. Pripremljena je po 1 litra  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufera koncentracije  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH vrijednosti 1,5, 2 i 3. U tu svrhu odvagano je u odgovarajuće boce po 1,37 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i nadopunjeno do oznake s MiliQ (engl. *Ultrapurewater*) vodom. pH vrijednost se ugađala na željene vrijednosti s  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . pH-vrijednost mjerena je pomoću pH metra: *Mettler Toledo SevenCompact pH meter*. Pufer se koristio kao pokretna (mobilna) faza A, dok je pokretna faza B bio acetonitril (ACN).

Odabrana su dva diluenta u kojima se otapaju analizirani spojevi, navedeni u tablici 3. Priređen je diluent za DAS, DAS-5 i DAS-PIP koji je sadržavao smjesu otapala acetonitrila i 0,1% v/v  $\text{H}_3\text{PO}_4$  u omjeru 1:1. Otapalo za DAS-6 bilo je smjesa tetrahidrofurana (THF) i metanola u omjeru 1:1. Zatim su pripremljene otopine onečišćenja i API-a (tablica 3) masene koncentracije  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . U slučaju DAS-6 masena koncentracija iznosila je  $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Na analitičkoj vagi *Mettler Toledo XP2U* odvagano je 5 mg DAS, DAS-5 i DAS-6 te je otopljeno u 5 mL definiranog diluenta za te analite, te potom izvagano 4 mg DAS-6 te otopljeno u 5 mL diluenta predviđenog za DAS-6. Za potpuno otapanje analita potrebno je koristiti vorteks miješalicu i ultrazvučnu kupelj pri sobnoj temperaturi. Za UHPLC analizu pripremljena je otopina označena sa RS, koja je sadržavala dasatinib i pripadajuće nečistoće (DAS-5, DAS-6 i DAS-PIP), tako da je digitalnom pipetom odpipetirano  $300 \mu\text{L}$  otopine DAS, DAS-5, DAS-6 i DAS-PIP. Sve pripremljene otopine korištene su za početnu analizu čiji rezultati su kasnije korišteni za razvoj UHPLC metode u programskom paketu (DryLab).

### 3.3. Priprava otopina za forsiranu degradaciju

Za forsiranu degradaciju dasatiniba, priređene su otopine klorovodične kiseline i natrijeve lužine koncentracije  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  i  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Za usporedbu (provjeru) pripremljena je otopina dasatiniba otapanjem 25 mg DAS u 25 mg diluenta.

U drugu tikvicu od 25 mL odvagano je 25 mg DAS, zatim je dodano 3 mL diluenta i 7 mL  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  HCl. Tikvica je ostavljena 4 sata na sobnoj temperaturi kako bi se odvijala reakcija degradacije. Nakon 4 sata dodano je 7 mL  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH kako bi se neutralizirala otopina te je tikvica nadopunjena diluentom do oznake

U treću tikvicu odvagano je 25 mg DAS, zatim je dodano 3 mL diluenta i 7 mL 1 mol L<sup>-1</sup> HCl. Tikvica je ostavljena 4 sata na sobnoj temperaturi kako bi se odvijala reakcija degradacije. Nakon 4 sata dodano je 7 mL 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH kako bi se neutralizirala otopina te je tikvica nadopunjena diluentom do oznake.

U četvrtu tikvicu odvagano je 25 mg DAS, zatim je dodano 3 mL diluenta i 7 mL 0,1 mol L<sup>-1</sup> NaOH. Tikvica je ostavljena 4 sata na sobnoj temperaturi kako bi se odvijala reakcija degradacije. Nakon 4 sata dodano je 7 mL 0,1 mol L<sup>-1</sup> HCl kako bi se neutralizirala otopina te je tikvica nadopunjena diluentom do oznake.

U petu tikvicu odvagano je 25 mg DAS, zatim je dodano 3 mL diluenta i 7 mL 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH. Tikvica je ostavljena 4 sata na sobnoj temperaturi kako bi se odvijala reakcija degradacije. Nakon 4 sata dodano je 7 mL 1 mol L<sup>-1</sup> HCl kako bi se neutralizirala otopina te je tikvica nadopunjena diluentom do oznake.

U šestu tikvicu dodano je 25 mg DAS, zatim je dodano 3 mL diluenta i 7 mL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ostavljeno je na sobnoj temperaturi 4 sata i nakon toga dodan je diluent do oznake na tikvici.

Sve pripremljene otopine prvo su analizirane tehnikom UHPLC uz DAD detektor, a kasnije su korištene za LC-MS i LC-MS/MS analize.

### 3.4. Uvjeti mjerenja UHPLC analize

Prethodno pripremljeni uzorci (poglavlje 3.2.) su prebačeni u vijale i postavljeni na UHPLC instrument *Agilent Technologies 1290 Infinity II* s kvaternom pumpom i s detektorom s nizom dioda (DAD). Najprije je provedena analiza na pet različitih kolona (tablica 4), te su zatim na odabranoj koloni koja je imala najbolje razdvajanje napravljene analize pri različitim temperaturama kolone, različitom pH mobilne faze i vremenu gradijenta. Eksperimentalni uvjeti navedeni su u tablicama od 5. do 23.

Tablica 4. Eksperimentalni uvjeti analiza na različitim kromatografskim kolonama

<b>Kolona A i punilo</b>	Acquity BEH C18 1,7 $\mu$ m; 2,1mm $\times$ 100mm		
<b>Kolona B i punilo</b>	Acquity UPLC CSH C18 1,7 $\mu$ m; 2,1mm $\times$ 100mm		
<b>Kolona C i punilo</b>	Waters Symmetry Shield RP18 3,5 $\mu$ m; 4,6mm $\times$ 150mm		
<b>Kolona D i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl 1,7 $\mu$ m; 2,1mm $\times$ 100mm		
<b>Kolona E i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1.7 $\mu$ m; 2,1mm $\times$ 100mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	10	10	90
	10,01	95	5
	12,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu$ L (kolona C – 3 $\mu$ L)		
<b>Protok</b>	0,4 mL min <sup>-1</sup> (kolona C – 1 mL min <sup>-1</sup> )		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 5. Podaci o prvom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	10	10	90
	10,01	95	5
	12,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 6. Podaci o drugom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	10	10	90
	10,01	95	5
	12,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		



Tablica 7. Podaci o trećem eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	20	10	90
	20,01	95	5
	22,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 8. Podaci o četvrtom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	20	10	90
	20,01	95	5
	22,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		

Tablica 9. Podaci o petom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	30	10	90
	30,01	95	5
	32,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 10. Podaci o šestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	30	10	90
	30,01	95	5
	32,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		

Tablica 11. Podaci o sedmom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 1,5		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	10	10	90
	10,01	95	5
	12,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 12. Podaci o osmom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 1,5		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	10	10	90
	10,01	95	5
	12,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		

Tablica 13. Podaci o devetom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 1,5		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	20	10	90
	20,01	95	5
	22,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 14. Podaci o desetom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 1,5		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	20	10	90
	20,01	95	5
	22,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		

Tablica 15. Podaci o jedanaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 1,5		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	30	10	90
	30,01	95	5
	32,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 16. Podaci o dvanaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 1,5		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	30	10	90
	30,01	95	5
	32,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		

Tablica 17. Podaci o trinaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	10	10	90
	10,01	95	5
	12,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 18. Podaci o četrnaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	10	10	90
	10,01	95	5
	12,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		

Tablica 19. Podaci o petnaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	20	10	90
	20,01	95	5
	22,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 20. Podaci o šesnaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	20	10	90
	20,01	95	5
	22,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		

Tablica 21. Podaci o sedamnaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	30	10	90
	30,01	95	5
	32,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	30 °C		

Tablica 22. Podaci o osamnaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 3		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	30	10	90
	30,01	95	5
	32,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	60 °C		



Tablica 23. Podaci o devetnaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	10	90
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	45 °C		

### 3.5. DryLab metoda

DryLab paketom obrađeni su rezultati dobiveni nizom UHPLC analiza navedenih u poglavlju 3.4. Kao rezultat obrade podataka DryLab-om dobiven je računalni model koji opisuje odabrani sustav i promjene u funkciji gradijenta vremena, temperature i pH te optimalna metoda za analizu dasatiniba, onečišćenja i degradacijskih produkata dasatiniba. Kao provjera računalnog modela dobivenog DryLab-om korišteni su rezultati UHPLC metode navedeni u tablici 24. Robusnost UHPLC metode dobivene računalnim paketom DryLab ispitana je pri eksperimentalnim uvjetima opisanim u tablicama 25. do 31.

Tablica 24. Podaci o deventnaestom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

Tablica 25. Podaci o dvadesetom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	45 °C		

Tablica 26. Podaci o dvadeset i prvom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	55 °C		

Tablica 27. Podaci o dvadeset i drugom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 1,9		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

Tablica 28. Podaci o dvadeset i trećem eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2,1		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

Tablica 29. Podaci o dvadeset i četvrtom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2,1		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,3 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 °C		

Tablica 30. Podaci o dvadeset i petom eksperimentu provedenom na UHPLC instrumentu

Kolona i punilo	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
Mobilna faza A	10 mmol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 2,1		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme (min)	% Eluens A	% Eluens B
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
Volumen injektiranja	1 $\mu\text{L}$		
Protok	0,5 mL/min		
Detektor	210 nm		
Temperatura kolone	50 °C		

### 3.6. Uvjeti mjerenja LC-MS i LC-MS/MS analize

Za provođenje LC-MS i LC-MS/MS analiza koristio se spregnuti sustav koji sadrži *Agilent UHPLC 1290 Infinity* kromatograf s binarnom pumpom uz detektor s nizom dioda (DAD) i *Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF* spektrometar masa. Sastojci smjese odijeljeni su se na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1.7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm  $\times$  100 mm* uz primjenu fosfatnog pufera koji je potom zamijenjen 1%-tnom otopinom mravlje kiseline (proizvođač Bisolve B.V.) jednake pH-vrijednost kako bi se spojevi mogli detektirati spektrometrijom masa. Uvjeti LC-MS analize određeni pomoću DryLab računalnog modela nalaze se u tablici 33. Provedeni su MS/MS eksperimenti, odnosno ioni odgovarajuće vrijednosti  $m/z$  fragmentirani su pri različitim energijama sudara (0, 10, 20 i 30 eV).

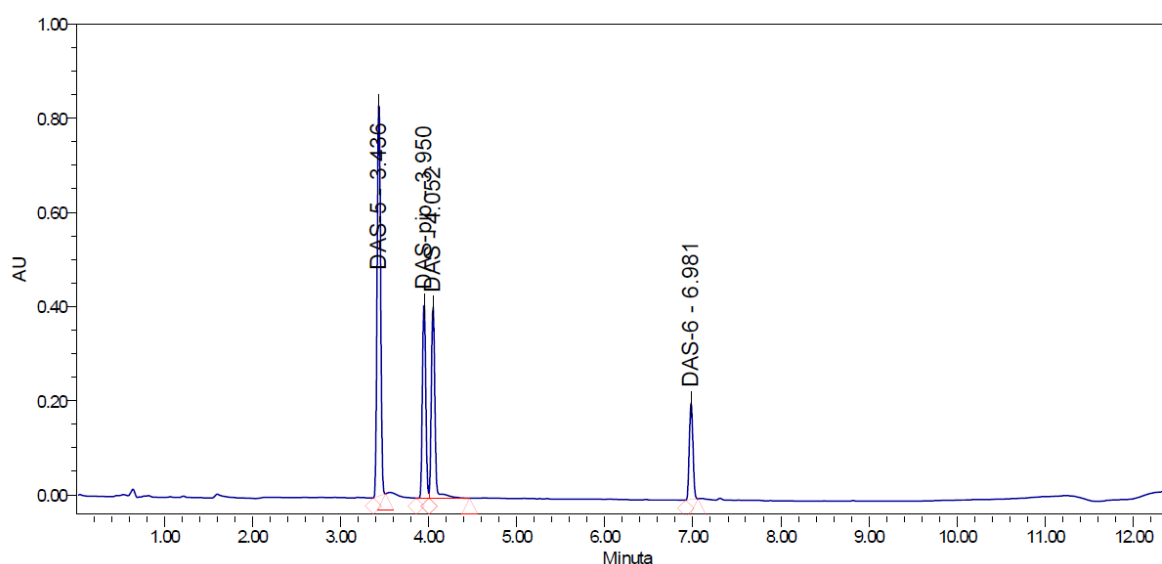
Tablica 31. Podaci o eksperimentu provedenom na LC-MS i LC-MS/MS instrumentu

<b>Kolona i pakiranje</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	HCOOH pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 $^{\circ}\text{C}$		

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati UHPLC analiza

U svrhu razvoja UHPLC metode najprije je provedeno pet analiza otopine dasatiniba i poznatih onečišćenja na pet različitih kromatografskih kolona. Kromatografski uvjeti UHPLC analize su bili: temperatura kolone 30 °C i pH-vrijednost fosfatnog pufera 2 (slike od D1. do D8. i slika 9.). Usporedbom kromatograma dobivenih analizama na različitim kolonama i pri navedenim uvjetima utvrđeno je da se najbolje razdvajanje analita postiže na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm* (slika 9.).



Slika 9. Kromatogram otopine dasatiniba i triju poznatih onečišćenja na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm*. Temperature kolone ( $T_g$ ) = 30 °C, vrijeme gradijentnog eluiranja (tg) = 10 min

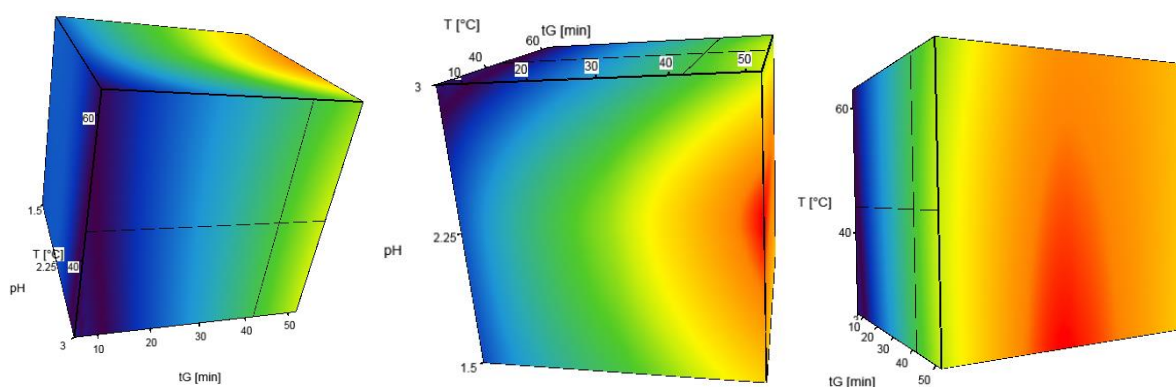
Kolona *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm* odabrana je za razvoj UHPLC metode za analizu smjese dasatiniba i poznatih onečišćenja. Na odabranoj koloni, *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm*, provedena su četiri eksperimenta (pH-vrijednost fosfatnog pufera 2, temperatura kromatografske kolone = 30°C, vrijeme gradijentnog eluiranja = 10 min) u svrhu određivanja vremena zadržavanja

dasatiniba (DAS) i poznatih nečistoća: Dasatinib 5 (DAS-5), Dasatinib 5 (DAS-5), Dasatinib 6 (DAS-6) i nečistoće Dasatinib piprerazin (DAS-PIP) (slike od D9. do D13.).

Zatim je na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm* provedeno osamnaest UHPLC eksperimenata u kojima se mijenjala temperatura kolone (Tg), pH fosfatnog pufera i vrijeme gradijentnog eluiranja (tg). Kromatogrami UHPLC eksperimenata su prikazani na slikama D14. do D51. Navedeni rezultati eksperimenata korišteni su u optimizaciji UHPLC metode računalnim paketom DryLab.

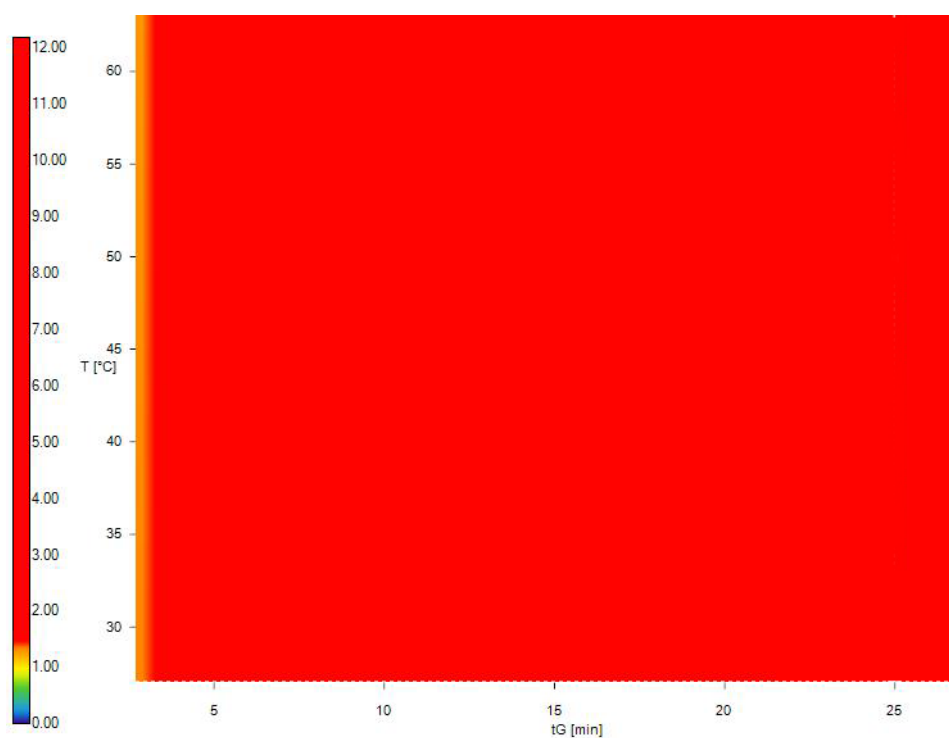
## 4.2. Rezultati DryLab metode i analize robusnosti

Obradom kromatograma dobivenih UHPLC analizama s programskim paketom DryLab dobiven je 3D računalni model odabranog sustava (slika 10. i 11.). Daljnjom analizom dobivenog računalnog modela određeni su uvjeti pri kojima je postignuto najbolje razdvajanje s obzirom na vrijeme gradijentnog eluiranja (tg), temperaturu kolone (Tg) i pH-vrijednost fosfatnog pufera koji služi kao mobilna faza. Optimirani uvjeti za UHPLC eksperiment su navedeni u tablici 32.



Slika 10. Grafički prikaz 3D računalnog modela dobivenog metodom DryLab



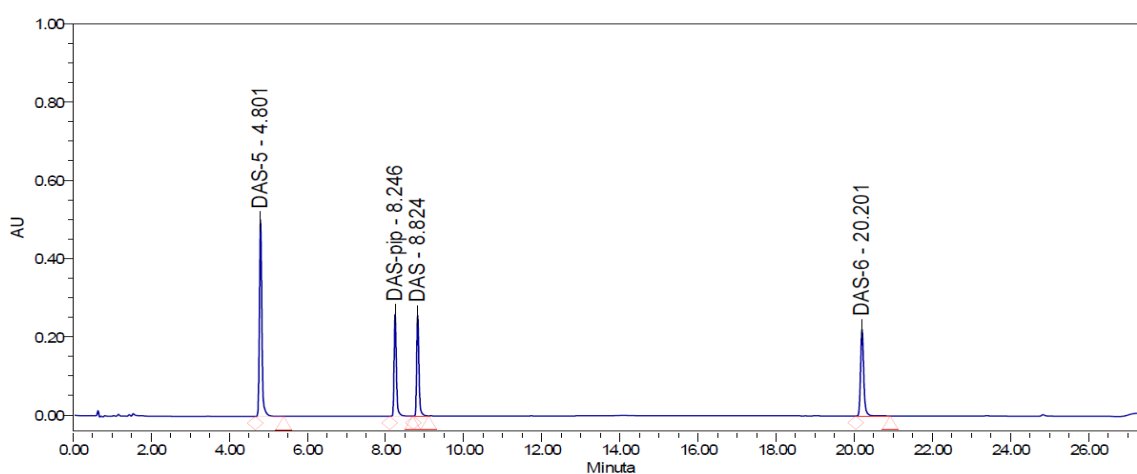


Slika 11. Grafički prikaz 2D računalnog modela odabranog sustava dobivenog metodom DryLab pri pH pufera = 2

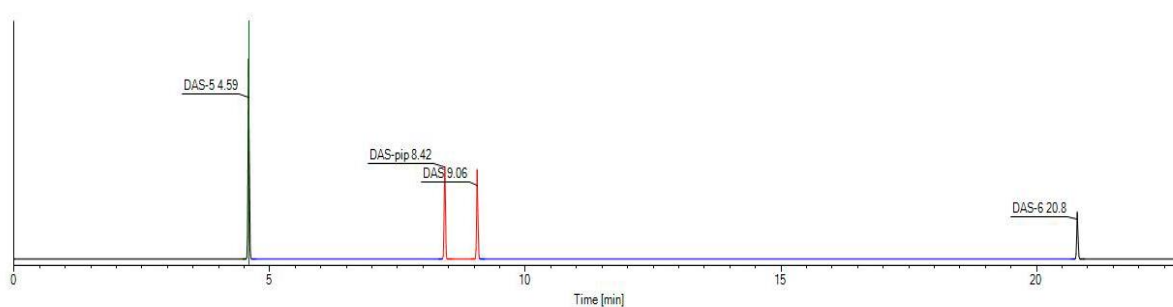
Tablica 32. Podaci o optimiziranom eksperimentu za UHPLC

<b>Kolona i punilo</b>	Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 $\mu\text{m}$ ; 2,1 mm $\times$ 100 mm		
<b>Mobilna faza A</b>	HCOOH pH = 2		
<b>Mobilna faza B</b>	ACN		
<b>Gradijent</b>	<b>Vrijeme (min)</b>	<b>% Eluens A</b>	<b>% Eluens B</b>
	0	95	5
	25	55	45
	25,01	95	5
	27,5	95	5
<b>Volumen injektiranja</b>	1 $\mu\text{L}$		
<b>Protok</b>	0,4 mL/min		
<b>Detektor</b>	210 nm		
<b>Temperatura kolone</b>	50 $^{\circ}\text{C}$		

Koristeći optimirane parametre navedene u tablici 32. provedena je UHPLC analiza otopine dasatiniba i poznatih onečišćenja. Kromatogram UHPLC analize otopine dasatiniba i poznatih onečišćenja prikazana je na slici 12. Teoretski kromatogram dobiven računalnim paketom DryLab prikazan je na slici 13. Usporedbom kromatograma koji je dobiven UHPLC analizom s kromatogramom koji je dobiven optimizacijom računalnim programom DryLab vidljivo je da se vremena zadržavanja dasatiniba i tri poznata onečišćenja maksimalno razlikuju za 0,6 min. Korekcijom vremena zadržavanja određenih DryLab-om dobiva se dobro slaganje s vremenima zadržavanja dobivenih UHPLC analizom.



Slika 12. Kromatogram otopine dasatiniba i tri poznata onečišćenja pri optimalnim uvjetima: temperatura kolone ( $T_g$ ) = 50 °C, vrijeme gradijentnog eluiranja ( $t_g$ ) = 25 min i pH pufera = 2



Slika 13. Izračunati kromatogram otopine dasatiniba i tri poznata onečišćenja pri optimalnim uvjetima: temperatura kolone ( $T_g$ ) = 50 °C, vrijeme gradijentnog eluiranja ( $t_g$ ) = 25 min i pH pufera = 2

Zatim je otopina dasatiniba i poznatih onečišćenja analizirana šest puta pri malo promijenjenim eksperimentalnim uvjetima kako bi se ispitala robustnost metode. U tim UHPLC eksperimentima bio je variran po jedan parametar: temperatura kolone (45 °C i 55 °C), pH-vrijednost fosfatnog pufera (1,9 i 2,1) i protok mobilne faze (0,3 mL/min i 0,5 mL/min). Kromatogrami UHPLC analiza u kojima su bili varirani navedeni parametri prikazani su na slikama D52. do D64. Na temelju navedenih kromatograma zaključuje se da je optimirana UHPLC metoda robusna.

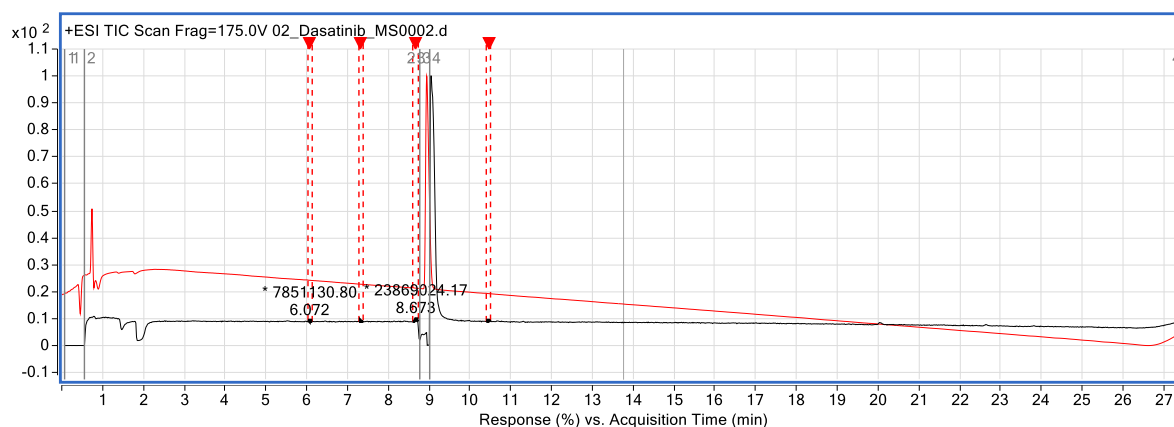
### 4.3. Analiza razgradnih produkata dasatiniba vezanim sustavom LC-MS

Forsirana razgradnja dasatiniba provedena je pri sobnoj temperaturi u trajanju od 4 sata, koristeći otopine 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl, 1 mol dm<sup>-3</sup> HCl, 0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaOH, 1 mol dm<sup>-3</sup> NaOH, 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i pri povišenoj temperaturi od 60°C. Uz navedene uzorke za forsiranu razgradnju pripremljen je uzorak koji nije bio podvrgnut forsiranoj razgradnji, a korišten je kao kontrolni uzorak.

Nakon što su uzorci dasatiniba podvrgnuti forsiranoj razgradnji pri povišenoj temperaturi, u kiselom mediju, u lužnatom mediju i uz prisutstvo vodikovog peroksida analizirani su UHPLC-om pri sljedećim uvjetima: temperatura kolone (T<sub>g</sub>) = 50 °C, pH-vrijednosti fosfatnog pufera = 2 i vrijeme gradijentnog eluiranja = 25 min. Kromatogrami su prikazani na slikama D65. do D71. Jedino je u kromatogramu uzorka koji je bio podvrgnut forsiranoj razgradnji s 30 %-tnim vodikovim peroksidom uočen pik pripisan razgradnom produktu (DAD detektor, valna duljina = 210 nm).

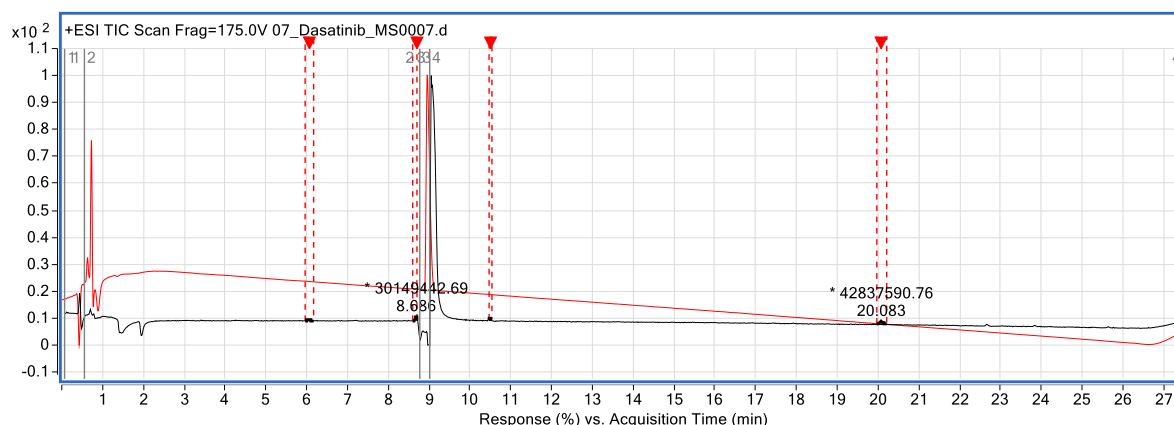
Kako bi se odredila struktura razgradnog produkta koji nastaje djelovanjem vodikovog peroksida na dasatinib, te ispitali eventualno drugi nastali razgradni produkti koji ne apsorbiraju pri 210 nm, svi uzorci koji su bili podvrgnuti forsiranoj razgradnji analizirani su i vezanim sustavom LC-MS. Uvjeti LC-MS analize bili su jednaki uvjetima UHPLC analize: temperatura kolone = 50 °C, vrijeme gradijentnog eluiranja = 25 min uz razliku da je fosfatni pufer pH-vrijednosti 2 zamijenjen vodenom otopinom mravlje kiseline pH-vrijednosti 2. Pri navedenim uvjetima analizirano je sedam uzoraka, uključujući jedan netretirani uzorak koji je služio kao kontrolni uzorak. MS spektri (Slike D72–D110) nalaze se u dodatku u poglavljima od 8.6.1. do 8.6.7.

Najprije je analiziran uzorak dasatiniba koji nije bio podvrgnut forsiranoj razgradnji (slika 14.). U kromatogramu su označena četiri signala koja potječu od sintetskih nečistoća nastalih uslijed djelovanja atmosferskih uvjeta, dok najveći signal odgovara dasatinibu. Na temelju LC-MS analize (slika 14.) određena su vremena zadržavanja onečišćenja koja nisu nastala forsiranom razgradnjom.



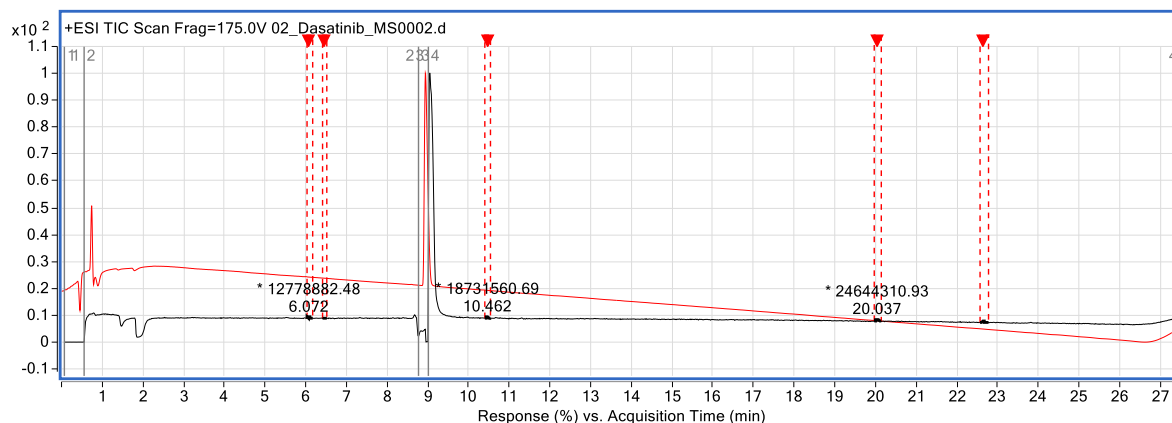
Slika 14. Kromatogram otopine dasatiniba. Crvena krivulja – primijenjen detektor s nizom dioda; crna krivulja – primijenjen spektrometar masa kao detektor

Potom je LC-MS-om analiziran uzorak otopine dasatiniba koji je bio izložen povišenoj temperaturi od 60°C (slika 15.). Pri usporedbi dobivenog kromatograma s kromatogramom netretiranog uzorka primjećuju se pikovi koji odgovaraju poznatim onečišćenjima i dodatan signal vrlo malog intenziteta pri vremenu zadržavanja ( $t_R$ ) 20,083 min. U spektru masa snimljenom pri  $t_R = 20,083$  min najintenzivniji je signal omjera  $m/z$  343,29580.

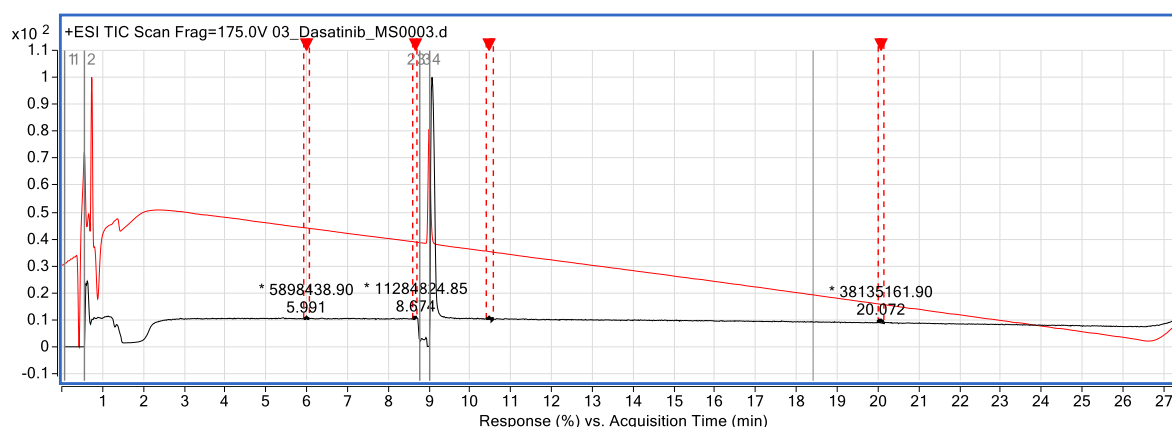


Slika 15. Kromatogram otopine dasatiniba izložene povišenoj temperaturi (60 °C). Crvena krivulja – primijenjen detektor s nizom dioda; crna krivulja – primijenjen spektrometar masa kao detektor

Zatim su LC-MS-om analizirani uzorci dasatiniba koji su prilikom forsirane razgradnje tretirani s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  otopinom HCl (slike 16. i 17.). U kromatogramima uzoraka dasatiniba koji su podvrgnuti forsiranoj razgradnji u kiselim uvjetima primjećuju se signali vrlo malog intenziteta pri vremenu zadržavanja od 20,037 min ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl-a) i 20,072 min ( $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl-a). Analizom odgovarajućih spektra masa (snimljenih u vremenu 20,037 i 20,072 min) zaključeno je da su najintenzivniji signali pri omjerima  $m/z$  343,29585 ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl) i  $m/z$  343,29576 ( $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl). Kako su ti pikovi u kromatogramima na vrlo bliskim vremenima zadržavanja, a signali u spektrima masa su vrlo sličnog omjera  $m/z$ , odnosno njihova je razlika manja od 10 ppm-a, može se zaključiti da ti signali odgovaraju istim produktima. Nadalje, iz dobivenih rezultata vidljivo je da se povećanjem koncentracije kiseline (HCl) povećava koncentracija navedenog razgradnog produkta dasatiniba.



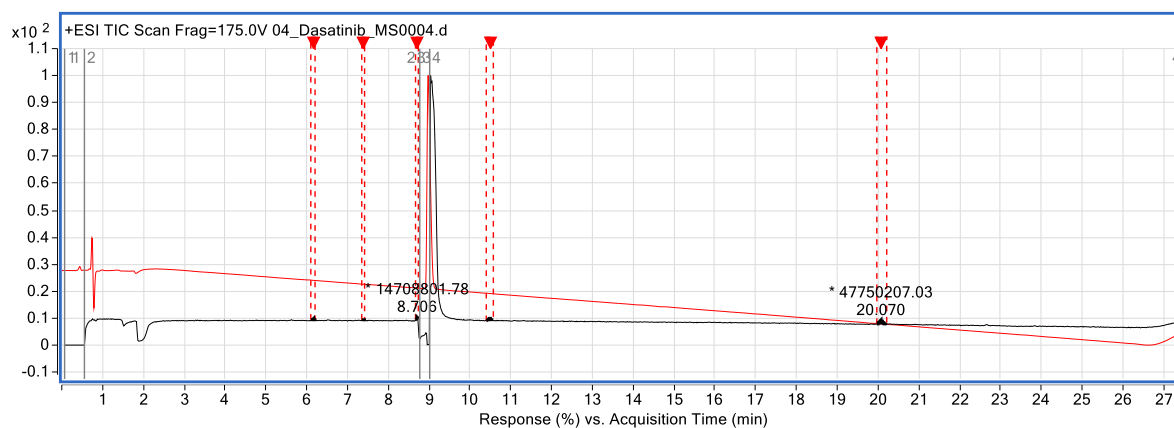
Slika 16. Kromatogram otopine dasatiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl. Crvena krivulja – primijenjen detektor s nizom dioda; crna krivulja – primijenjen spektrometar masa kao detektor



Slika 17. Kromatogram otopine dasatiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji s  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl. Crvena krivulja – primijenjen detektor s nizom dioda; crna krivulja – primijenjen spektrometar masa kao detektor

Uzorci dasatiniba također su podvrgnuti forsiranoj degradaciji s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  i  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH, a zatim analizirani LC-MS-om. Usporedbom kromatograma uzoraka koji su podvrgnuti forsiranoj razgradnji s NaOH (slike 18. i 19.) s kontrolnim uzorkom (slika 14.), u kromatogramu uzorka koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH uočen je samo jedan dodatni pik dok su u kromatogramu uzorka koji je tretiran  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH

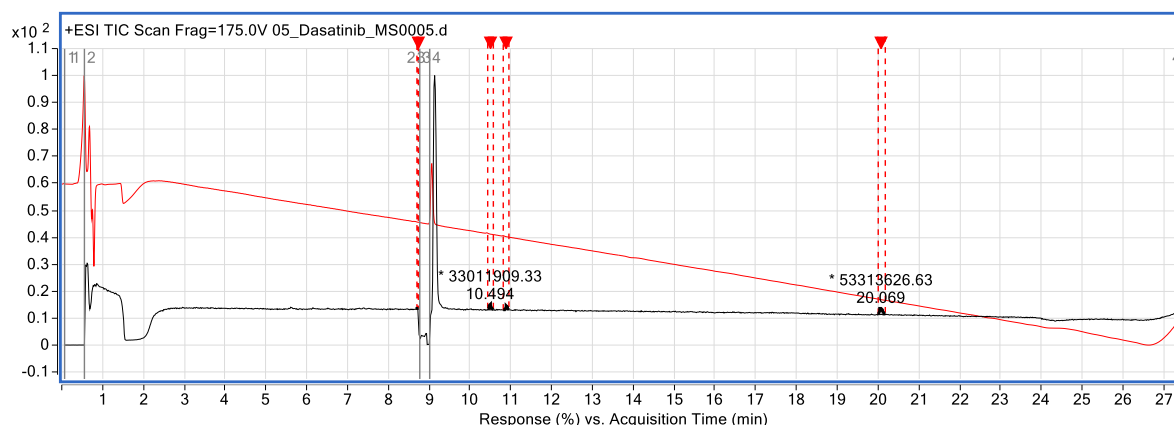
uočena tri pika. U kromatogramu otopine dasatiniba koji je tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH primjećuju se signal pri vremenu zadržavanja 20,070 min. Analizom pripadnog MS spektra vidljivo je da signal najvećeg intenzitet daje ion omjera  $m/z$  343,29581, koji potječe od istog razgradnog produkta koji nastaje razgradnjom u kiselom mediju.



Slika 18. Kromatogram otopine dasatiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Crvena krivulja – primijenjen detektor s nizom dioda; crna krivulja – primijenjen spektrometar masa kao detektor

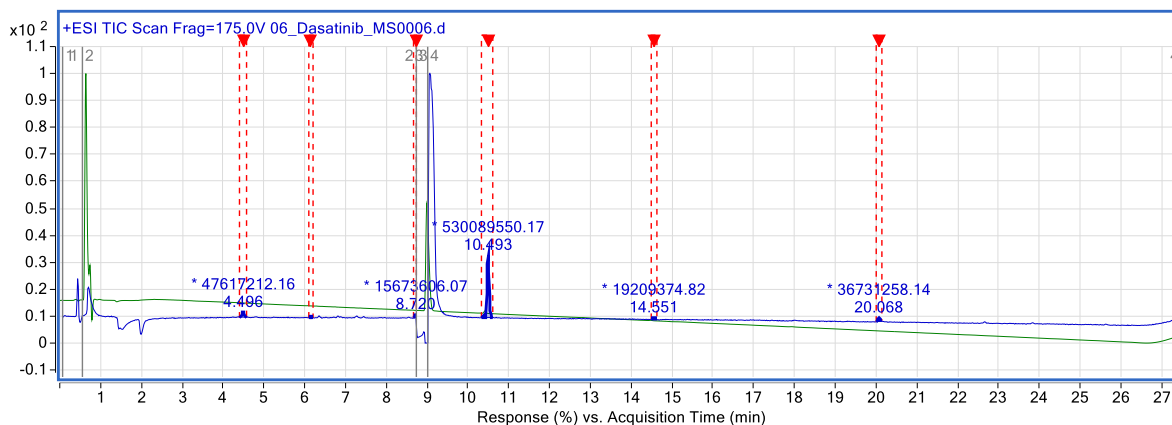
Analizom kromatograma uzoraka koji su podvrgnuti forsiranoj degradaciji s  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH vidljiva su dva dodatna signala u usporedbi s kromatogramom prethodno opisane razgradnje ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH). Prvi primijećeni pik u kromatogramu uzorka dasatiniba koji je tretiran s  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH nalazi se pri vremenu zadržavanja ( $t_R$ ) od 10,494 min dok je drugi pik pri  $t_R = 10,910$  min. Sastojak pri  $t_R = 10,494$  min u MS spektru ima najintenzivniji signala pri omjeru  $m/z$  504,15783. Drugi razgradni produkt (pik pri  $t_R = 10,910$  min) u MS spektru ima najintenzivniji signal pri omjeru  $m/z$  522,12407. U svim kromatogramima uočen je pik pri vremenu zadržavanja od 20,069 min.



Slika 19. Kromatogram otopine dasatiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji s  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH. Crvena krivulja – primijenjen detektor s nizom dioda; crna krivulja – primijenjen spektrometar masa kao detektor

U kromatogramu otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj degradaciji s 30 %-tnom otopinom  $\text{H}_2\text{O}_2$  (slika 20.) nalaze su četiri pika koja su se posljedica nastanka ili povećane koncentracije odgovarajućeg sastojka uslijed forsirane razgradnje. Prvi pik u kromatogramu se nalazi pri vremenu zadržavanja ( $t_R$ ) od 4,496 min, a u pripadnom MS spektru najintenzivniji signal je pri omjeru  $m/z$  352,06276. Sljedeći pik u kromatogramu je ujedno i najintenzivniji, a nalazio se  $t_R = 10,493$  min. U odgovarajućem MS spektru najintenzivniji signal je pri omjeru  $m/z$  504,15852. Pik pri vremenu zadržavanja od 10,493 min primijećen je i u svim prethodnim uzorcima (kontrolnom uzorku i uzorcima nakon forsirane degradacije) ali vrlo malog intenziteta u odnosu na uzorak tretiran s 30 %-tnim  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sljedeći pik u kromatogramu uzorka otopine dasatiniba podvrgnutog forsiranoj razgradnji s 30 %-tnim  $\text{H}_2\text{O}_2$  uočen je pri  $t_R = 14,651$  min. Analizom pripadnog MS spektra uočen je ion  $m/z$  353,04670. Posljednji pik u kromatogramu uzorka otopine dasatiniba podvrgnutog forsiranoj razgradnji s 30 %-tnim  $\text{H}_2\text{O}_2$  je pri ukupnom vremenu zadržavanja ( $t_R$ ) 20,068 min. Analizom MS spektra odgovarajućeg sastojka smjese uočen je ion pri  $m/z$  343,29577. Ion omjera  $m/z$  343,29577 detektiran je u svim uzorcima koji su podvrgnuti forsiranoj degradaciji kao i uzorku koji je služio kao kontrolni uzorak.





Slika 20. Kromatogram otopine dasatiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji s 30 %-tnom otopinom  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zelena krivulja – primijenjen detektor s nizom dioda; plava krivulja – primijenjen spektrometar masa kao detektor

Popis svih značajnih signala uočenih u MS spektrima svih uzoraka otopine dasatiniba koji su podvrgnuti forsiranoj degradaciji naveden je u tablici 33. Odgovarajući ioni analizirani su tehnikom LC-MS/MS u svrhu određivanja njihove strukture.

Tablica 33. Popis odabranih produkata nastalih forsiranom degradacijom

Ime produkta	Masa*	Detektirani u uzorku <sup>l</sup>
<b>DP1</b>	343,29562	a, b, c, d, e, f, g
<b>DP2</b>	352,06283	f
<b>DP3</b>	353,04686	f
<b>DP4</b>	504,15828	f (kod ostalih vrlo mala koncentracija)
<b>DP5</b>	522,12443	e

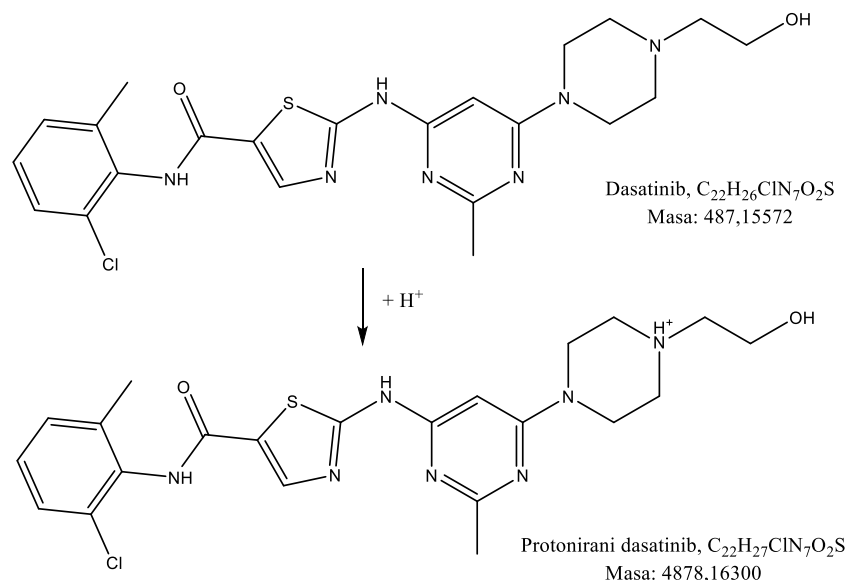
\* - Definirana masa je uzeta iz uzorka koji ima najveći intenzitet signala

<sup>l</sup> -Kazalo: a) kontrolni uzorak; b) uzorak podvrgnut  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl; c) uzorak podvrgnut  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl; d) uzorak podvrgnut  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH; e) uzorak podvrgnut  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH; f) uzorak podvrgnut 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; g) uzorak podvrgnut povišenoj temperaturi ( $60^\circ\text{C}$ )

#### 4.4. Analiza razgradnih produkta dasatiniba vezanim sustavom LC-MS/MS

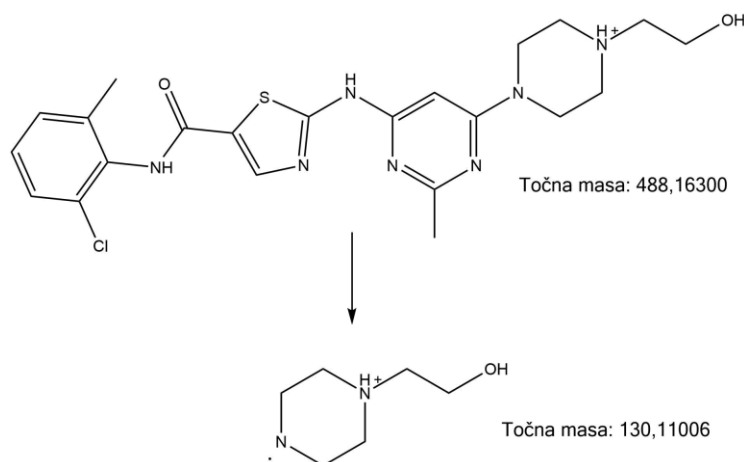
LC-MS/MS analiza je provedena pri temperaturi kolone 50 °C koristeći kromatografsku kolonu *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm* u vremenu gradijentnog eluiranja (tg) od 25 min i pH-vrijednosti vodene otopine mravlje kiseline 2 uz postavku odabira iona prekursora. Na temelju dobivenih rezultata iz poglavlja 4.3., odabrani su produkti koji su analizirani vezanim sustavom. Tako je analiziran produkt dasatiniba koji je bio podvrgnut forsiranoj razgradnji s 1 mol dm<sup>-3</sup> NaOH (pik pri  $t_R = 10,910$  min) pri čemu je kao ion prekursora odabrana ion omjera  $m/z$  522,12443. Ostali ioni  $m/z$  343,29562, 352,06283, 353,04686 i 504,15828 analizirani su iz uzorka otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s 30 %-tnom otopinom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vezanim sustavom LC-MS/MS prvo je analiziran sam dasatiniba u svrhu potvrđivanja analita i njegove strukture. Svi MS/MS spektri iona prekursora pri odabranim energijama kolizije prikazani su u poglavlju 8.7.

Analizom MS spektra kontrolnog uzorka, otopine dasatiniba, uočen je najintenzivniji signal pri omjeru  $m/z$  488,16327. Navedena masa odgovara protoniranom molekulskom ionu dasatiniba (C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S) čija točna masa iznosi  $m/z$  488,16300 (slika 21.). Prilikom LC-MS/MS analize iona prekursora  $m/z$  488,16327 korištene su energije kolizije od 10, 20, 30 i 40 eV (slike od D111. do D115.).

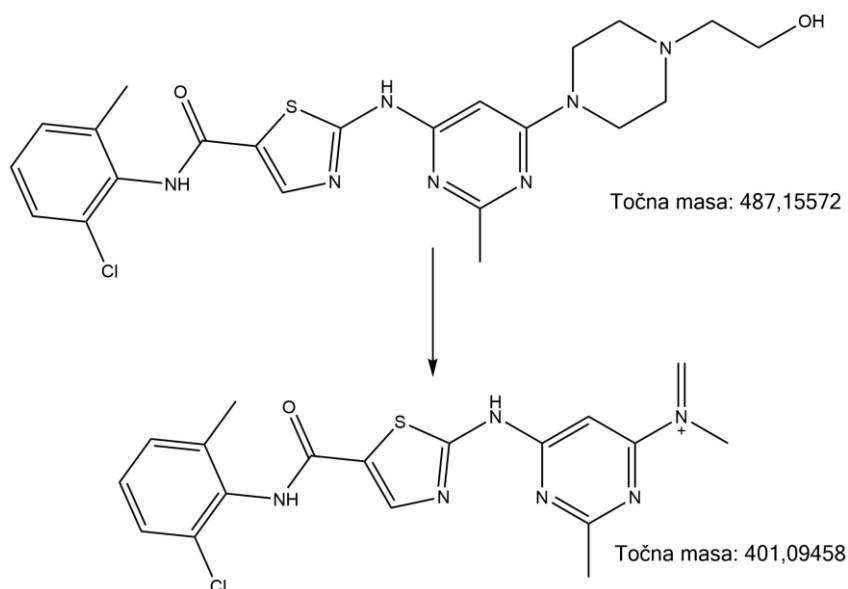


Slika 21. Prikaz pretpostavljene strukture molekulskog iona dasatiniba  
(točna masa: 488,16300; opaženi  $m/z$  488,16327)

Analizom MS/MS spektra iona prekursora omjera  $m/z$  488,16327, pri svim vrijednostima kolizijske energije uočena su dva signala, pri  $m/z$  130,08654 i 401,09102. Ion pri  $m/z$  130,08654 u MS/MS spektru pripisan je predloženom ionu točne mase 130,11006 (Slika 22.), dok ion čiji signal je zabilježen pri omjeru  $m/z$  401,09102 odgovara ionu  $m/z$  401,09458, opisanom u literaturi (slika 23.).<sup>34</sup>



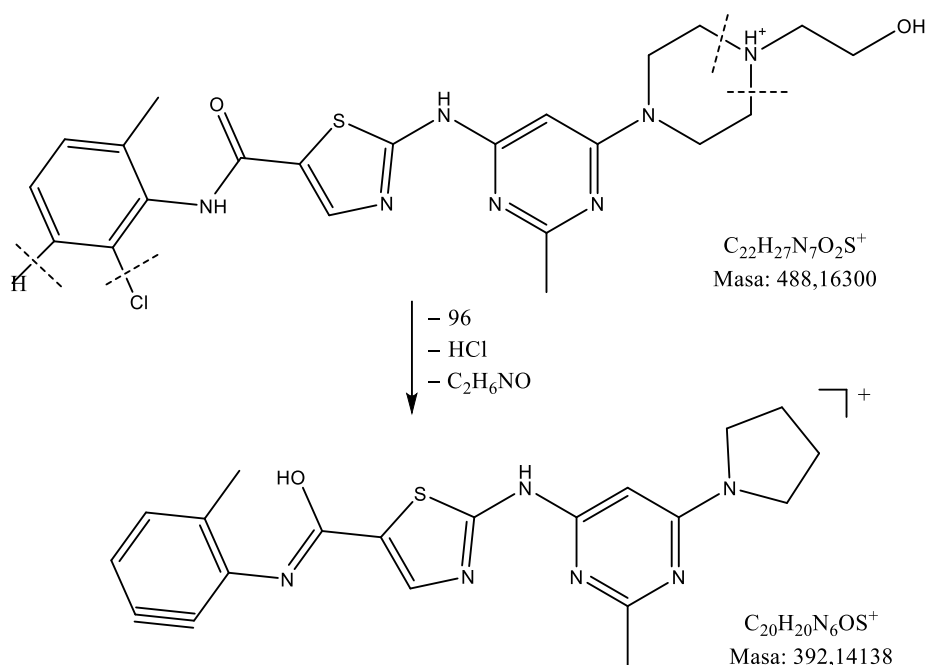
Slika 22. Prikaz pretpostavljene fragmentacije dasatiniba do fragmentnog iona (točna masa: 130,11006; opaženi  $m/z$  130,08654)



Slika 23. Prikaz pretpostavljene fragmentacije dasatiniba do fragmentnog iona (točna masa: 401,09458; opaženi  $m/z$  401,09102)

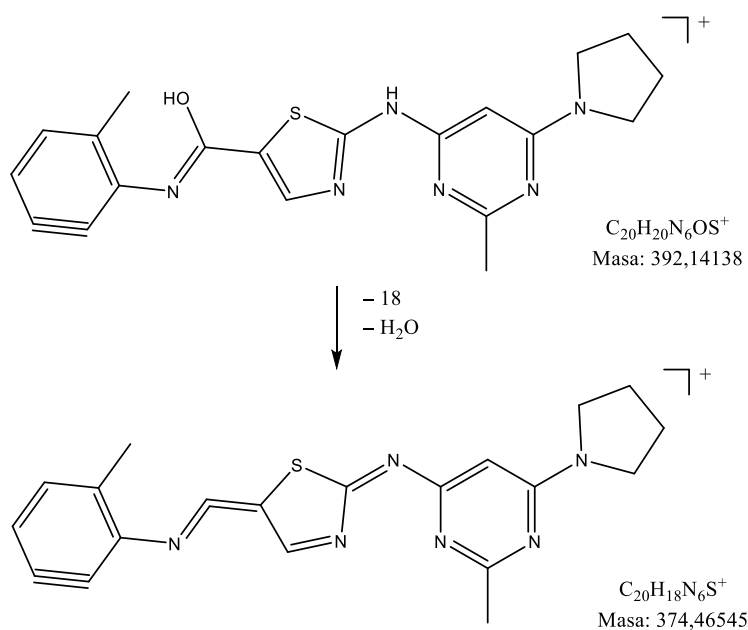
U MS/MS spektru dasatiniba (ion prekursor  $m/z$  488,16327) snimljenom pri većim vrijednostima kolizijskih energija nalaze se signali pri omjerima  $m/z$  391,804; 373,79953; 294,82858 i 293,83092. Mase detektiranih iona fragmenata razlikuju se od pretpostavljenih masa za više od 50 ppm-a.

Za ion čiji se signal u MS/MS spektru nalazi pri  $m/z$  391,804 pretpostavljena je struktura iona čija točna masa iznosi 392,14138 (slika 24.). Navedeni fragment mogao bi nastati pucanjem piperazinskog prstena dasatiniba (označeno na slici 24 iscrtanim linijama) i njegovom pregradnjom pri čemu nastaje peteročlani heterociklički sustav. Ujedno pucaju i veze u benzenskom sustavu (C–H i C–Cl) pri čemu nastaje benzinski sustav, što potvrđuje izostanak izotopnog signala  $[M+2]^+$  koji bi potjecao od atoma klora.



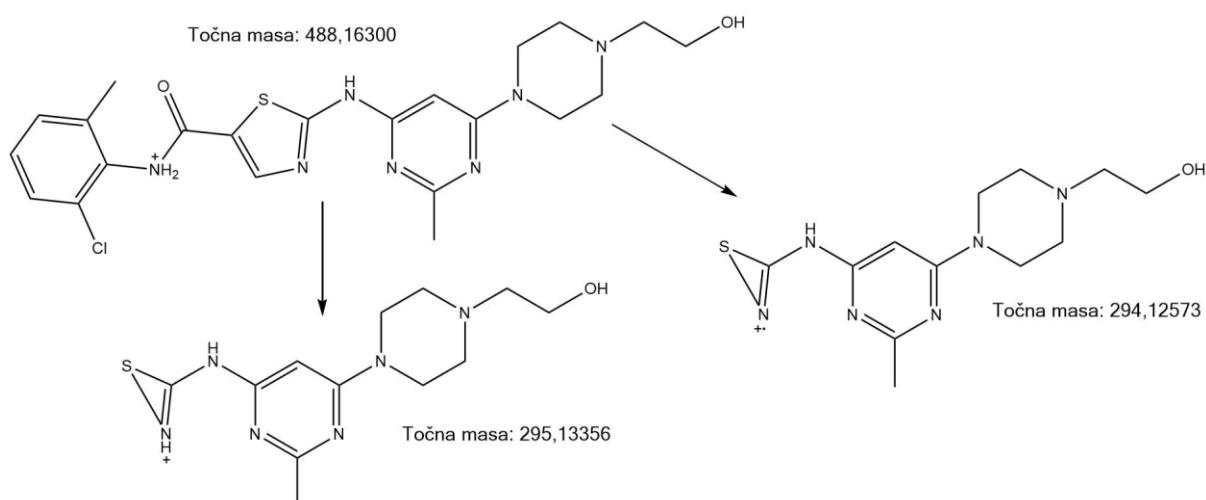
Slika 24. Prikaz moguće fragmentacije protonirane molekule dasatiniba do iona produkta omjera  $m/z$  391,804

Daljnjom fragmentacijom iona omjera  $m/z$  391,804 nastaje ion omjera  $m/z$  373,79953. Gubitak mase od 18,004 odgovarao bi gubitku molekule vode. Pretpostavljena fragmentacija prikazana je na slici 25. Predloženi ion ima točnu masu od 374,13082 Da.



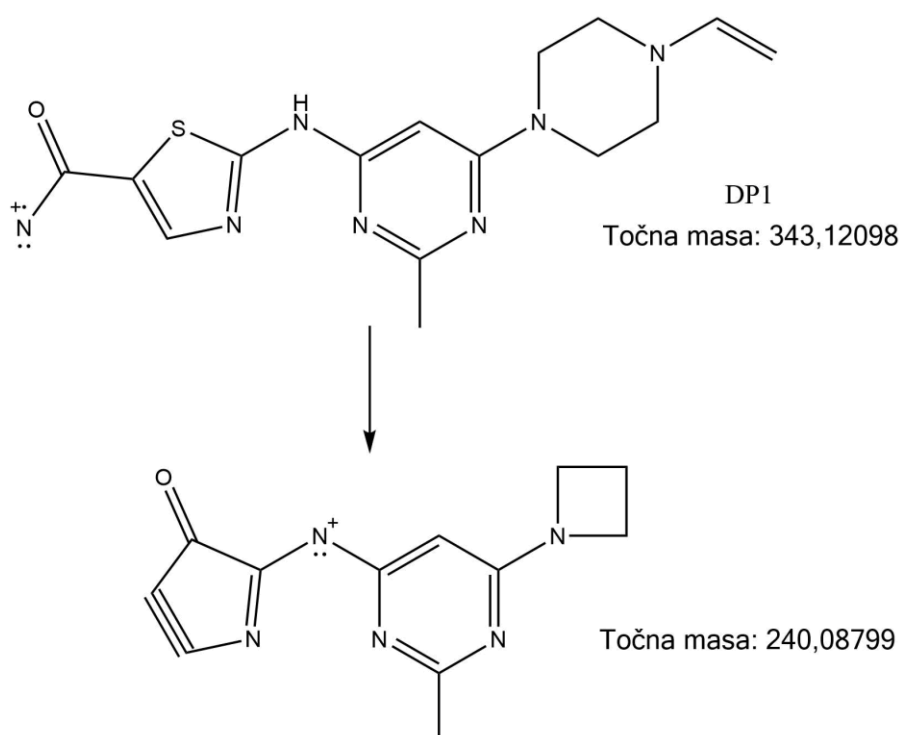
Slika 25. Prikaz moguće fragmentiranja iona omjera  $m/z$  391,804 do iona produkta omjera  $m/z$  373,79953

Za fragmentne ione koji imaju omjer  $m/z$  294,82858 i 293,83092 pretpostavljene su strukture nastale pucanjem peteročlanog hereocikličkog prstena dasatiniba i njegove pregradnje u tročlani heterociklički prsten (slika 26).



Slika 26. Prikaz moguće fragmentiranja dasatiniba i nastanak iona omjera  $m/z$  294,82858 i 293,83092

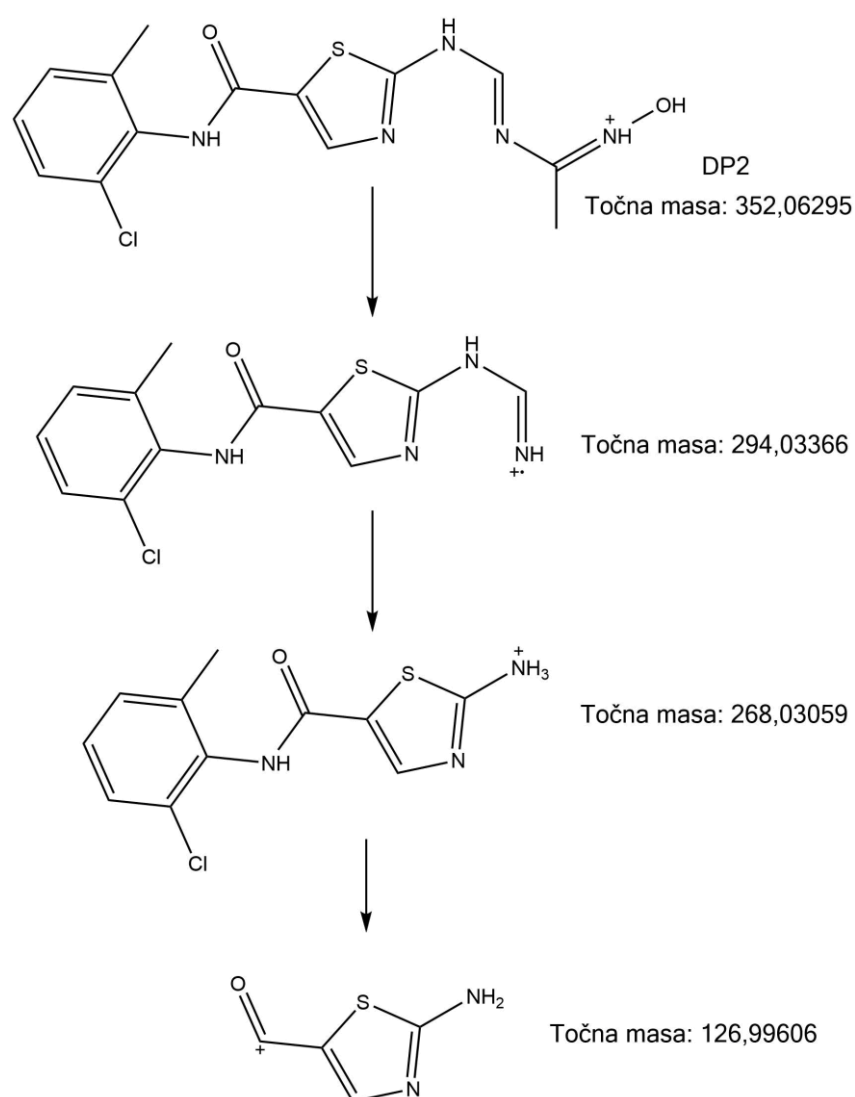
Nakon fragmentiranja molekuskog iona dasatiniba ( $m/z$  488,16300) i potvrđivanja njegove strukture, tandemnom spektrometrijom masa analizirani su produkti koji su nastali uslijed forsirane razgradnje dasatiniba (vidi tablicu 33). Najprije je analiziran produkt DP1 ( $m/z$  343,29562) koji je detektiran u svim uzorcima otopine dasatiniba. Analiziran je iz uzorka koji je bio podvrgnut forsiranoj razgradnji s 30 %-tnom otopinom  $H_2O_2$ , jer je u tom slučaju zabilježena njegova najveća koncentracija. MS/MS spektri iona prekursora omjera  $m/z$  343,29562 prikazani su na slikama D115. i D116, a predložena fragmentacija na slici 27. Omjer  $m/z$  u MS/MS spektru različit je od mase predloženog iona za više od 50 ppm-a.



Slika 27. Prikaz moguće fragmentacije iona DP1 ( $m/z$  343,29562) do iona  $m/z$  240,23230

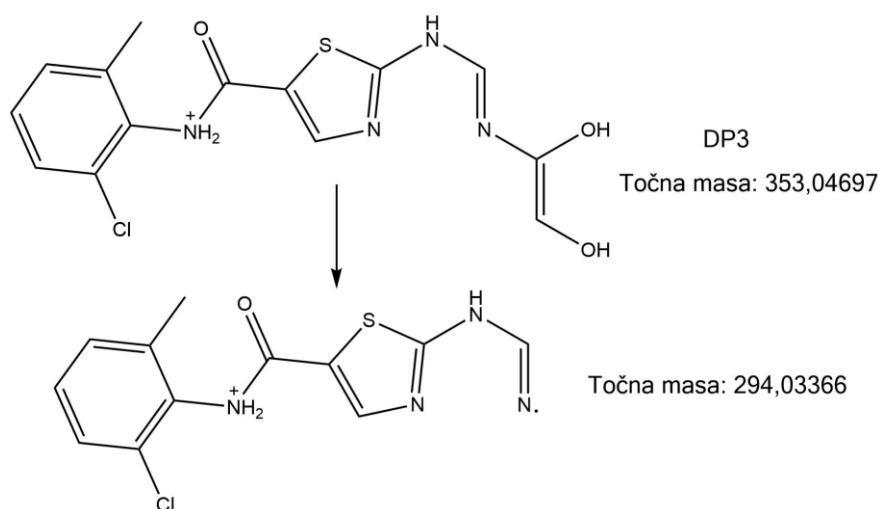
Potom je analiziran ion omjera  $m/z$  352,06284 (DP2) koji je detektiran u uzorku otopine dasatiniba podvrgnutog forsiranoj razgradnji s 30%  $H_2O_2$ . Pretpostavlja se da navedeni ion nastaje inverznom Diels-Alderovom reakcijom na pirimidinskom sustavu dasatiniba uslijed ionizacije uzorka te da zbog prisustva vodikovog peroksida nastaje oksimska funkcionalna skupina (Slika 28.). Analizom MS/MS spektra (Slika D117.) vidljivo je da fragmentacijom iona prekursora  $m/z$  352,06284 nastaju ioni omjera  $m/z$  294,00895, 268,02981 i 126,99568. Pretpostavljena fragmentacija prikazana je na slici 28.

Pretpostavljeno je da ion prekursor omjera  $m/z$  352,06284 odgovara teoretskom ionu točne mase 352,06295, fragment omjera  $m/z$  294,00895 odgovara ionu točne mase 294,03366, fragment omjera  $m/z$  268,02981 odgovara ionu točne mase 268,03059 te da fragment omjera  $m/z$  126,99568 odgovara fragmentnom ionu točne mase 126,99606. Prisutnost signala  $[M+2]^+$  u MS/MS spektru ukazuje na prisustvo atoma klora u fragmentu  $m/z$  352,06284 (DP1), 294,00895 i 268,02981. Signal  $[M+2]^+$  u MS/MS spektru iona  $m/z$  126,99568 nije prisutan što ukazuje da taj ion vrlo vjerojatno ne sadrži atom klora.



Slika 28. Prikaz fragmentacije iona DP2 (352,06284) do fragmenta  $m/z$  294,00895, 268,02981 i 126,99568

Predložena struktura iona prekursora DP3 omjera  $m/z$  353,04688 prikazana je na slici 29. na temelju MS/MS spektara (slike D118. i D119.). Pretpostavlja se da fragment DP3 nastaje pucanjem pirimidinskog prstena i reakcijom s  $H_2O$ , te da reakcijama nastaje diol. Na temelju MS/MS spektru dobivenom uz kolizijsku energiju od 20 eV može se zaključiti da je došlo do izrazite fragmentacija i nastajanja kompliciranih pregrađenih produkata za čiju analizu korišteni instrument nije dostatan. Moguće je da signal u MS/MS spektru iona omjera  $m/z$  294,00923 odgovara fragmentom ionu točne mase 294,03366 (slika 29.).

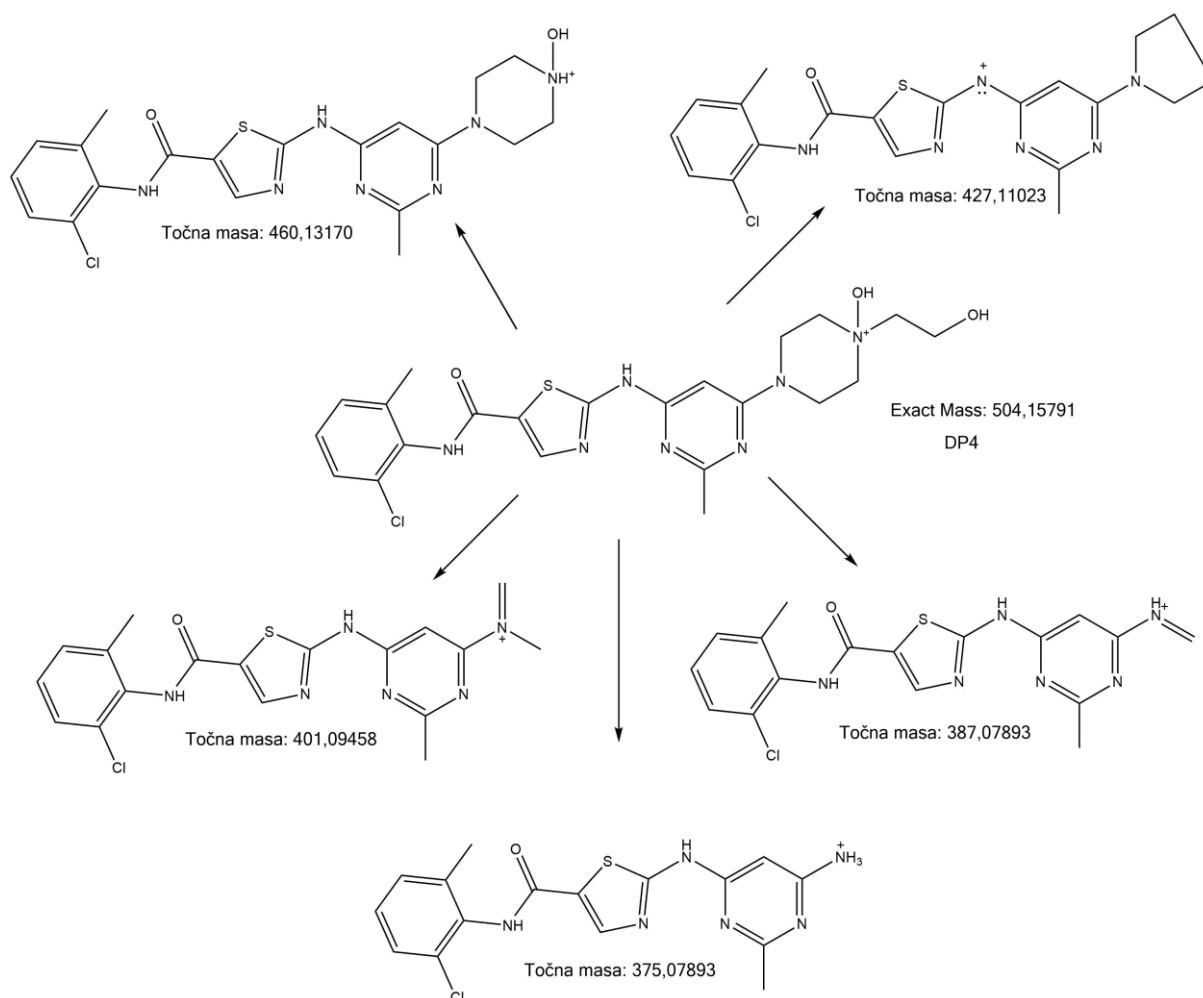


Slika 29. Prikaz fragmentacije iona DP3 do iona  $m/z$  294,00923

Zatim su analizirani MS/MS spektri sljedećeg produkta forsirane razgradnje DP4 ( $m/z$  504,15828, slike D120. i D121.). Na temelju dobivenih rezultata predviđena je struktura iona prekursora omjera  $m/z$  504,15828, te iona koji su nastali njegovom fragmentacijom:  $m/z$  460,13155; 427,10942; 401,09197; 387,07872 i 375,07772. Strukture s pripadnim točnim masama, a pretpostavljene na temelju MS/MS spektara dobivenim pri različitim kolizijskim energijama prikazane su na slici 30. Fragmentacijom je potvrđeno da se radi o dasatinib N-oksidu, a ne o nekom dugom spoju u kojem je hidroksilna skupinu na drugom položaju u molekuli.

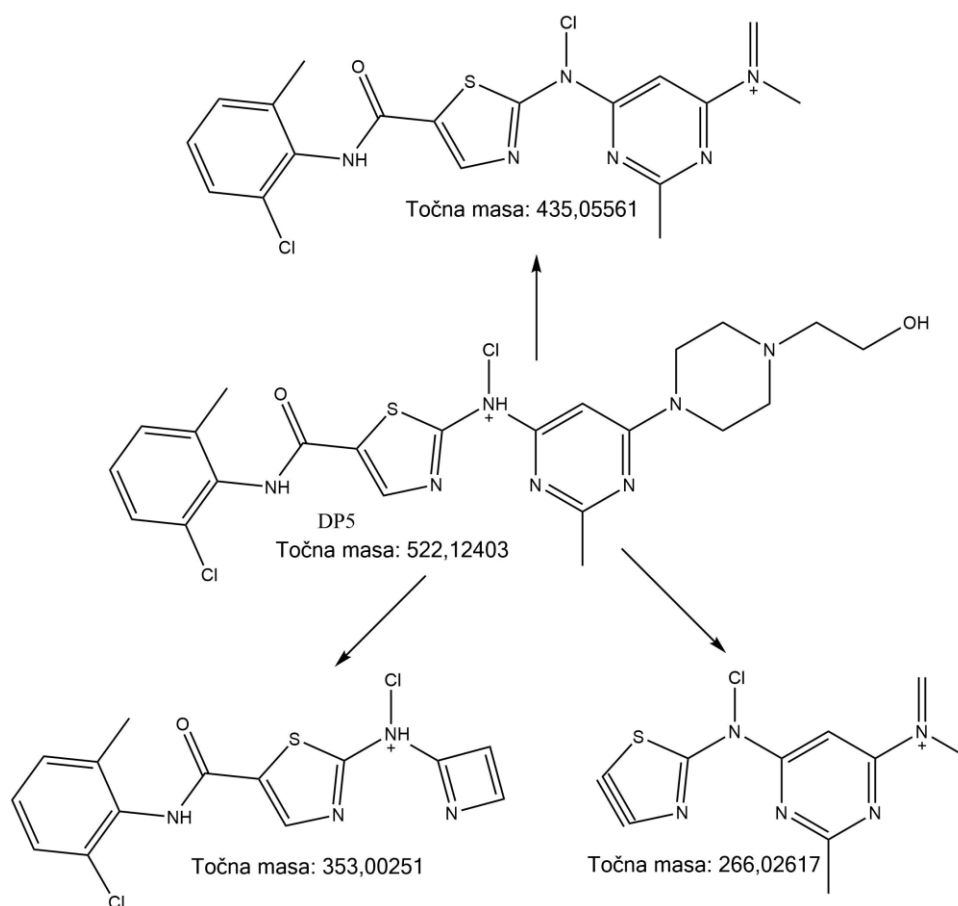
Ion omjera  $m/z$  504,15828 poznat je iz literaturi te je njegovo ime dasatinib N-oksidi. Navedeni spoj detektiran je kao metabolički produkt dasatiniba u prvoj fazi metaboličkih procesa.<sup>34</sup>





Slika 30. Fragmentacija razgradnog produkta DP4 do iona  $m/z$  460,13155; 427,10942; 401,09197; 387,07872 i 375,07772.

Posljednji analizirani produkt, DP5 ima omjer  $m/z$  522,12445. Analizom MS/MS spektara iona prekursora DP5 (Slike od D122. do D124.) odnosno signala  $m/z$  522,12445 i 524,12119 primjećuje se da su intenziteti signala podjednaki što je tipično za ione koji sadrže dva atoma klora, što je i pretpostavljeno u predloženoj strukturi. Vrlo vjerojatni mehanizam nastanak iona DP5 je nukleofilan napad atoma klora jedne molekule dasatiniba na drugu molekulu dasatiniba. Ioni fragmenata koji nastaju fragmentacijom iona DP5 imaju omjere  $m/z$ : 435,05453; 353,09521 i 266,02657. Položaj atoma klora u molekuli je riješen na temelju podataka iz MS/MS spektra. Prikaz struktura fragmenata koji su nastali fragmentacijom DP5 i njihovih izotopnih masa dan je na slici 31.



Slika 31. Fragmentacija razgradnog produkta DP5 do iona omjera  $m/z$  435,05453; 353,09521 i 266,02657

## § 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je razviti relativno jednostavnu i ponovljivu metodu za određivanje aktivne farmaceutske tvari – dasatiniba i njegovih produkata nastalih forsiranom razgradnjom. U tu svrhu korištena je tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti. Za odvajanje i kvalitativno određivanje produkata forsirane degradacije koristio se detektorom s nizom dioda. Kako bi se dobio uvid u strukturu nastalih razgradnih produkata korišten je vezani sustav LC-MS/MS.

Za optimizaciju kromatografskih uvjeta korišten je računalni program DryLab kojim je obrađeno osamnaest početnih eksperimenata. Uz optimalne kromatografske uvjete (temperatura kromatografske kolone = 50 °C, pH-vrijednost fosfatnog pufera = 2, protok = 0,4 mL/min, gradijentno eluiranje) ukupno vrijeme trajanja kromatografske analize bilo je 27,5 min. Pri navedenim uvjetima provedene su LC-MS i LC-MS/MS analize uz razliku da je fosfatni pufer zamijenjen s otopinom mravlje kiseline jednakog pH.

Forsirana razgradnja provedena je u kiselom i lužnatom mediju, pri dvije različite pH-vrijednosti otopina HCl i NaOH, uz dodatak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i pri povišenoj temperaturi. Dasatinib je relativno stabilan u svim medijima osim u vodikovom peroksidu. LC-MS analizom određen je primarni produkt forsirane razgradnje dasatiniba u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dasatinib N-oksid, te još dva okarakterizirana razgradna produkta prisutna u vrlo niskoj koncentraciji. U lužnatom mediju (1 mol dm<sup>-3</sup> NaOH) primijećen je jedan specifičan degradacijski produkt. Svi uzorci forsirane razgradnje sadrže jedno zajedničko onečišćenje prisutno u vrlo malim koncentracijama.

Nastali razgradni produkti analizirani su tandemnom spektroskopijom masa pri različitim kolizijskim energijama, u rasponu od 10 eV do 40 eV.

Razvijena je visoko osjetljiva, učinkovita i robusna UHPLC-MS metoda za odvajanje farmaceutski aktivne tvari dasatiniba od njegovih razgradnih produkata i onečišćenja. Također su pretpostavljene strukture razgradnih produkata.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

Oznaka	Naziv
$\alpha$	faktor odjeljivanja
ACN	acetonitril
API	aktivna farmaceutska tvar
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku
APPI	ionizacija fotonima pri atmosferskom tlaku
CML	kronična mijelocitna leukemija
DAD	detektor s nizom dioda
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
FAB	bomardiranje brzim atomima
FDA	agencija za hranu i lijekove
HCl	kloridna kiselina
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPLC-MS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta uz masenu spektrometriju
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	fosforna kiselina
ICH	Internacionalno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu
$k$	faktor zadržavanja
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogen-fosfat
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija uz tandemnu masenu spektrometriju
LSIMS	ionizacija sekundarnim desorbiranim ionima
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
$N$	broj teorijskih tavana
NaOH	natrijev hidroksid
$R_s$	razlučivanje
SIMS	ionizacija bomardiranjem iona
TOF	analizator koji mjeri vrijeme leta
TSP	toplinske ionizacije raspršenjem
$t_g$	Vrijeme gradijentnog eluiranja
$T_g$	Temperatura kromatografske kolone
$t_R$	vrijeme zadržavanja
UHPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
$w$	širina osnovice kromatografske krivulje

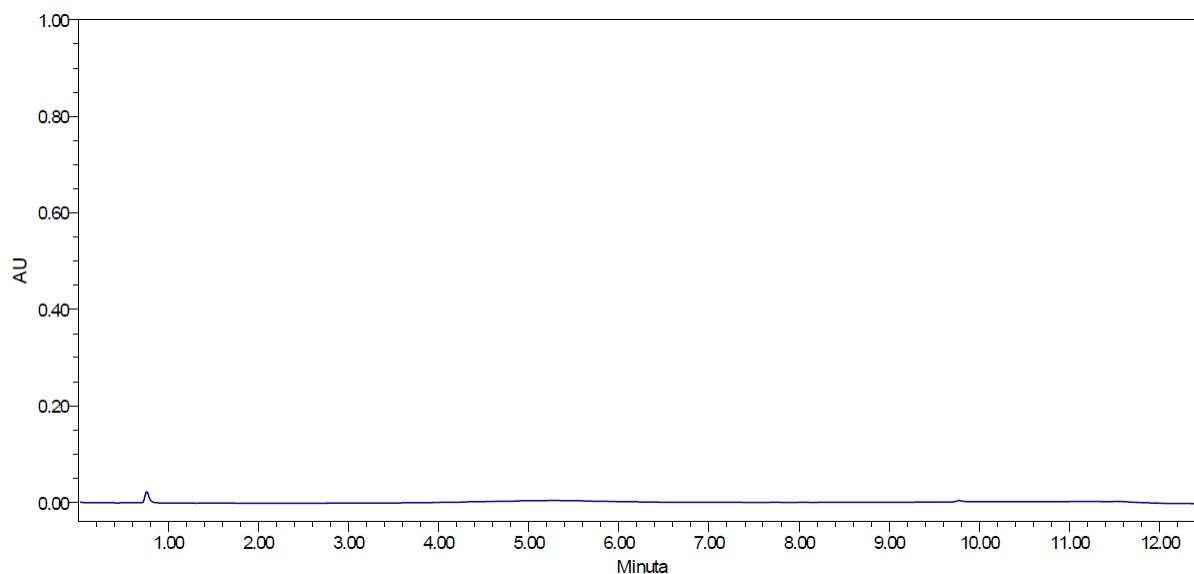
## § 7. LITERATURNI IZVORI

- 1 Blessy, M.; Patel, R. D.; Prajapati, P. N.; Agrawal, Y. K. *J. Pharm. Anal.* **4** (2014) 159–165.
- 2 Ich. *Fed. Regist.* **62** (1996) 27115–27122.
- 3 Services, H. Izd. November, (2010).
- 4 Chen, R.; Chen, B. *Drug Des. Devel. Ther.* **9** (2015) 773–779.
- 5 Foa, R.; Vitale, A.; Vignetti, M.; Meloni, G.; Guarini, A.; Propris, M. S. De; Elia, L.; Paoloni, F.; Fazi, P.; Cimino, G.; Nobile, F.; Ferrara, F.; Castagnola, C.; Sica, S.; Leoni, P.; Zuffa, E.; Fozza, C.; Luppi, M.; Candoni, A.; Iacobucci, I. *Blood* **118** (2011) 6521–6528.
- 6 R., C.; B., C. *Drug Des. Devel. Ther.* **9** (2015) 773–779.
- 7 Tefferi, A. *Hematology* (2006) 240–245.
- 8 Jabbour, E.; Cortes, J. E.; Giles, F. J.; O'Brien, S.; Kantarjian, H. M. *Cancer* **109** (2007) 2171–2181.
- 9 Kimura, S.; Ashihara, E.; Maekawa, T. (2010) 371–379.
- 10 Ramachandra, Bandi, et al. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* **4** (2014) 61–68.
- 11 Reddy.Dodda, T. N.; Reddy, R. N.; Reddy.Regalla, M. *Indo Am. J. Pharm. Res.* **3** (2013)
- 12 Skoog, D. A. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th izd.; CENGAGE Learning, (2013).
- 13 Bhardwaj, S. K.; Dwivedi, K.; Agarwal, D. D. *Int. J. Anal. Bioanal. Chem.* **5** (2015) 76–81.
- 14 Snyder, L. R.; Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*; (1979).
- 15 Han, S. Y.; Liang, C.; Zou, K.; Qiao, J. Q.; Lian, H. Z.; Ge, X. *Talanta* **101** (2012) 64–70.
- 16 Herbert, C. G.; Johnstone, R. a. W. *Mass Spectrometry Basics*; CRC Press, (2003).
- 17 Roskey, M. T.; Juhasz, P.; Smirnov, I. P.; Takach, E. J.; Martin, S. A.; Haff, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996) 4724–4729.
- 18 Patel, K. N.; Patel, J. K.; Patel, M. P.; Rajput, G. C.; Patel, H. A. *Pharm. Methods* **1** (2010) 2–13.

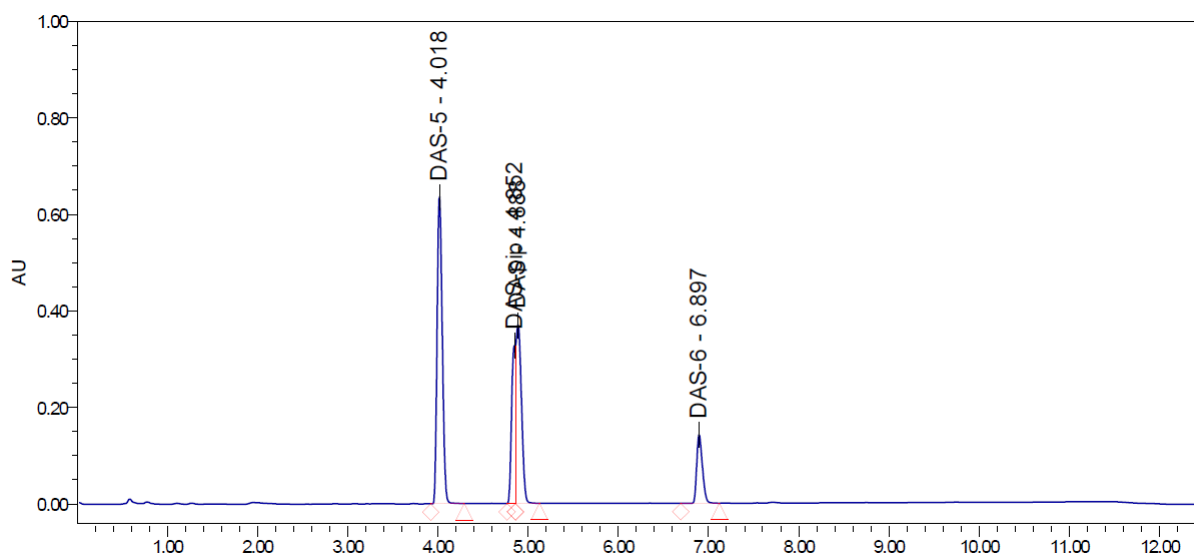
- 19 Macha, S. F.; Limbach, P. a. *Solid State Mater. Sci.* **6** (2002) 213–220.
- 20 Kawashima, T.; Kurosawa, T.; Aoyagi, S.; Sheraz, S.; Fletcher, J. S.; Futigami, M.; Lockyer, N. P.; Vickerman, J. C. *Surf. Interface Anal.* **46** (2014) 92–95.
- 21 Banerjee, S.; Mazumdar, S. *Int. J. Anal. Chem.* **2012** (2012) 1–40.
- 22 El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. *Appl. Spectrosc. Rev.* **44** (2009) 210–230.
- 23 Gone, S.; While, S. (2012) 487–500.
- 24 Hernández, F.; Ibáñez, M.; Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V. *J. Sep. Sci.* **34** (2011) 3517–3526.
- 25 Glish, G. L.; Vachet, R. W. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2** (2003) 140–150.
- 26 Nikolaev, E. N.; Kostyukevich, Y. I.; Vladimirov, G. N. *Mass Spectrom. Rev.* **35** (2016) 219–258.
- 27 ICH. ICH Guideline Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf).
- 28 ICH. Q6(A) Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf).
- 29 ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf).
- 30 Krisko, R. M.; McLaughlin, K.; Koenigbauer, M. J.; Lunte, C. E. *J. Chromatogr. A* **1122** (2006) 186–193.
- 31 Terzic, J.; Popovic, I.; Jancic-Stojanovic, B. *Arh. Farm. (Belgr).* **64** (2014) 205–219.
- 32 Tyteca, E.; Veuthey, J.-L.; Desmet, G.; Guillarme, D.; Fekete, S. *Analyst* **141** (2016) 5488–5501.
- 33 Sharma, M. K.; Murugesan, M. *J. Chromatogr.* **8** (2017) 8–10.
- 34 Li, X.; He, Y.; Ruiz, C. H.; Koenig, M.; Cameron, M. D. *Drug Metab. Dispos.* **37** (2009) 1242–1250.

## § 8. DODATAK

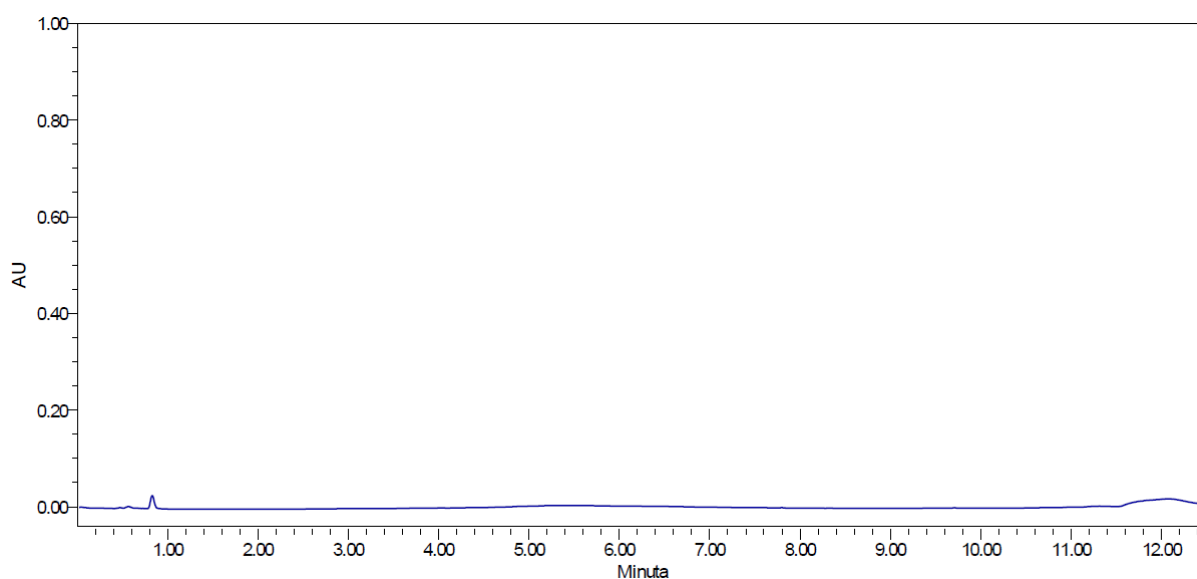
### 8.1. Kromatogrami smjesa dasatiniba i poznatih onečišćenja na različitim kolonama



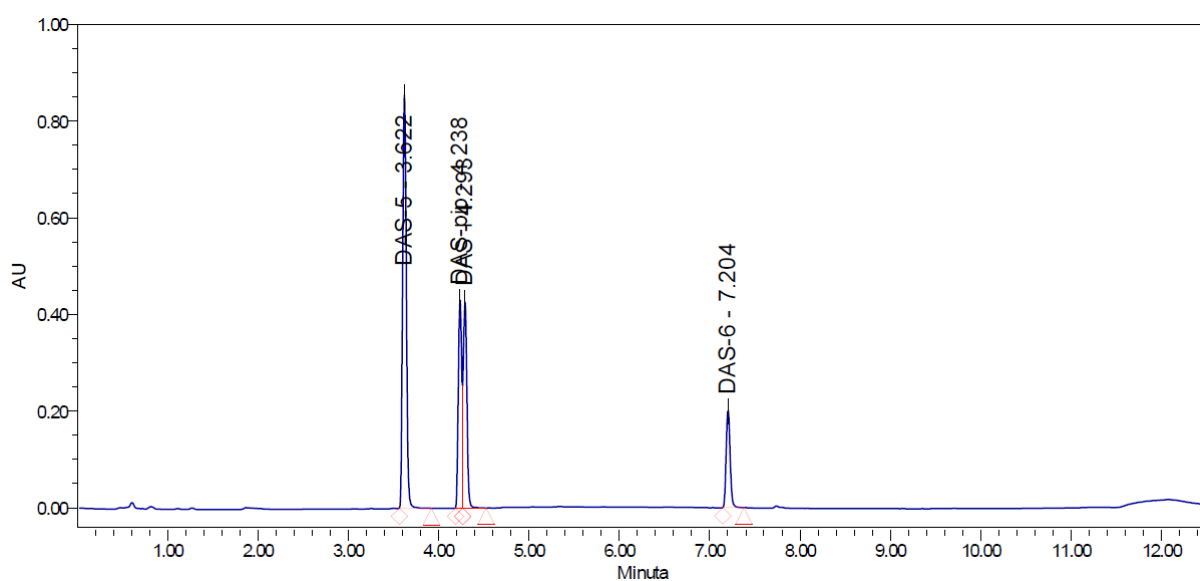
Slika D1. Kromatogram slijepe probe analizirane na koloni *Acquity BEH C18 1,7 $\mu$ m; 2,1 mm  $\times$  100 mm*



Slika D2. Kromatogram otopine dasatiniba i tri poznata onečišćenja analizirane na koloni *Acquity BEH C18 1,7 $\mu$ m; 2,1 mm  $\times$  100 mm*

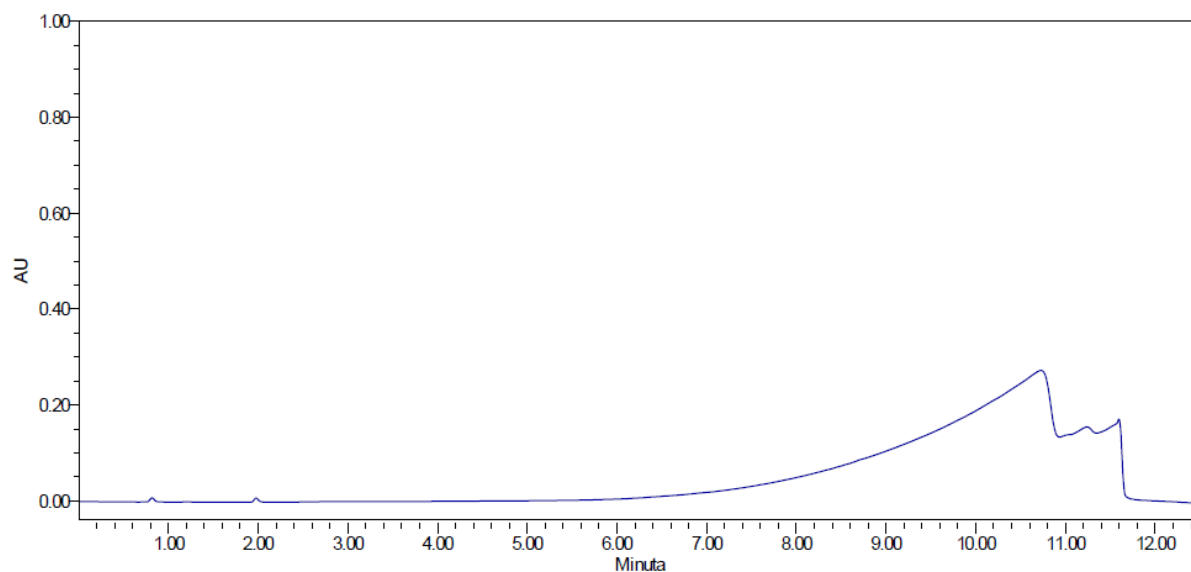


Slika D3. Kromatogram slijepe probe analizirane na koloni *Acquity UPLC CSH C18 1,7 $\mu$ m; 2,1 mm  $\times$  100 mm*

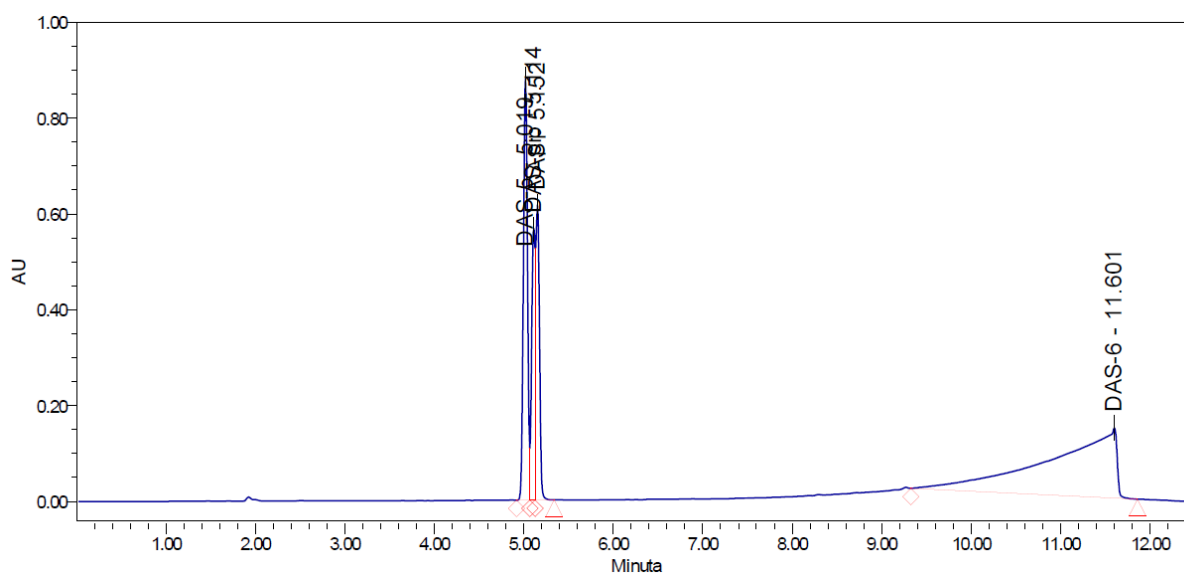


Slika D4. Kromatogram otopine dasatiniba i tri poznata onečišćenja analizirane na koloni *Acquity UPLC CSH C18 1,7 $\mu$ m; 2,1 mm  $\times$  100 mm*

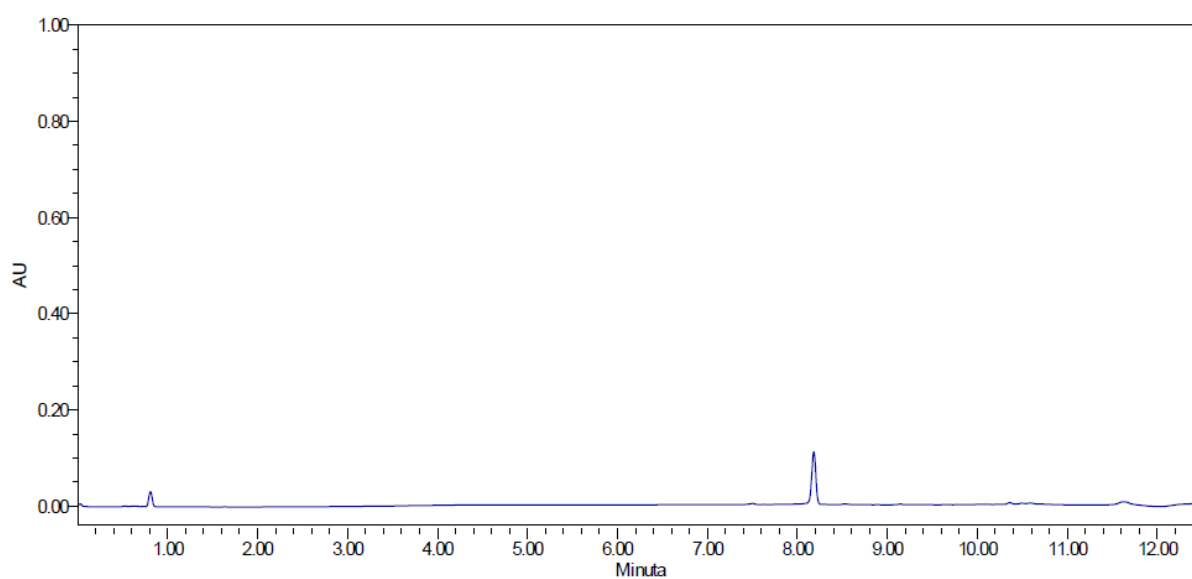




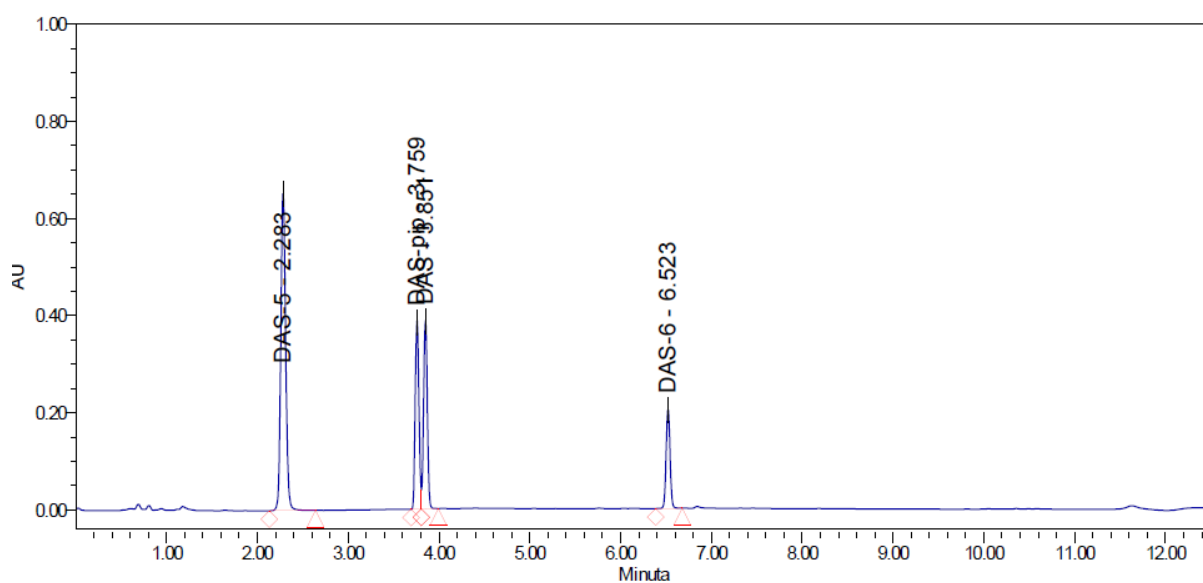
Slika D5. Kromatogram slijepe probe analizirane na koloni *Waters Symmetry Shield RP18 3,5 μm; 4,6 mm × 150 mm*



Slika D6. Kromatogram otopine dasatiniba i tri poznata onečišćenja analizirane na koloni *Waters Symmetry Shield RP18 3,5 μm; 4,6 mm × 150 mm*

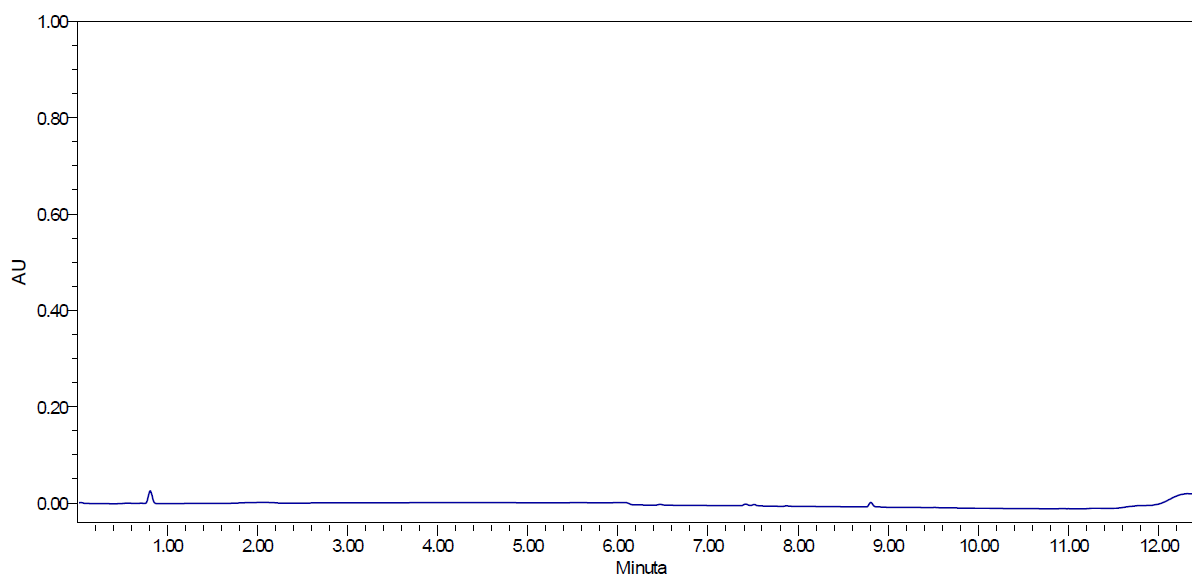


Slika D7. Kromatogram slijepe probe analizirane na koloni *Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl* 1,7 $\mu$ m; 2,1 mm  $\times$  100 mm

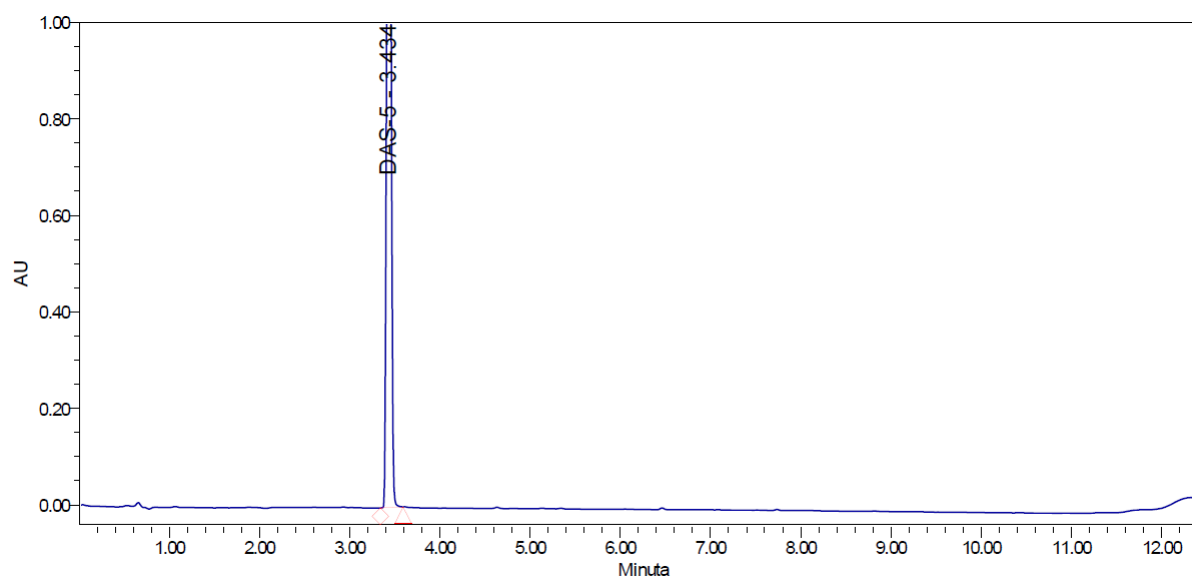


Slika D8. Kromatogram otopine dasatiniba i tri poznata onečišćenja analizirane na koloni *Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl* 1,7 $\mu$ m; 2,1 mm  $\times$  100 mm

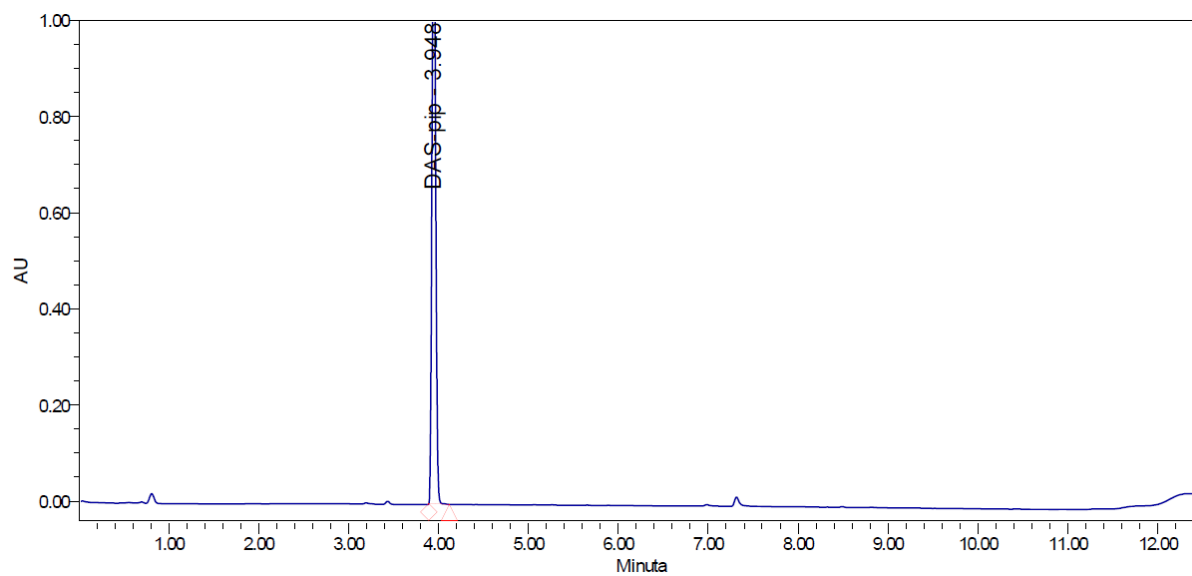
**8.2. Kromatogrami slijepe probe, dasatiniba i poznatih onečišćenja na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm* pri uvjetima: temperatura kolone = 30 °C, pH fosfatnog pufera = 2 i vremene gradijntnog eluiranja = 25 min**



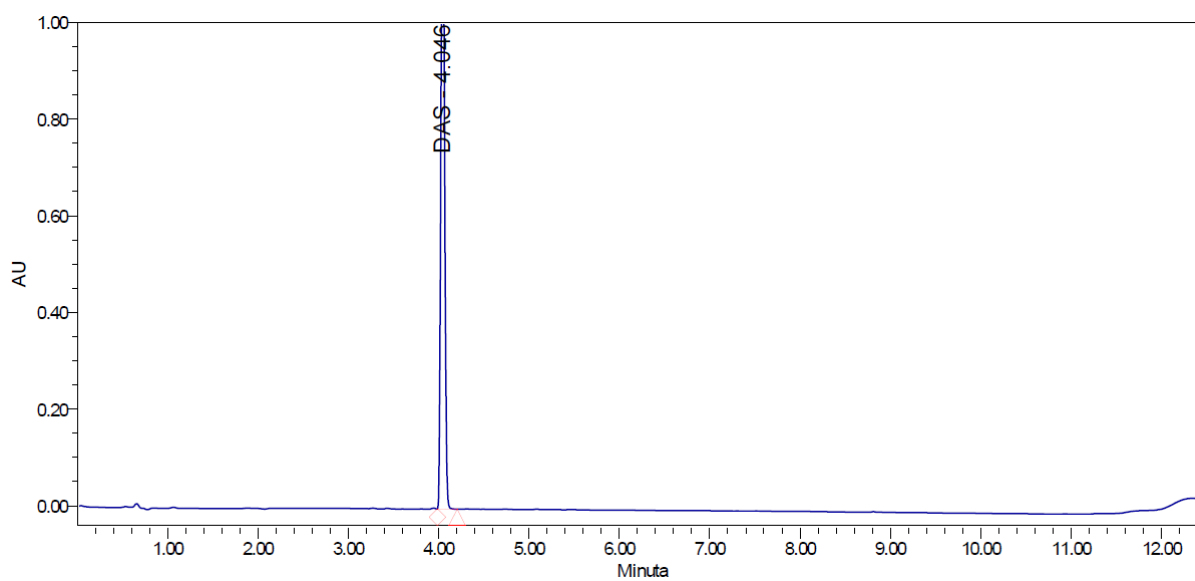
Slika D9. Kromatogram slijepe probe



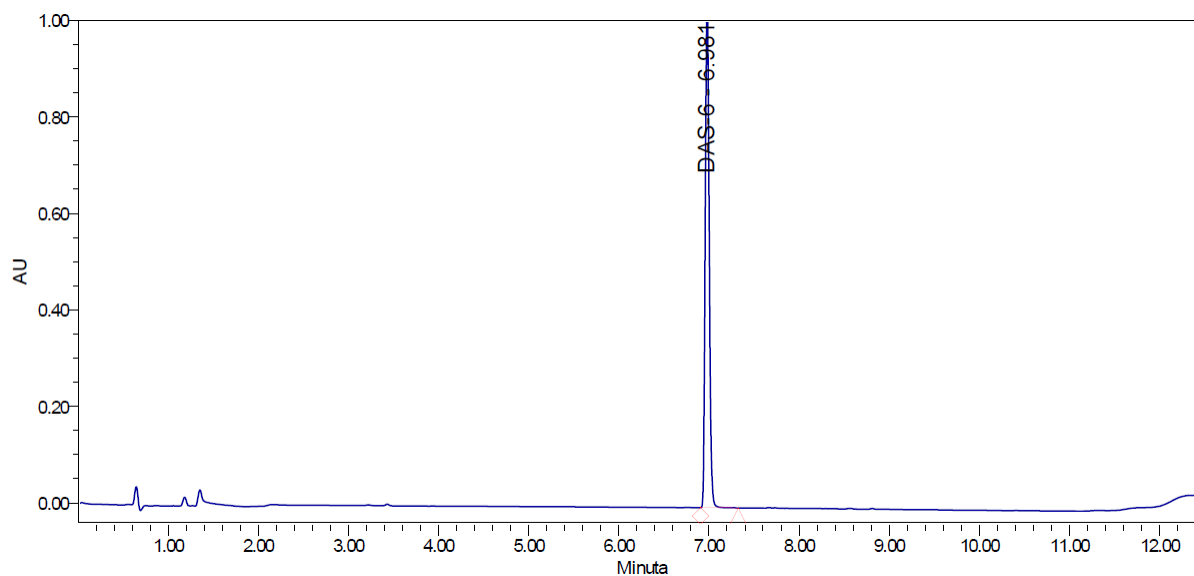
Slika D10. Kromatogram Dasatiniba 5 (DAS-5)



Slika D11. Kromatogram Dasatinib piperazin (DAS-PIP)

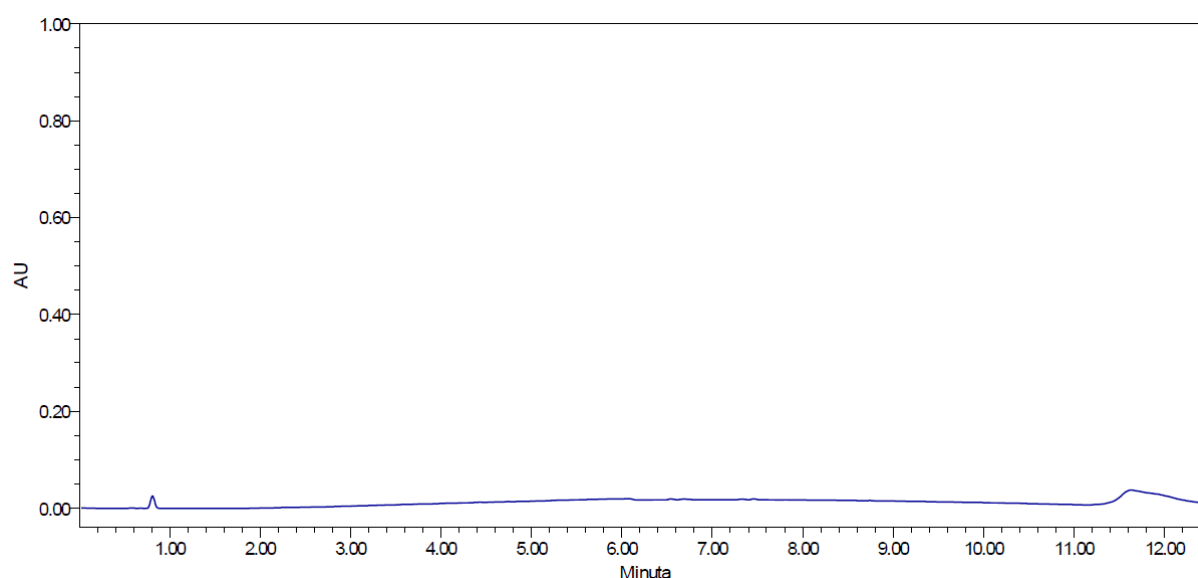


Slika D12. Kromatogram dasatiniba (DAS)

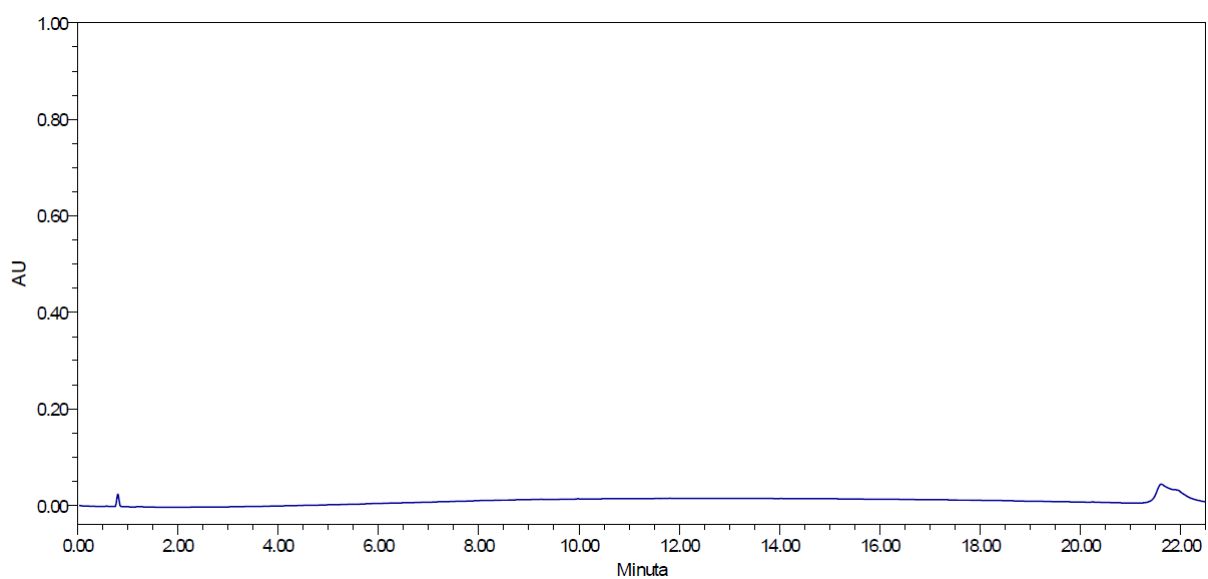


Slika D13. Kromatogram Dasatiniba 6 (DAS-6)

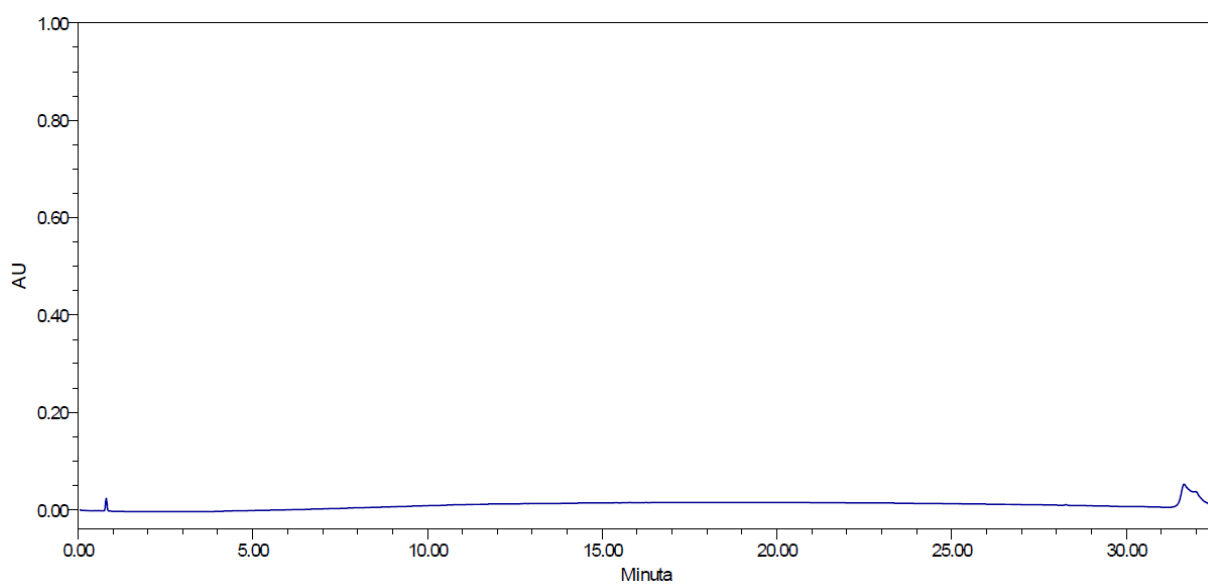
### 8.3. Kromatogrami slijepih proba i otopine dasatiniba i poznatih nečistoća u ovisnosti o pH-vrijednosti, temperaturi kolone (Tg) i vremenu gradijenog eluiranja (tg) na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7 μm × 2,1 mm × 100 mm*



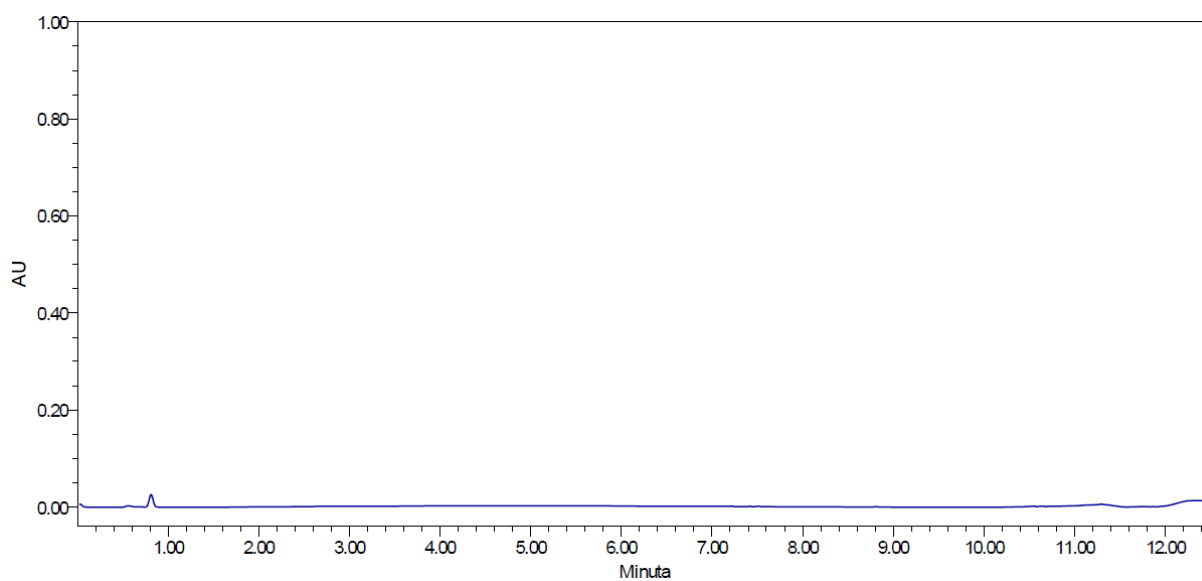
Slika D14. Kromatogram slijepa probe pri uvjetima pH 1,5, Tg 30 °C i tg 10 min



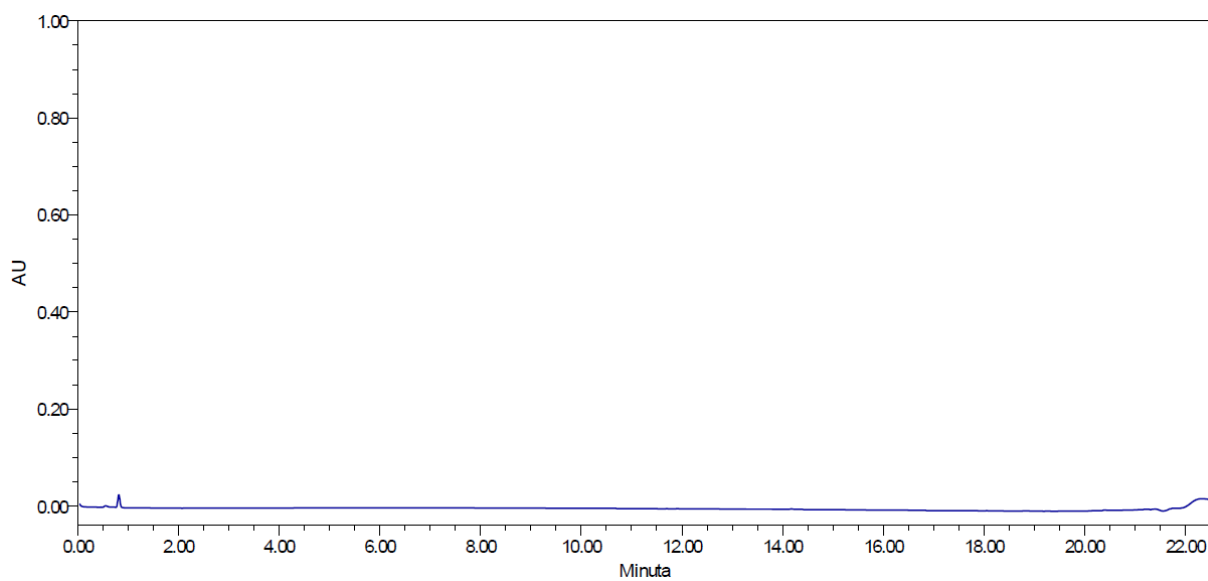
Slika D15. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 1,5, Tg 30 °C i tg 20 min



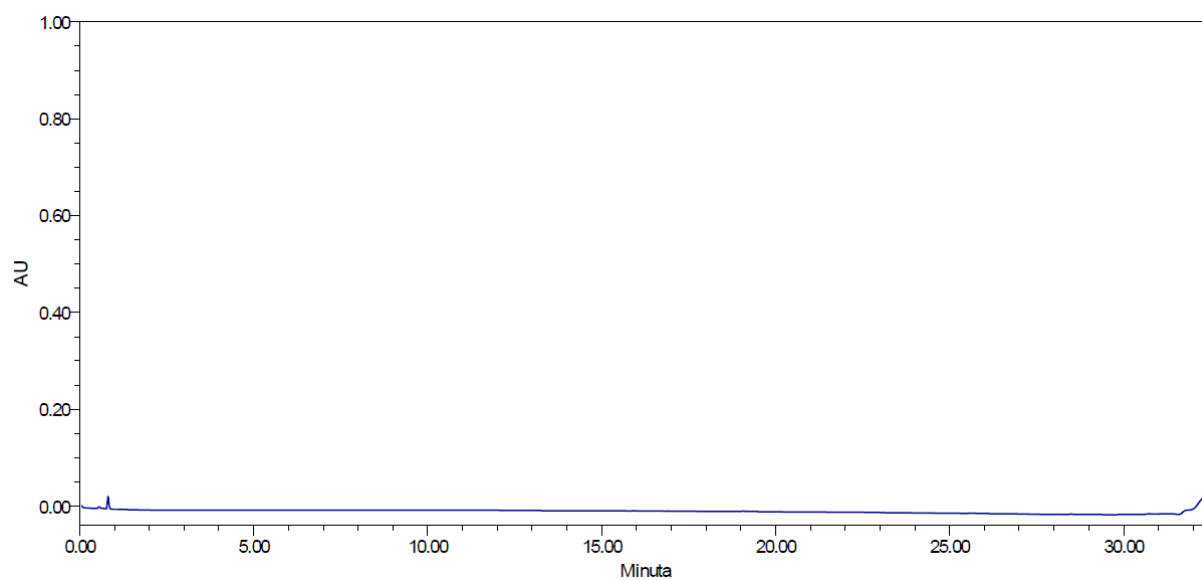
Slika D16. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 1,5, Tg 30 °C i tg 30 min



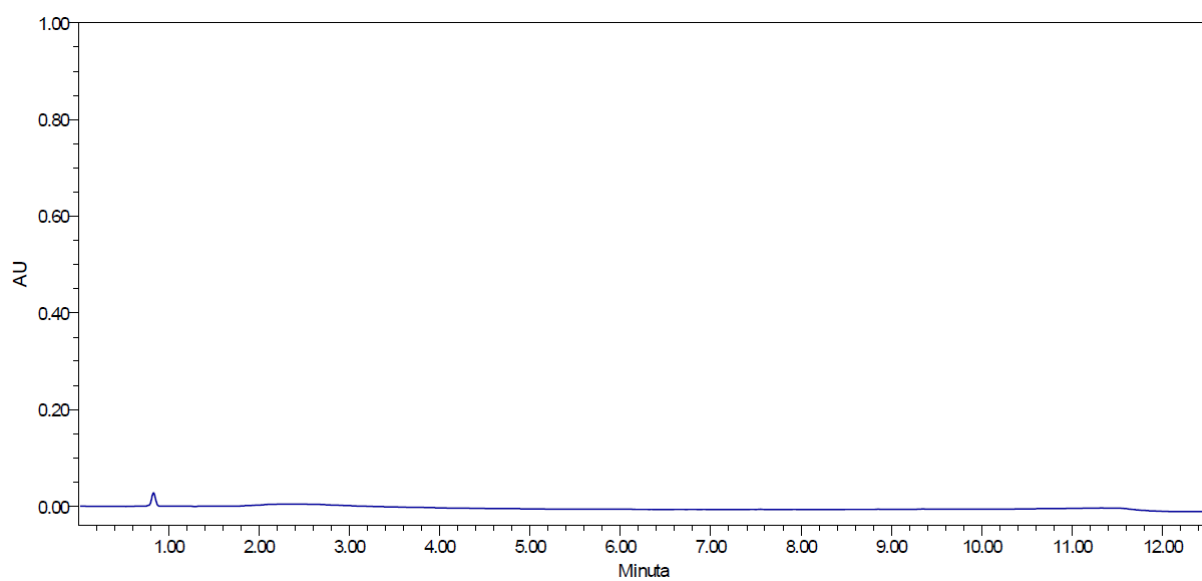
Slika D17. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 30 °C i tg 10 min



Slika D18. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 30 °C i tg 20 min

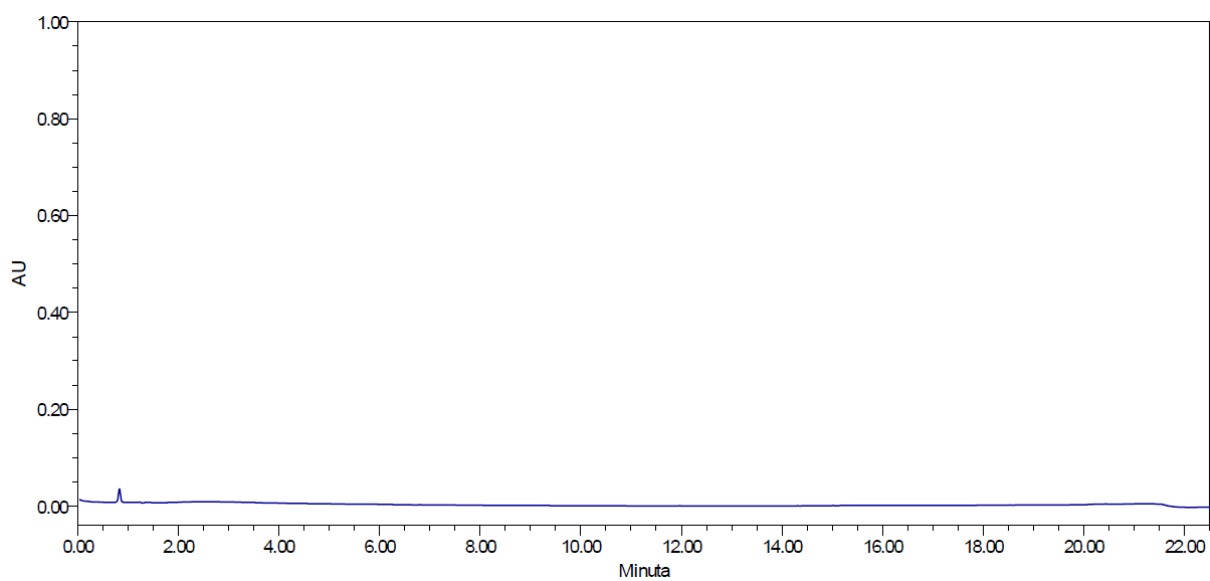


Slika D19. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 30 °C i tg 30 min

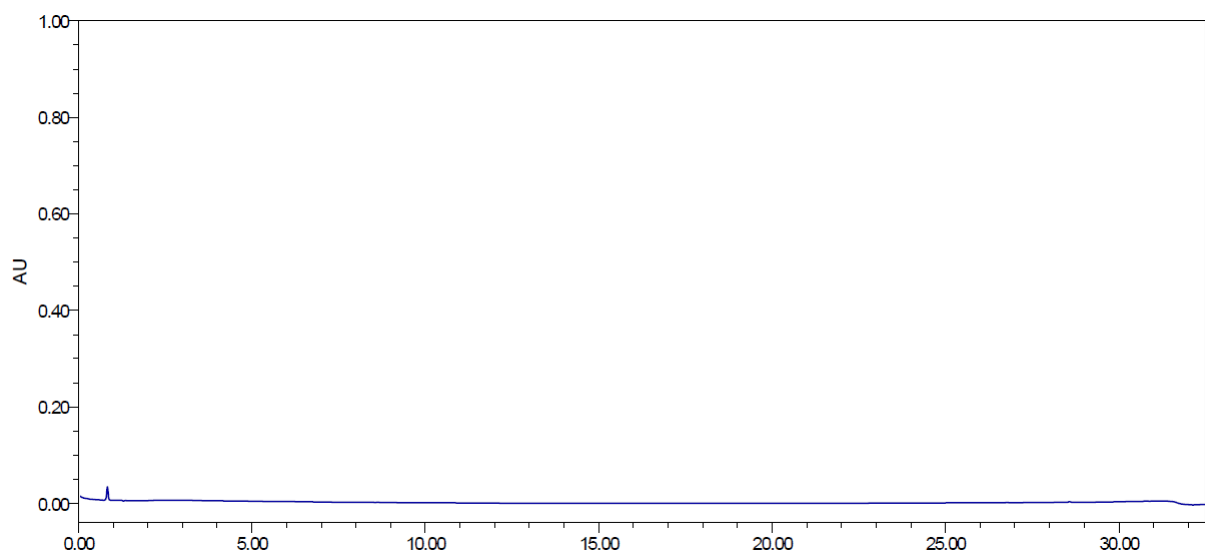


Slika D20. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 3, Tg 30 °C i tg 10 min

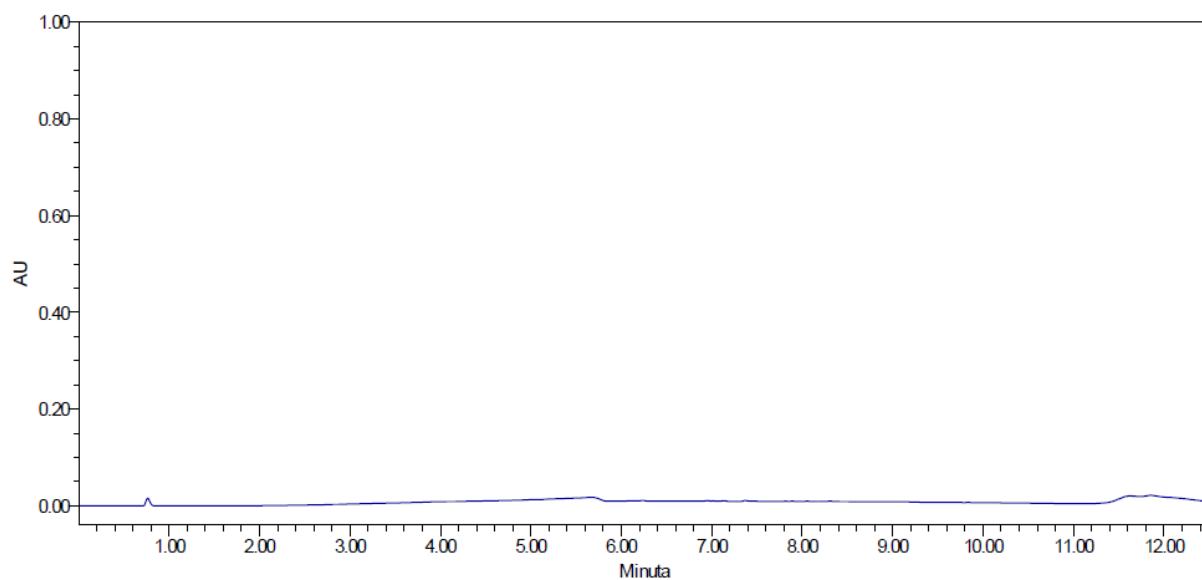




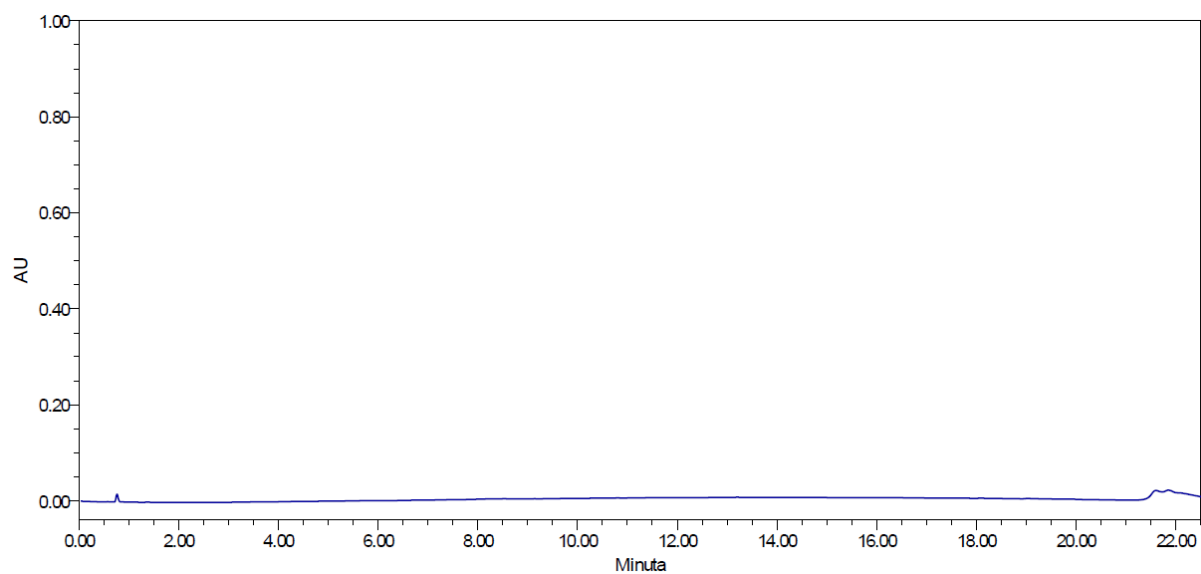
Slika D21. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 3, Tg 30 °C i tg 20 min



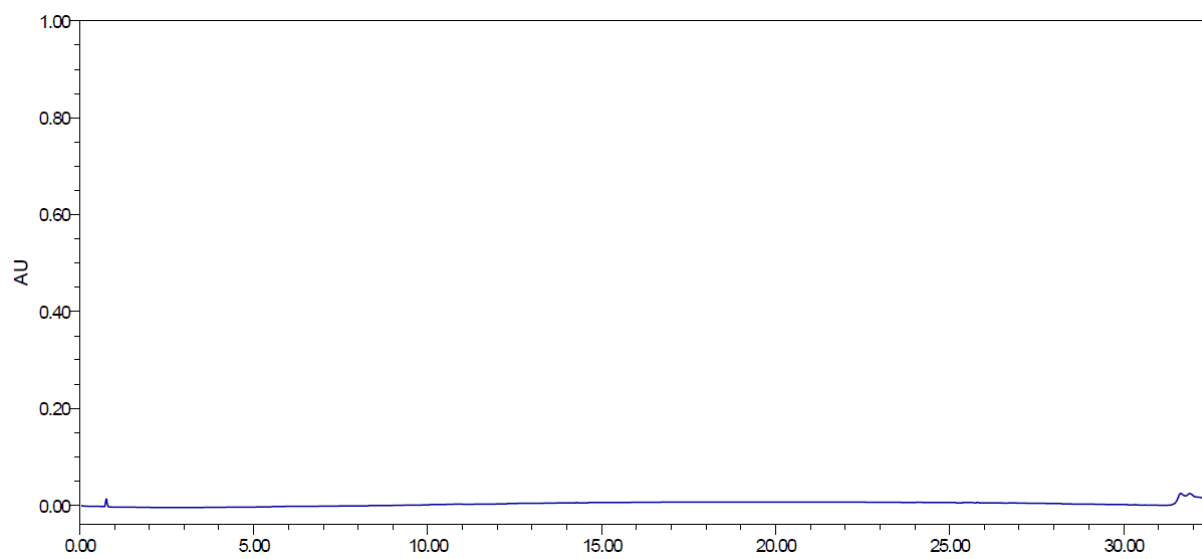
Slika D22. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 3, Tg 30 °C i tg 30 min



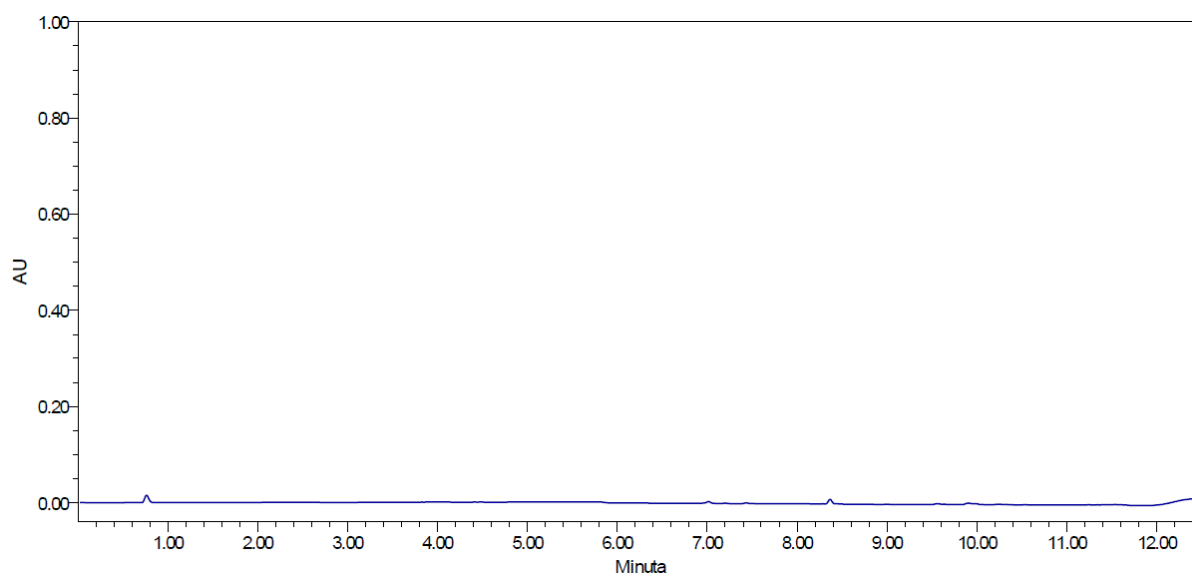
Slika D23. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 1,5, Tg 60 °C i tg 10 min



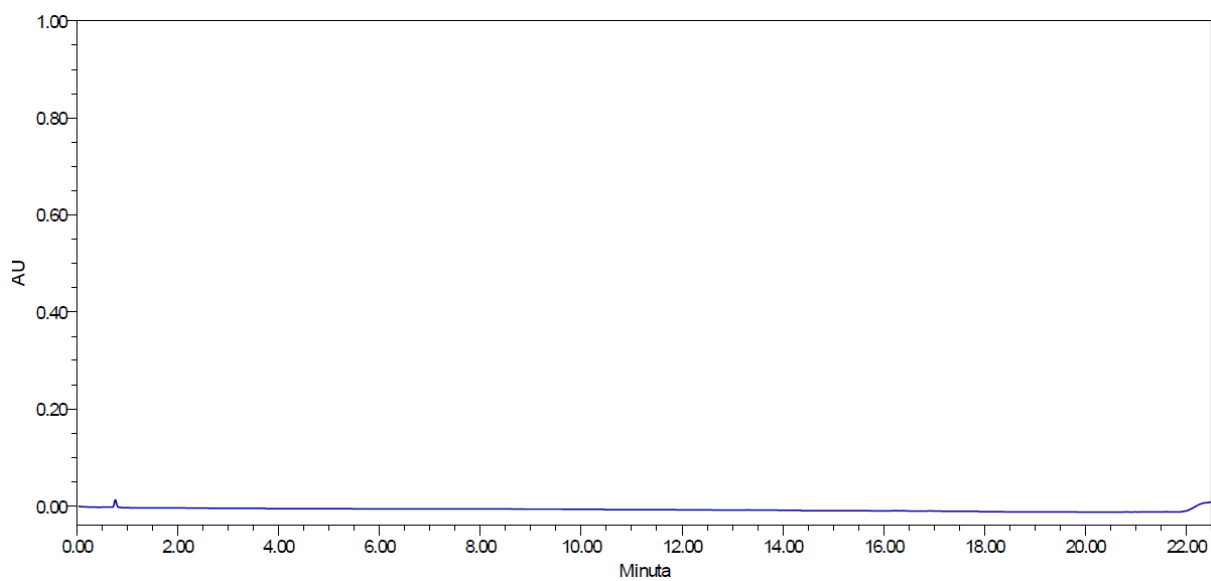
Slika D24. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 1,5, Tg 60 °C i tg 20 min



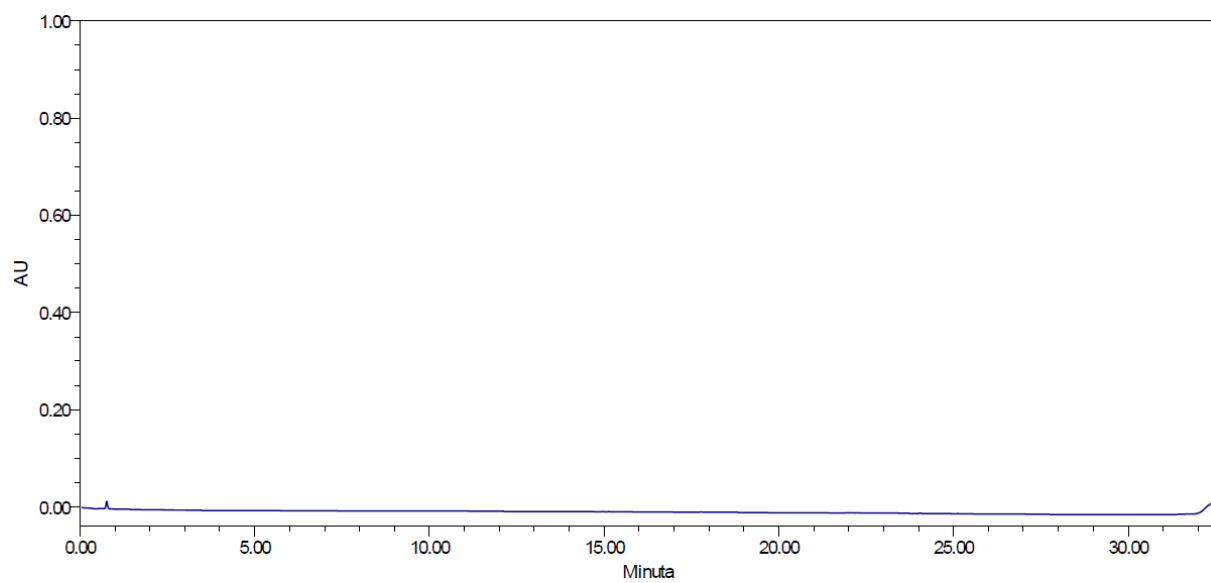
Slika D25. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 1,5, Tg 60 °C i tg 30 min



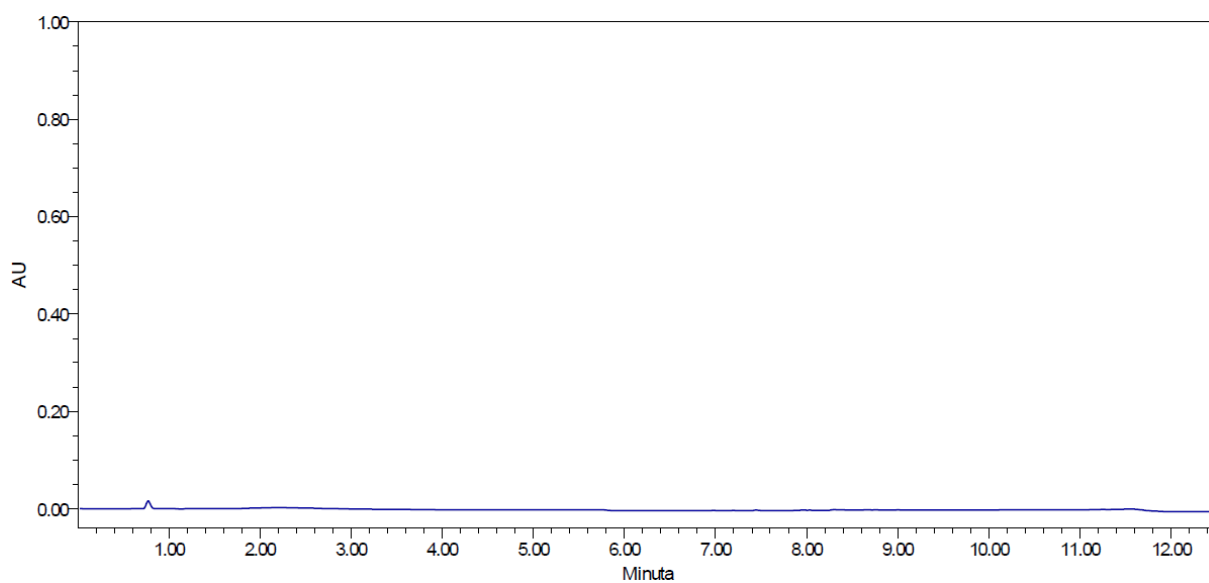
Slika D26. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 60 °C i tg 10 min



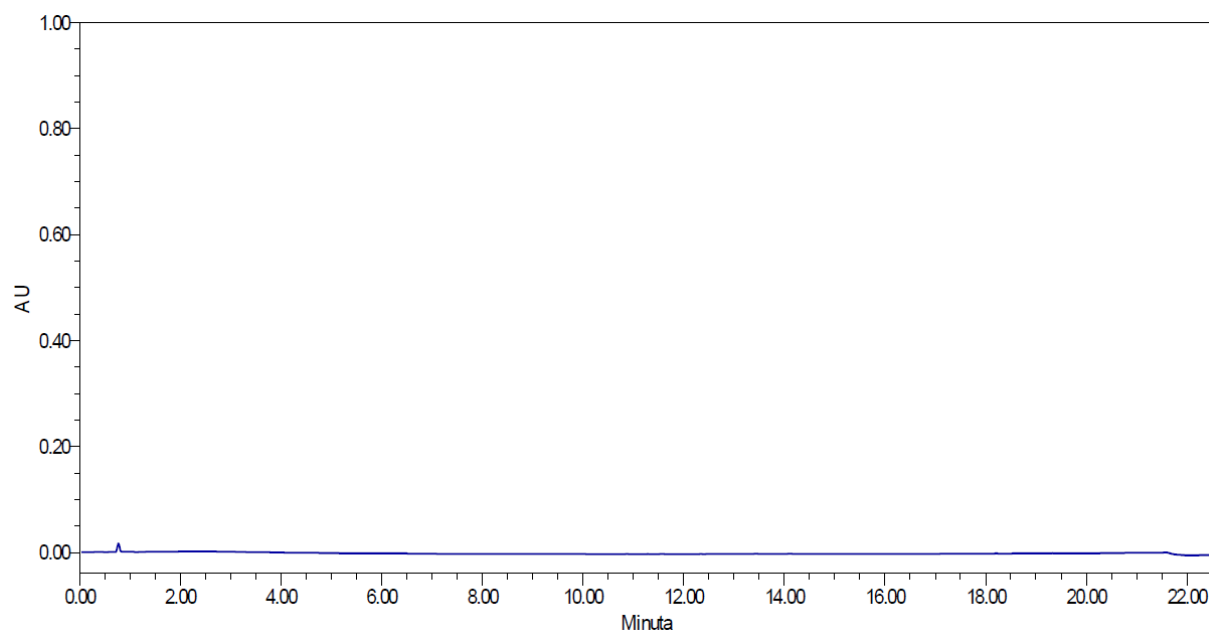
Slika D27. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 60 °C i tg 20 min



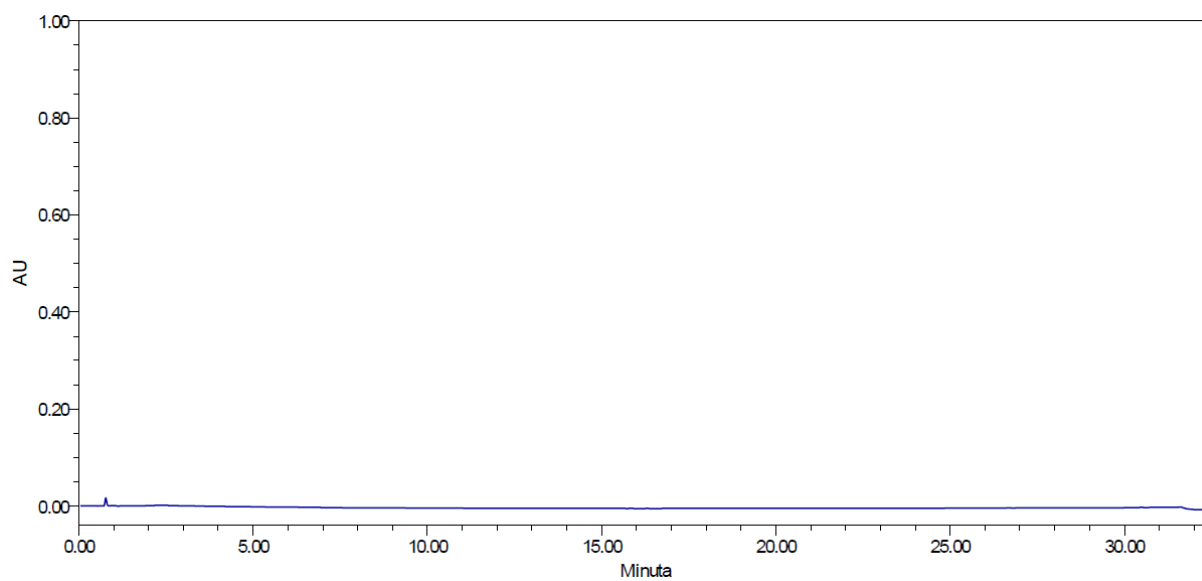
Slika D28. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 60 °C i tg 30 min



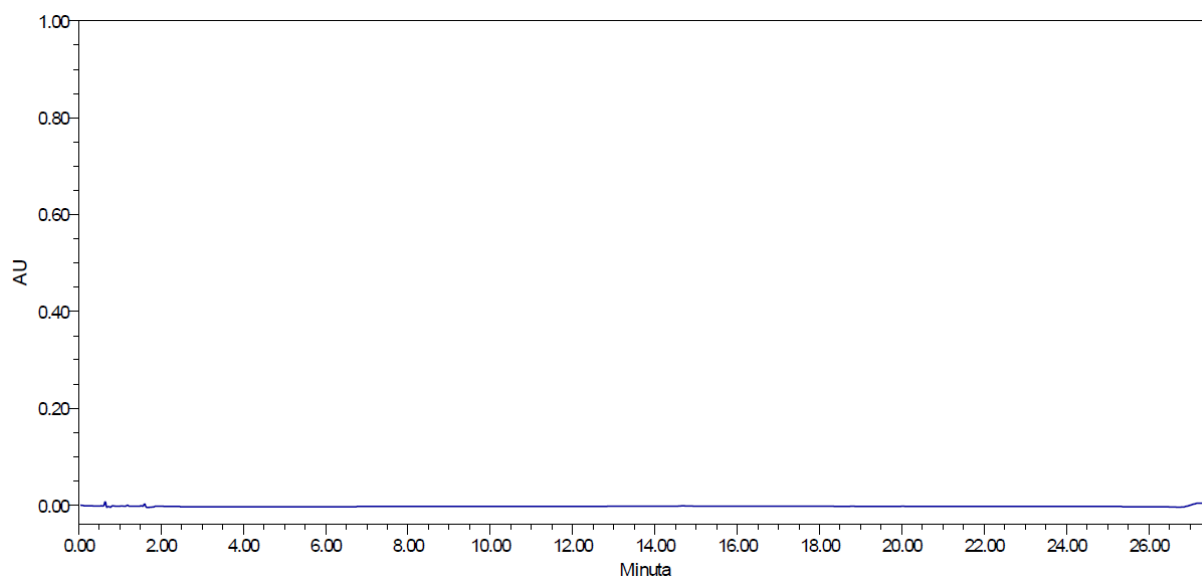
Slika D29. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 3, Tg 60 °C i tg 10 min



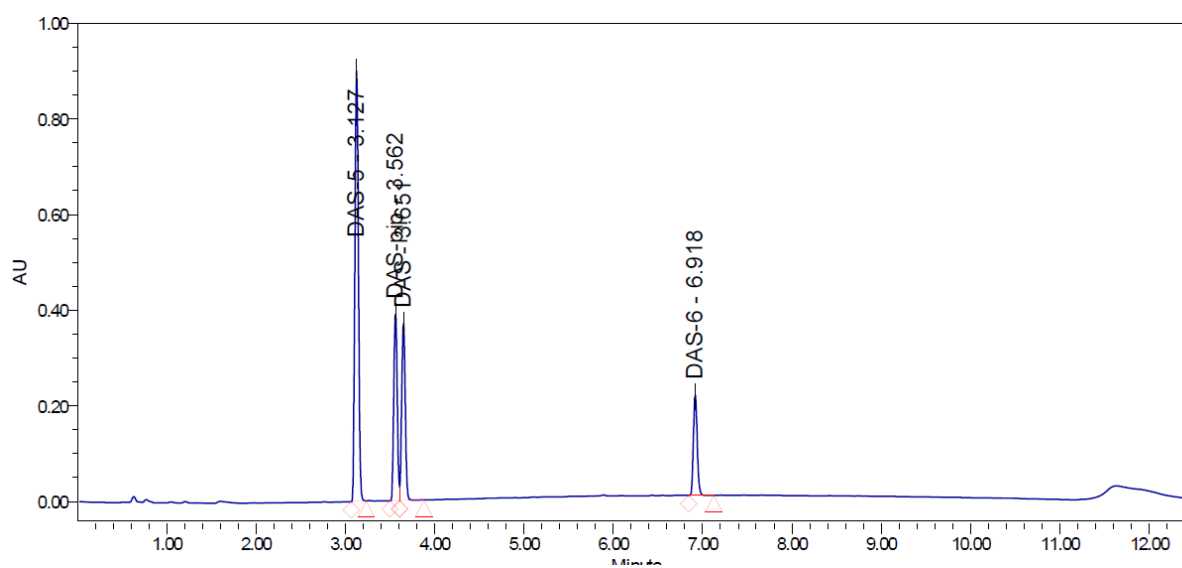
Slika D30. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 3, Tg 60 °C i tg 20 min



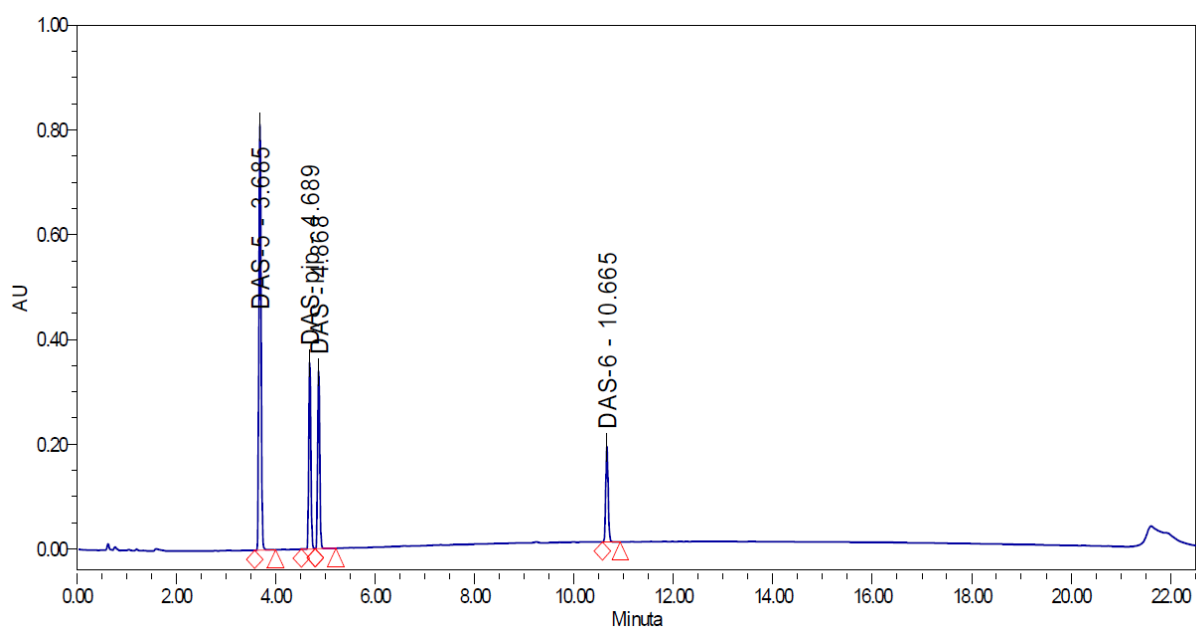
Slika D31. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 3, Tg 60 °C i tg 30 min



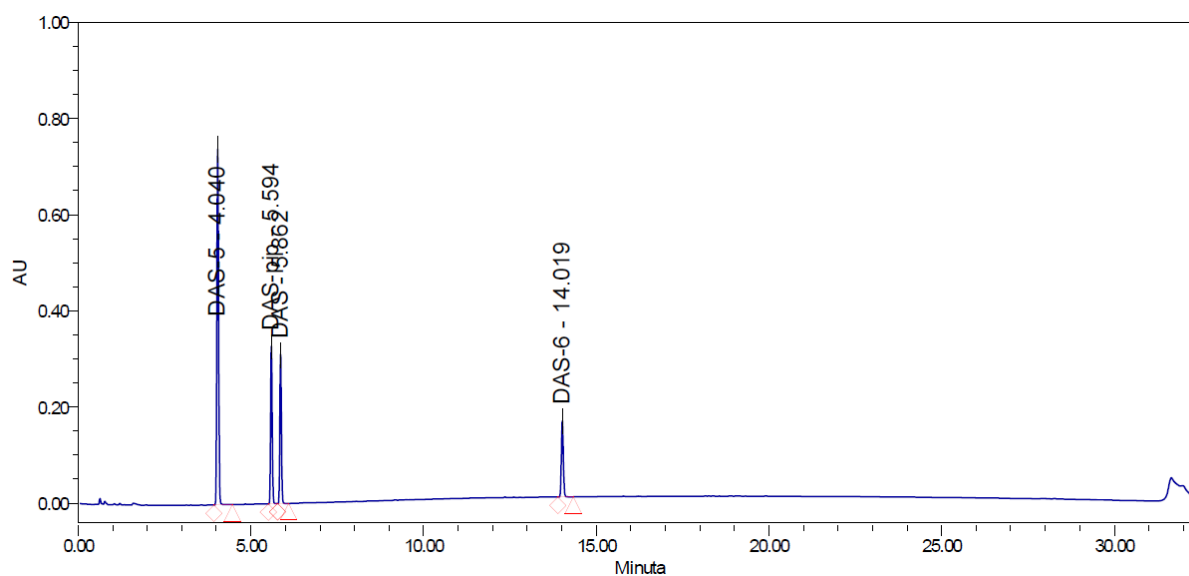
Slika D32. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 45 °C i tg 25 min



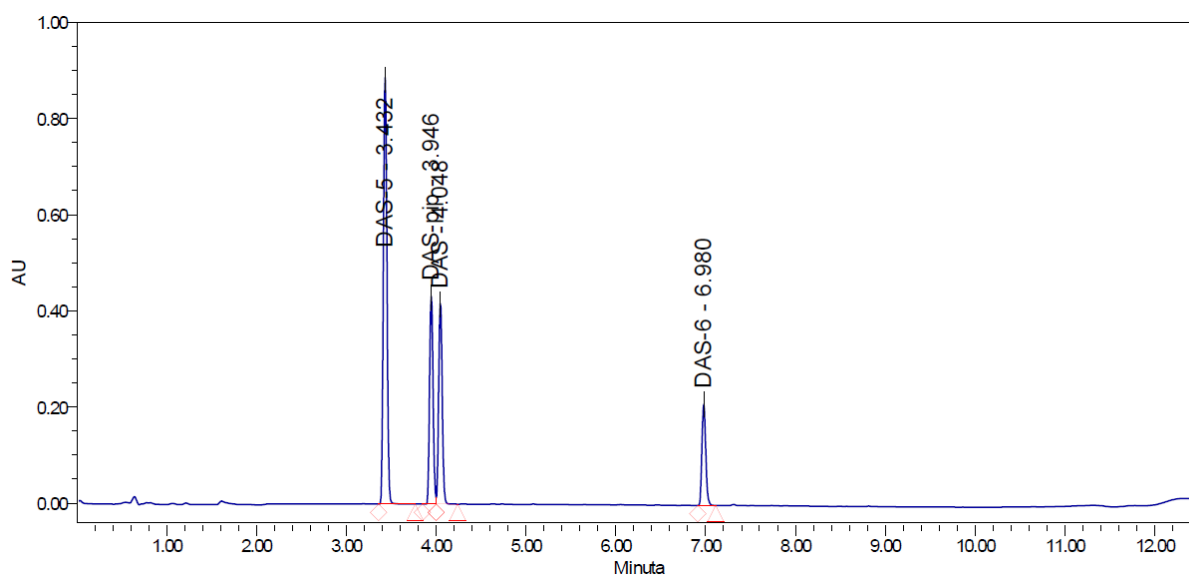
Slika D33. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 30 min i pH 1,5



Slika D34. Kromatogram dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 20 min i pH 1,5

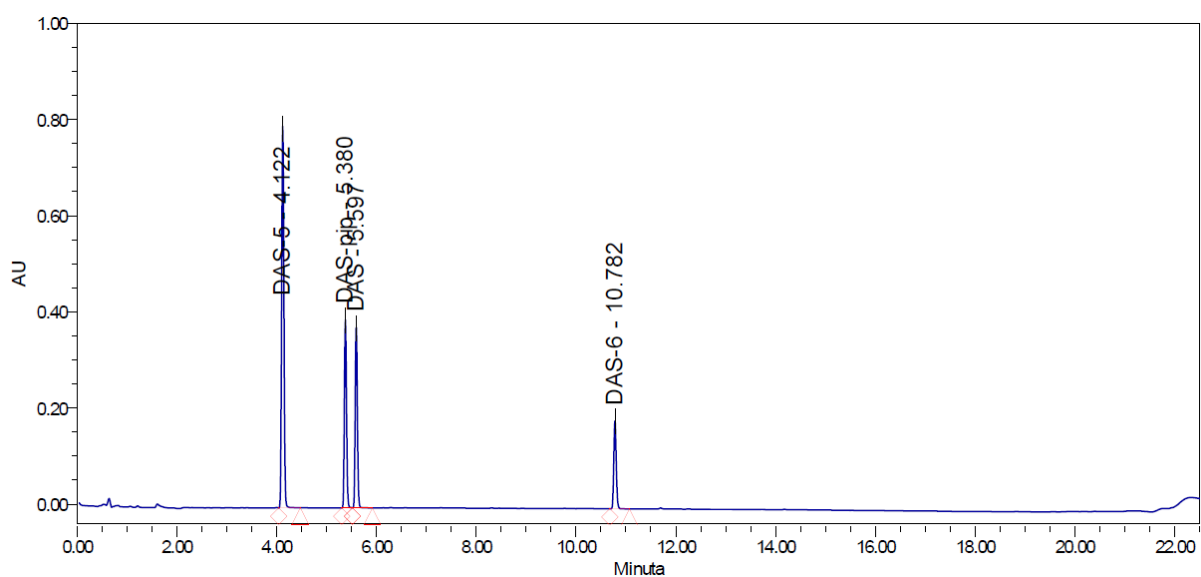


Slika D35. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 30 min i pH 1,5

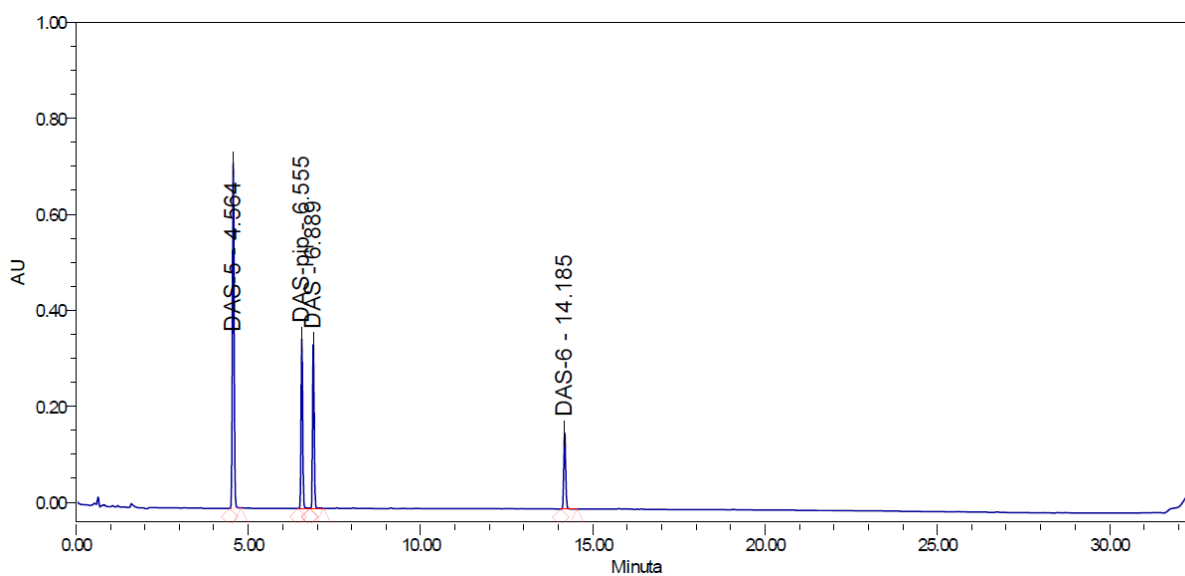


Slika D36. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 10 min i pH 2

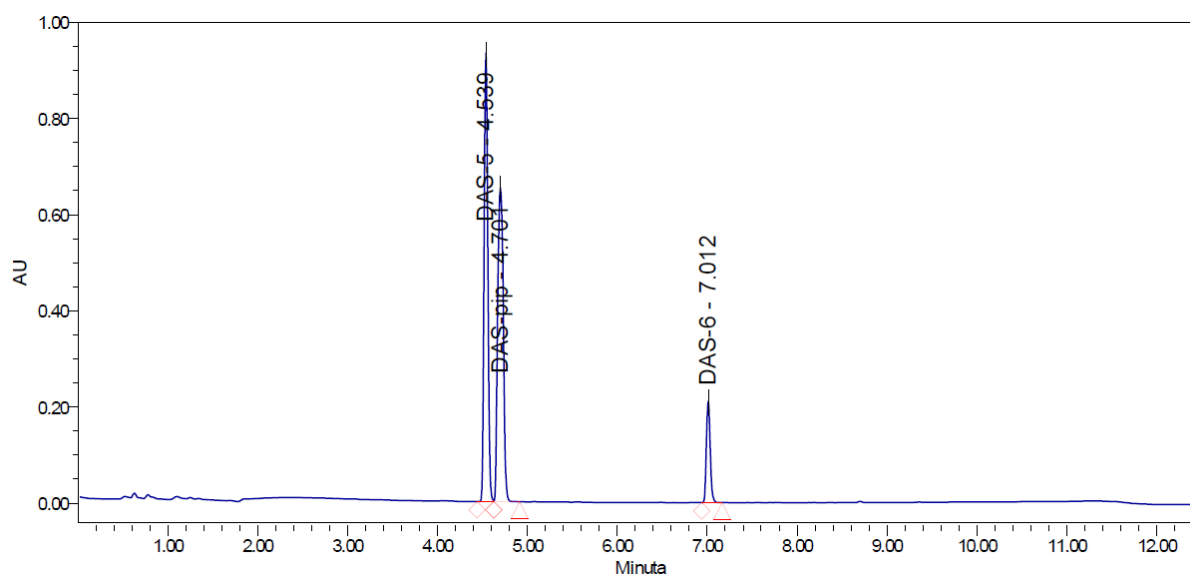




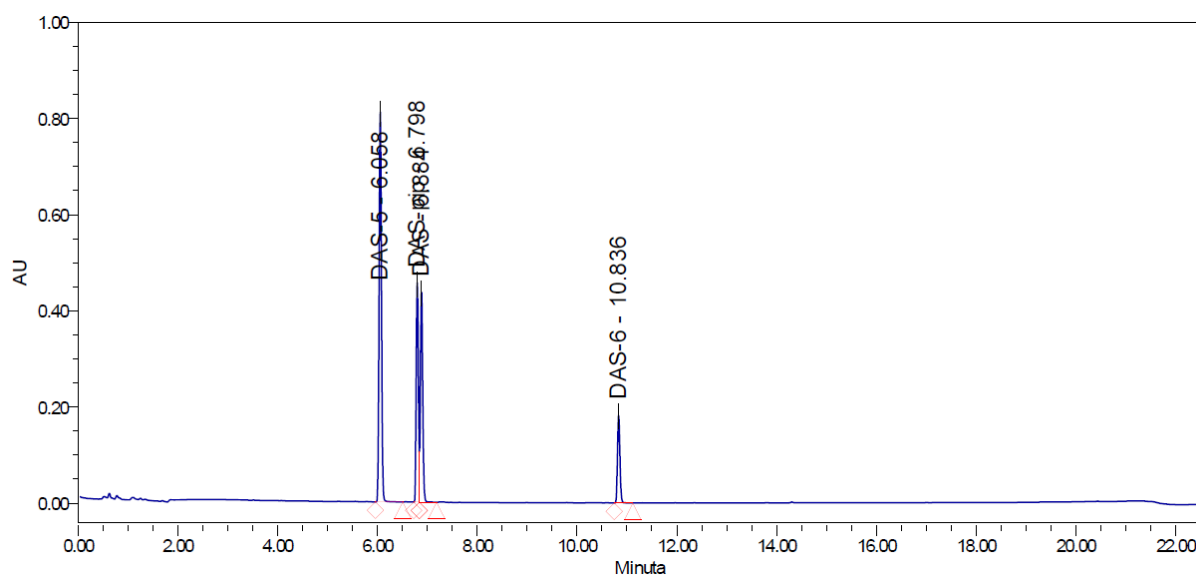
Slika D37. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 20 min i pH 2



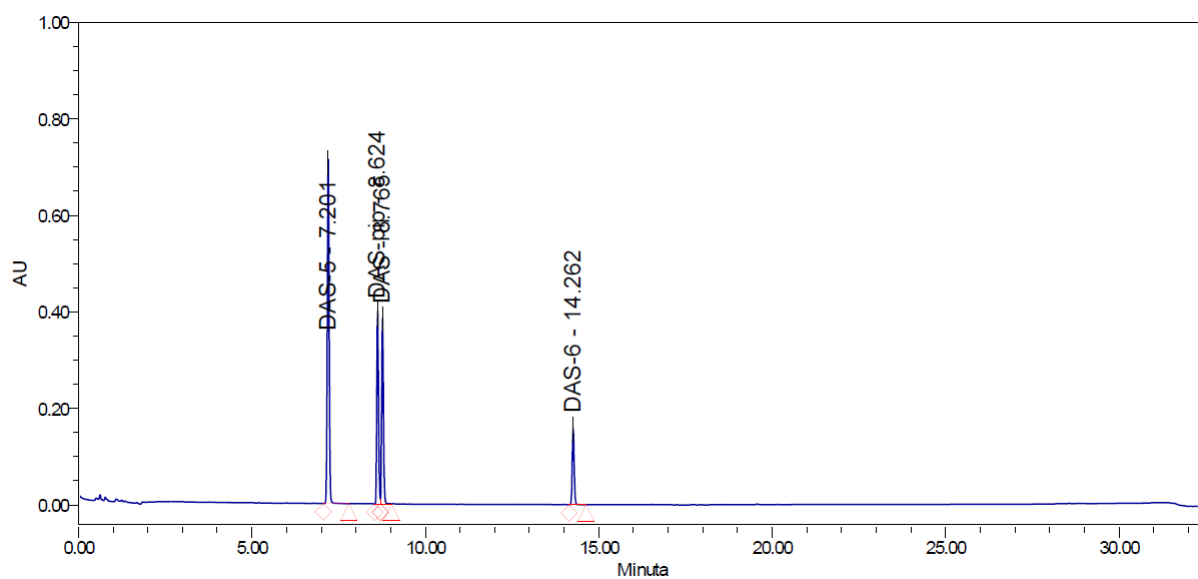
Slika D38. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 30 min i pH 2



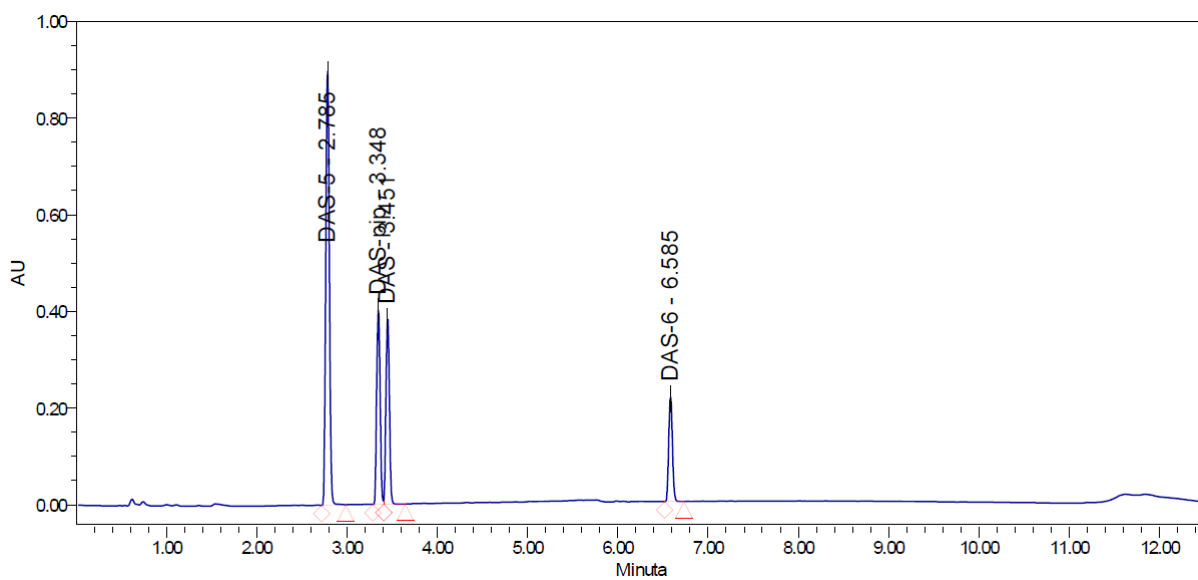
Slika D39. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 10 min i pH 3



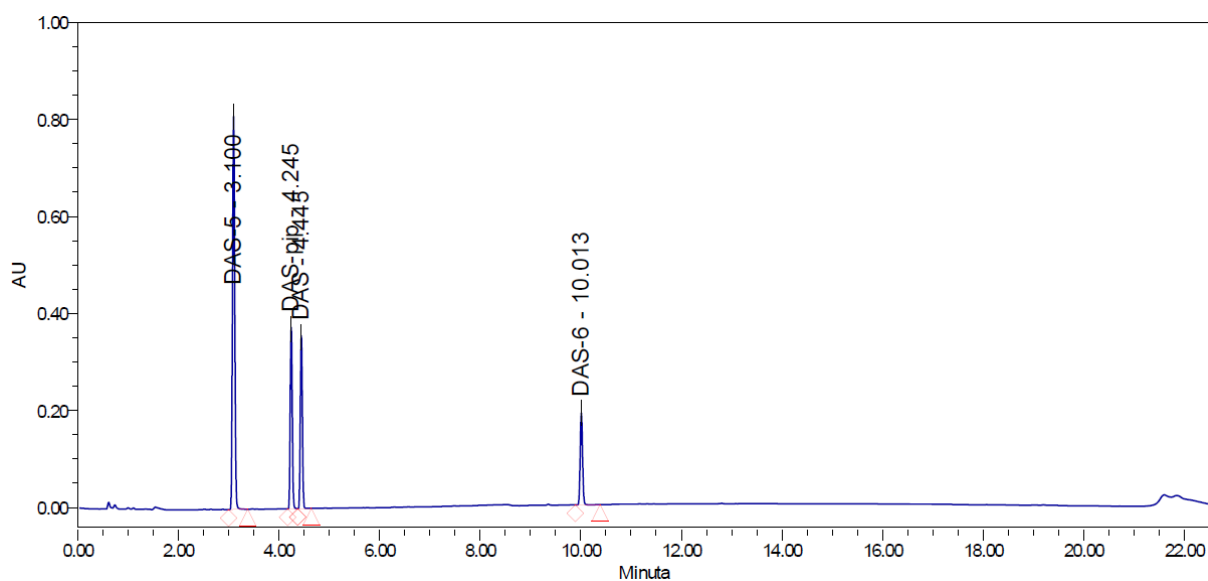
Slika D40. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 20 min i pH 3



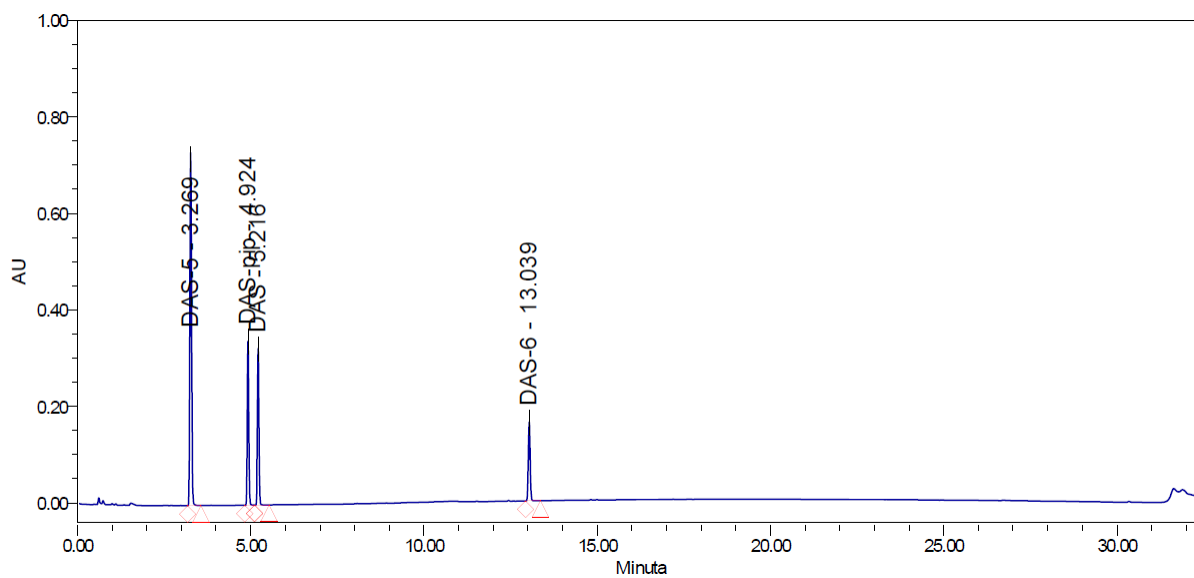
Slika D41. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 30 °C, tg 30 min i pH 3



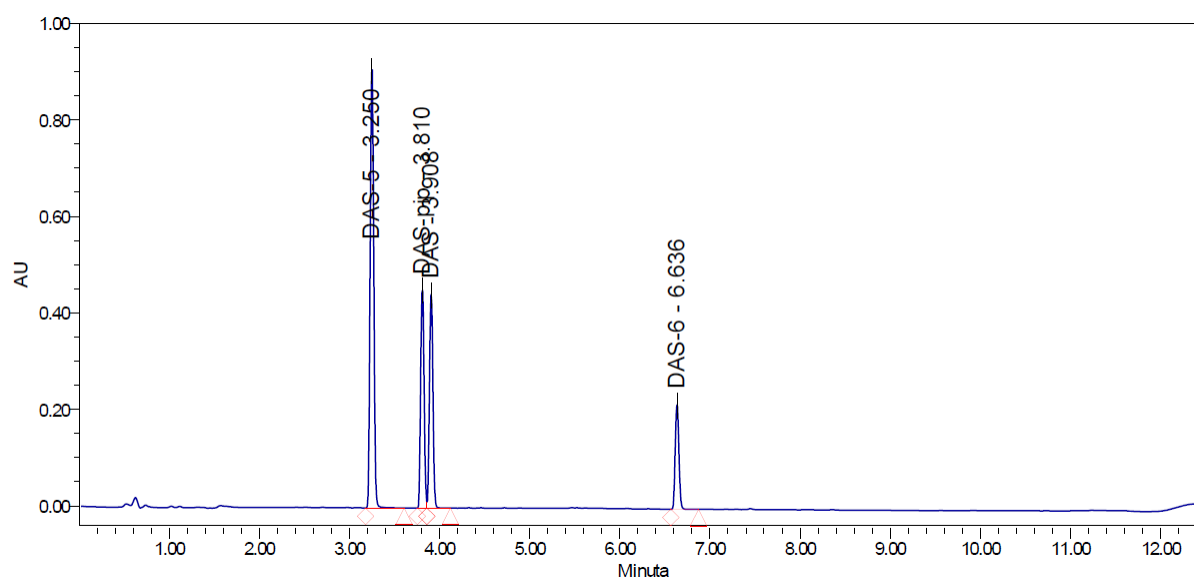
Slika D42. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 10 min i pH 1,5



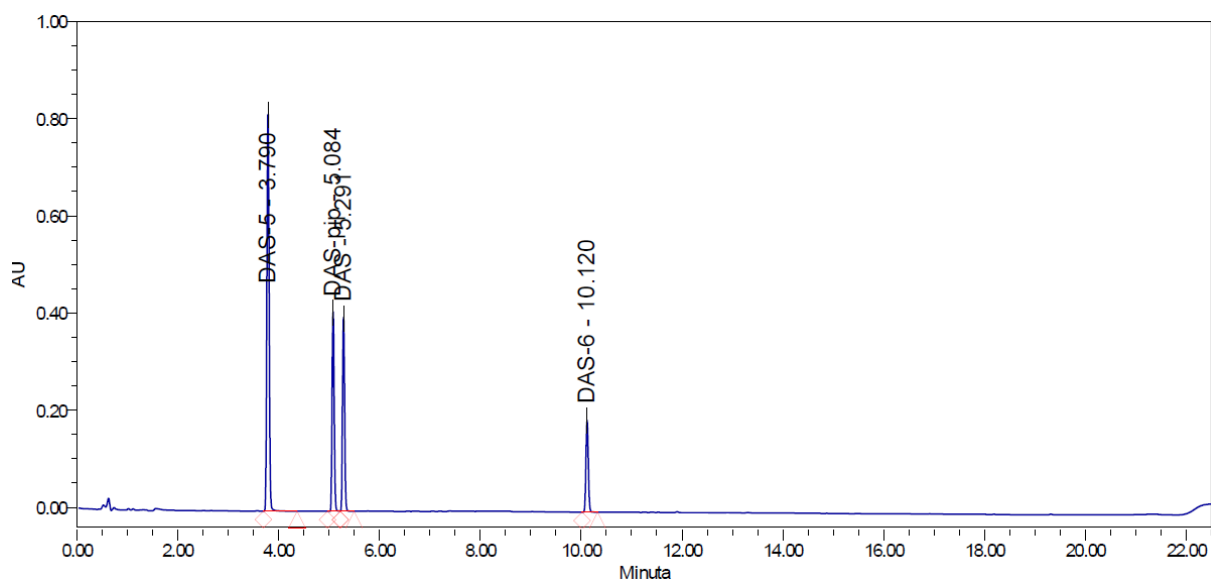
Slika D43. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 20 min i pH 1,5



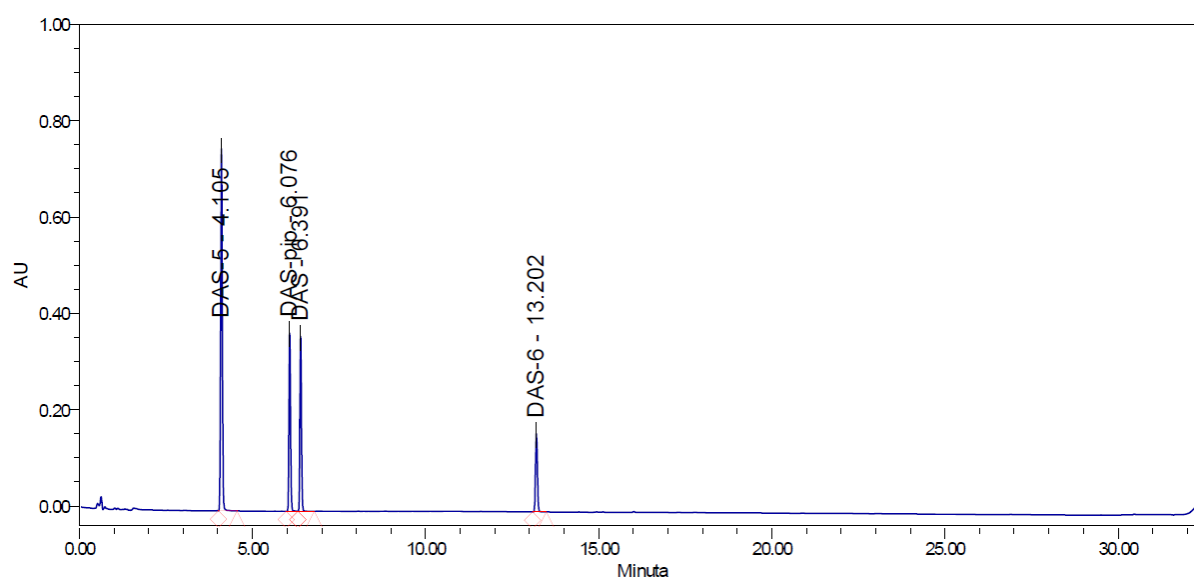
Slika D44. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 30 min i pH 1,5



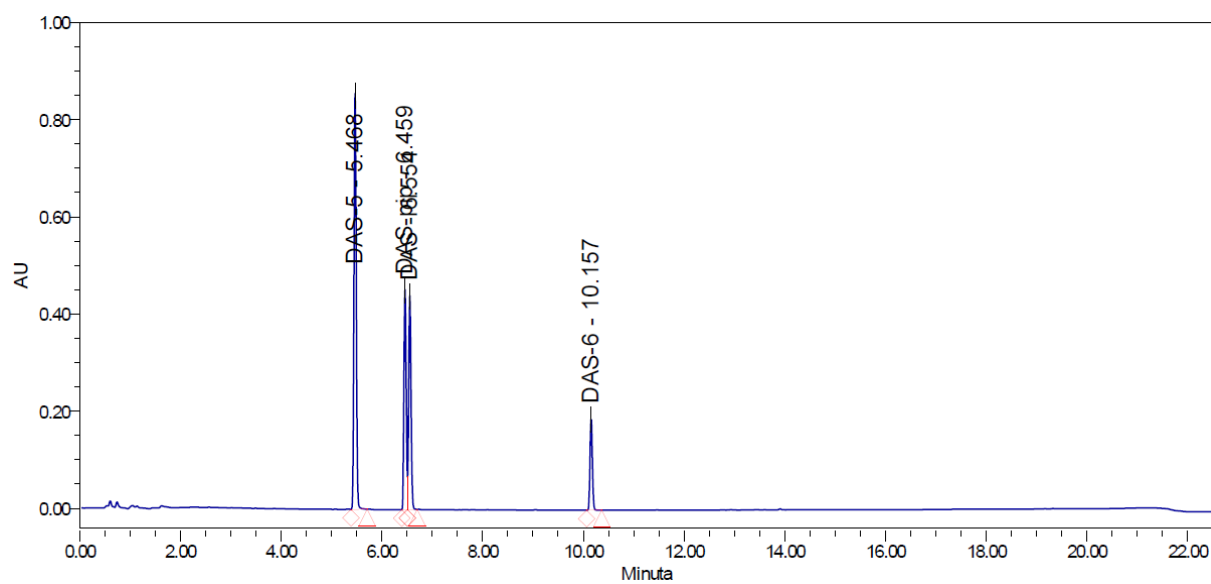
Slika D45. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 10 min i pH 2



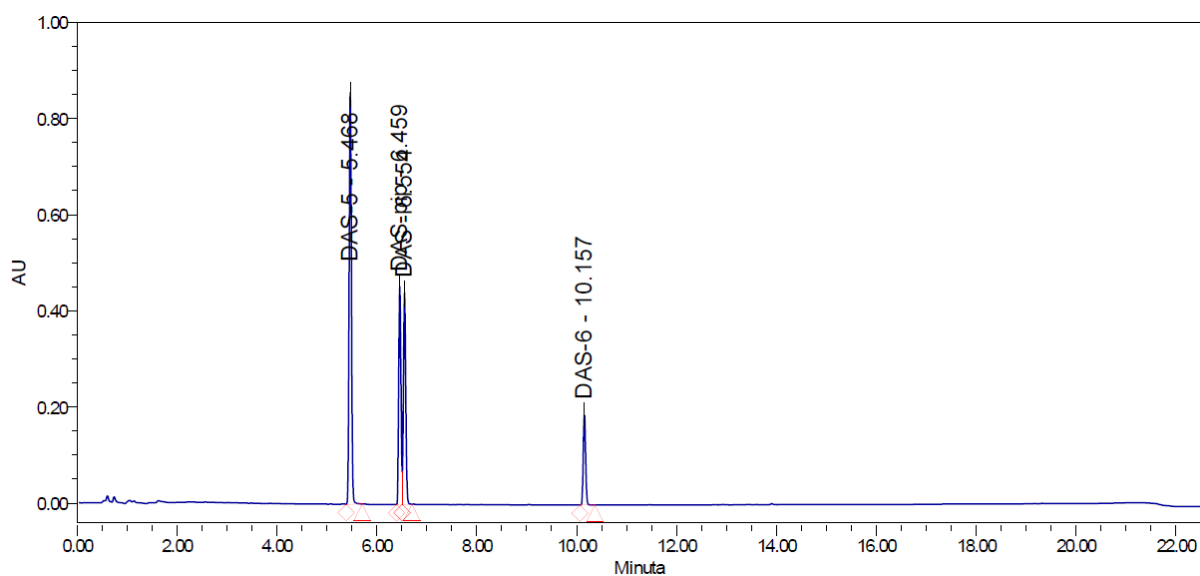
Slika D46. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 20 min i pH 2



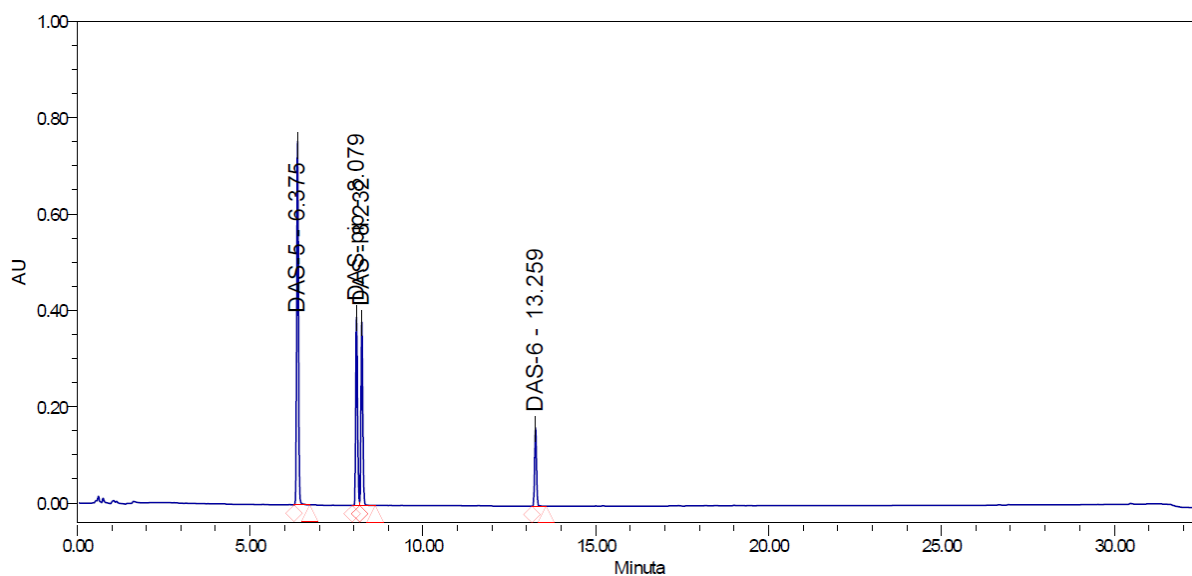
Slika D47. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 30 min i pH 2



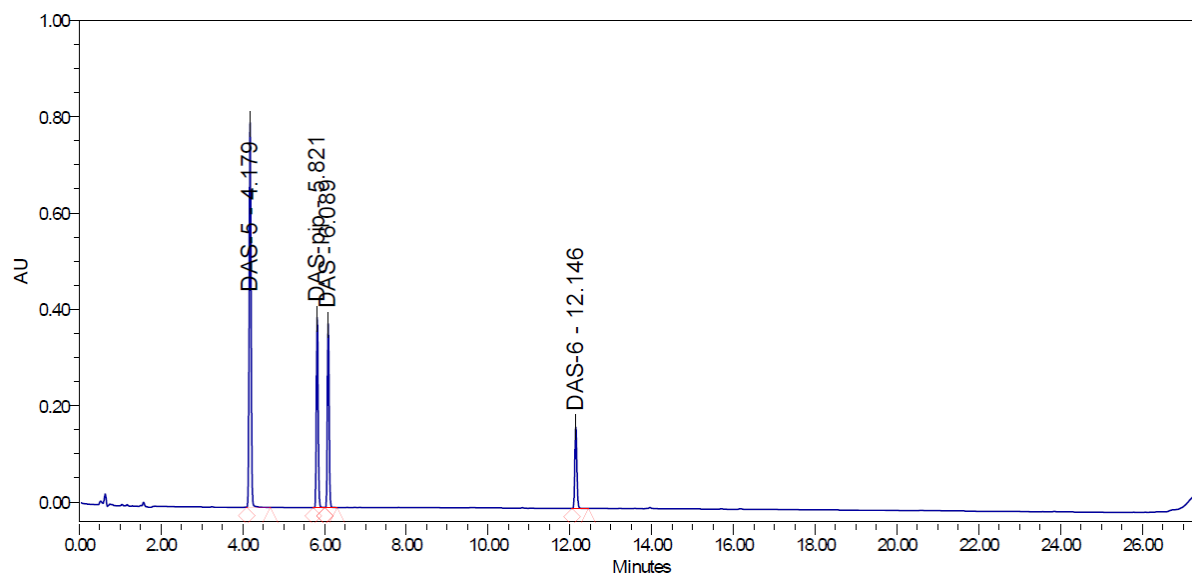
Slika D48. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 10 min i pH 3



Slika D49. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 10 min i pH 3



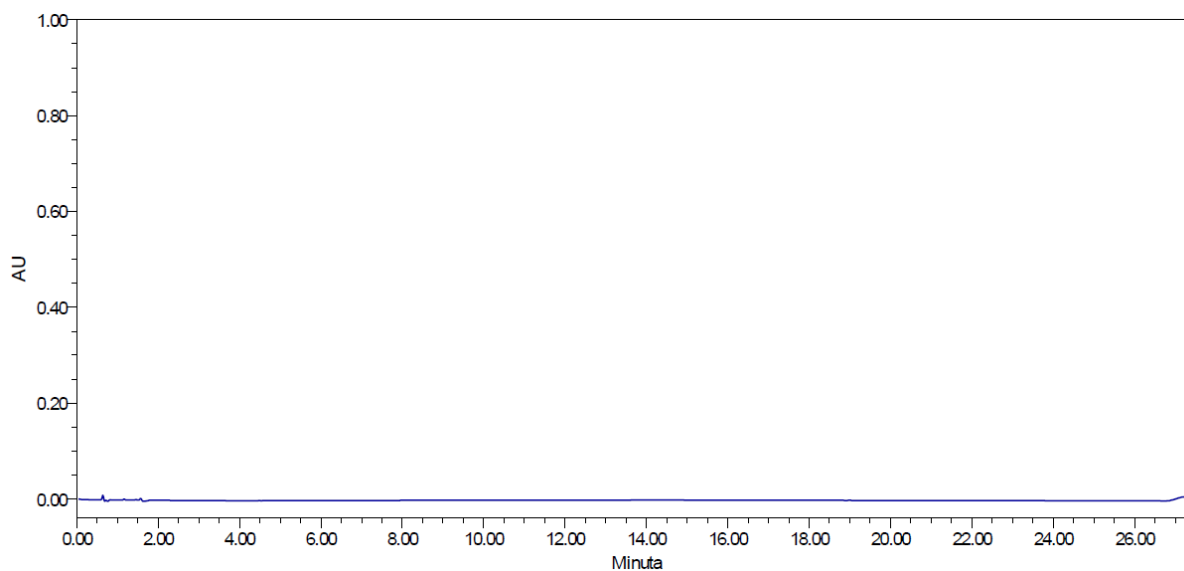
Slika D50. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 60 °C, tg 30 min i pH 3



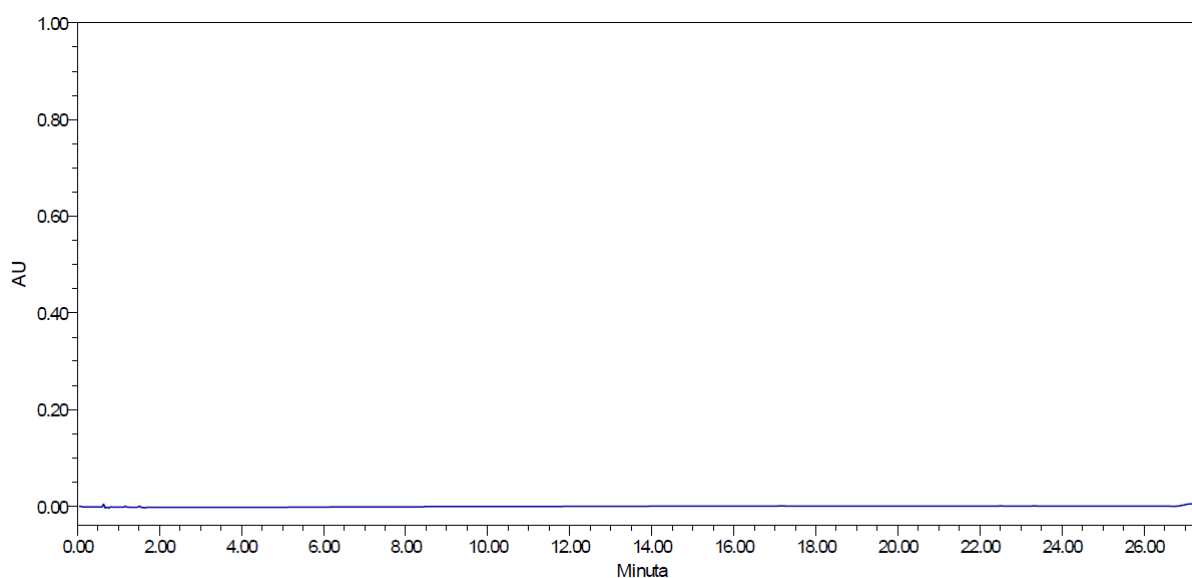
Slika D51. Kromatogram otopine dasatiniba i poznatih nečistoća pri uvjetima Tg 45 °C, tg 25 min i pH 2



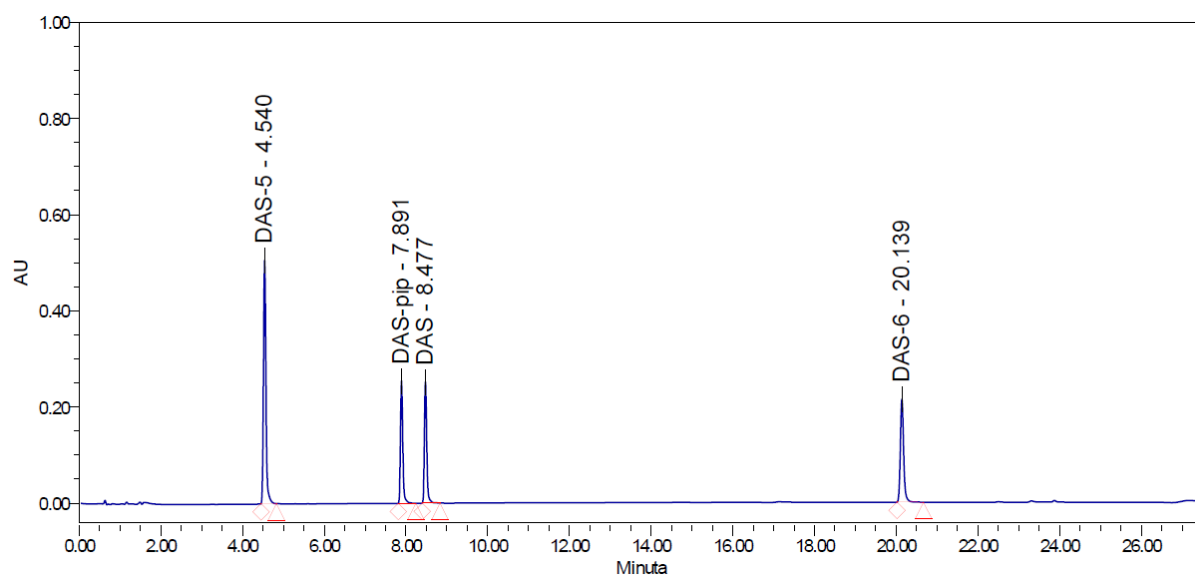
**8.4. Kromatogrami slijepih proba i otopine dasatiniba i poznatih nečistoća u ovisnosti o pH-vrijednosti, temperaturi kolone (Tg) i protoku mobilne faze na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl 1,7  $\mu\text{m}$   $\times$  2,1 mm  $\times$  100 mm***



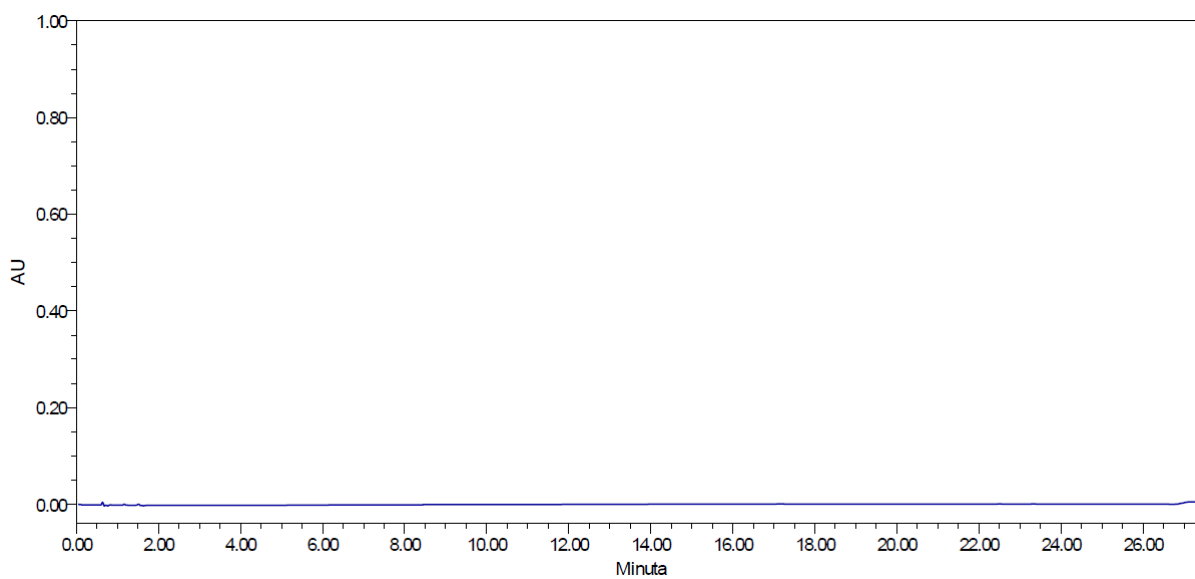
Slika D52. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 50 °C, tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



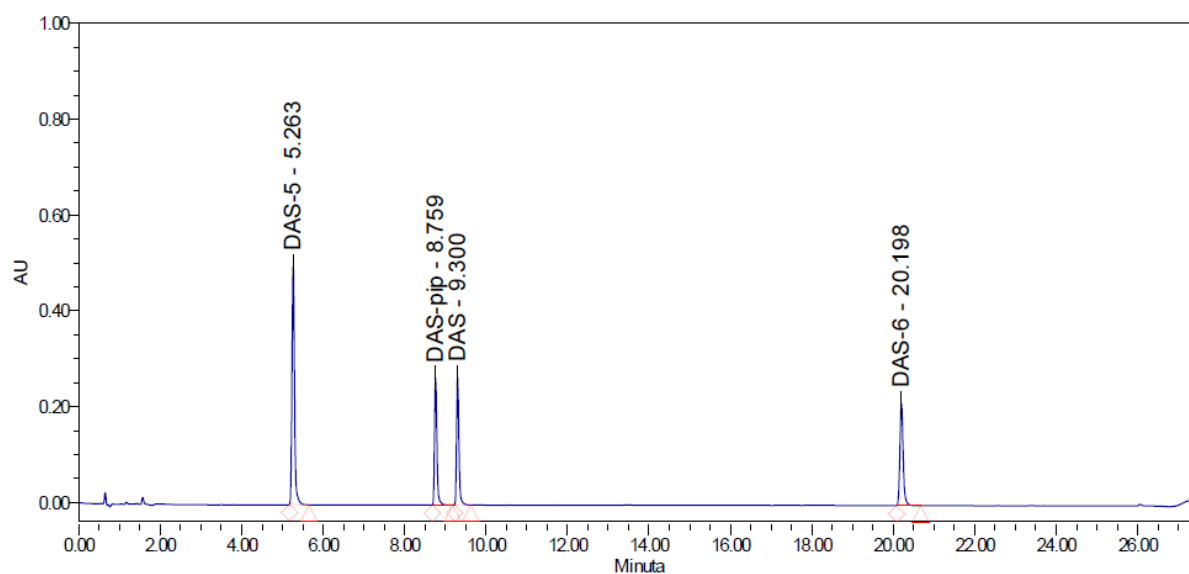
Slika D53. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 1,9, Tg 50 °C, tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



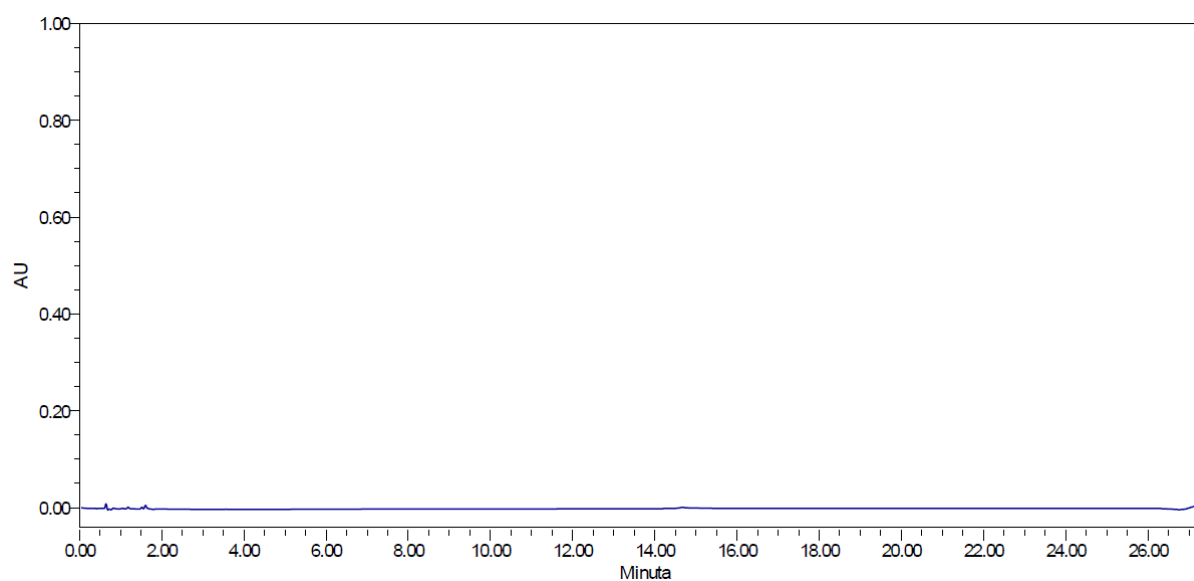
Slika D54. Kromatogram otopine RS pri uvjetima pH 1,9, Tg 50 °C i tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



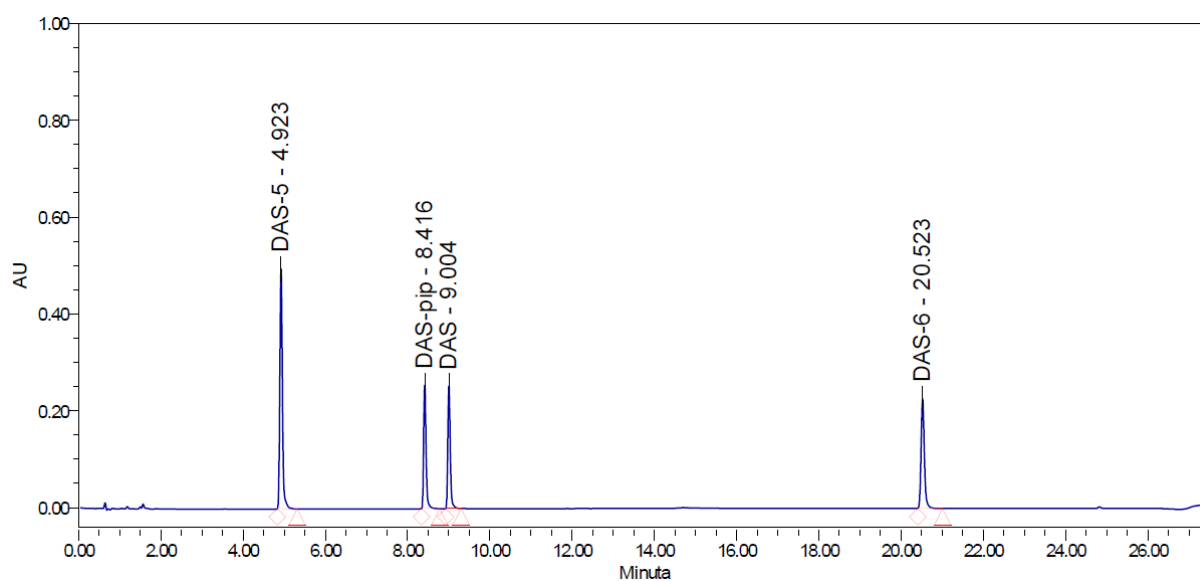
Slika D55. Kromatogram slijepa probe pri uvjetima pH 2,1, Tg 50 °C, tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



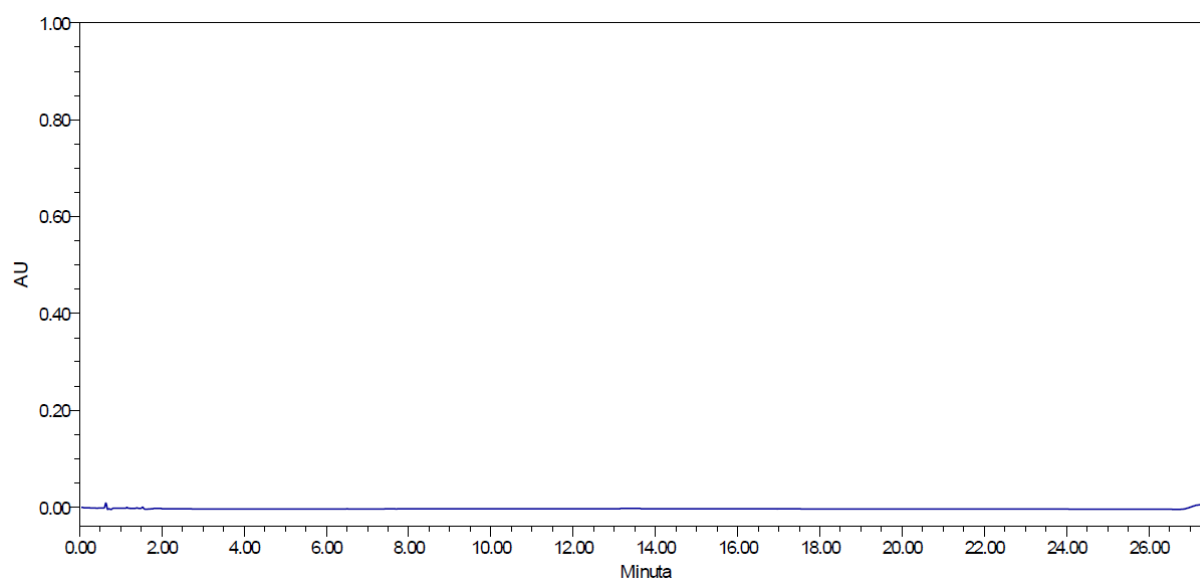
Slika D56. Kromatogram otopine RS pri uvjetima pH 2,1, Tg 50 °C, tg 25 min i i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



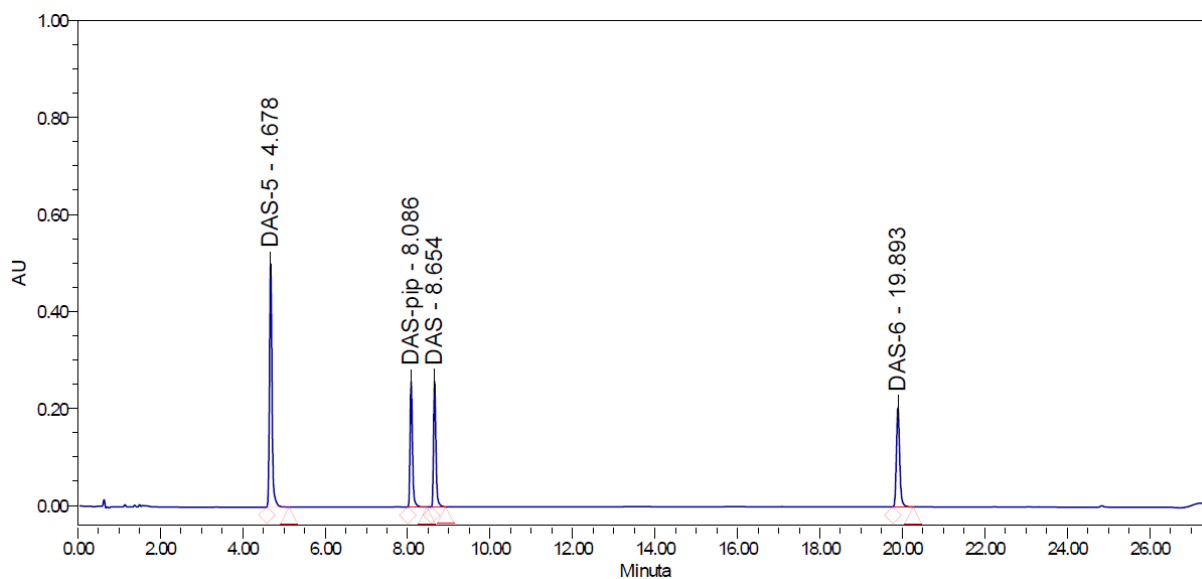
Slika D57. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 45 °C i tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



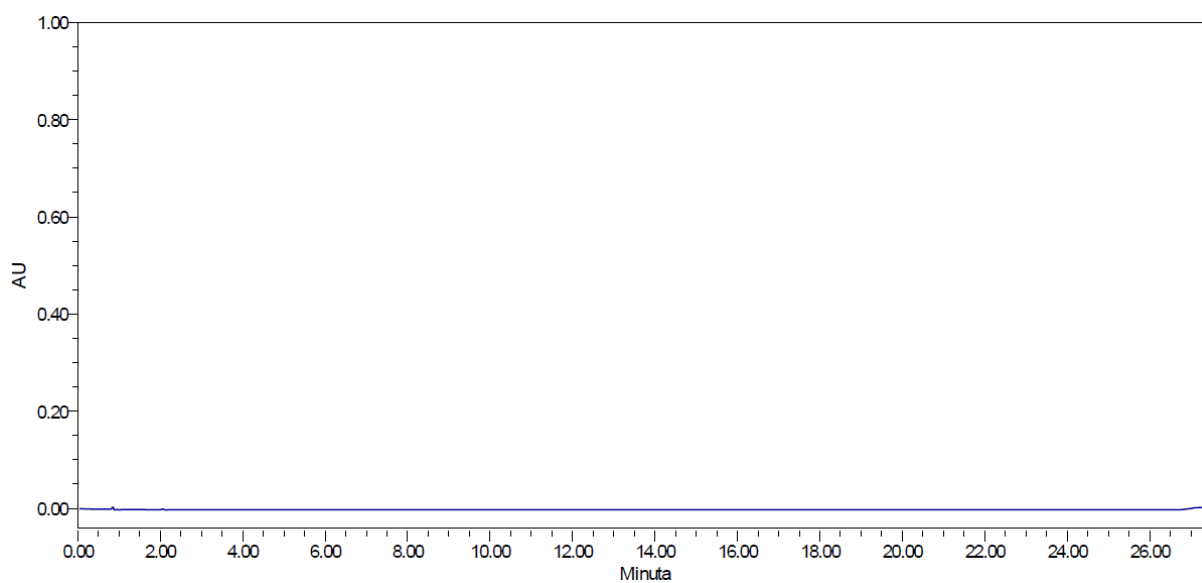
Slika D58. Kromatogram otopine RS pri uvjetima pH 2, Tg 45 °C, tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



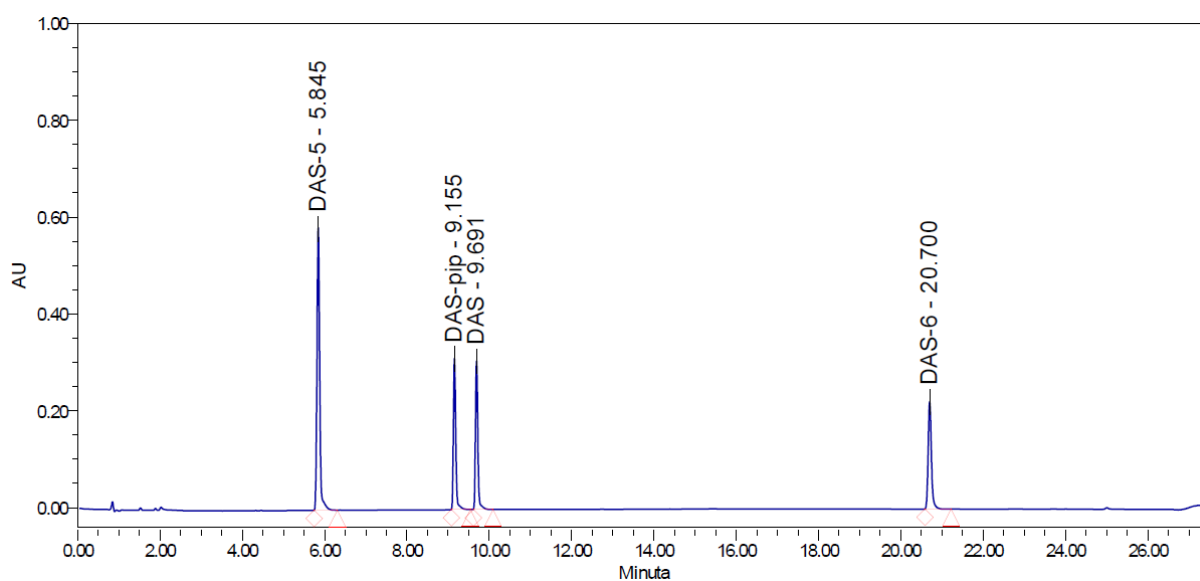
Slika D59. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 55 °C i tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



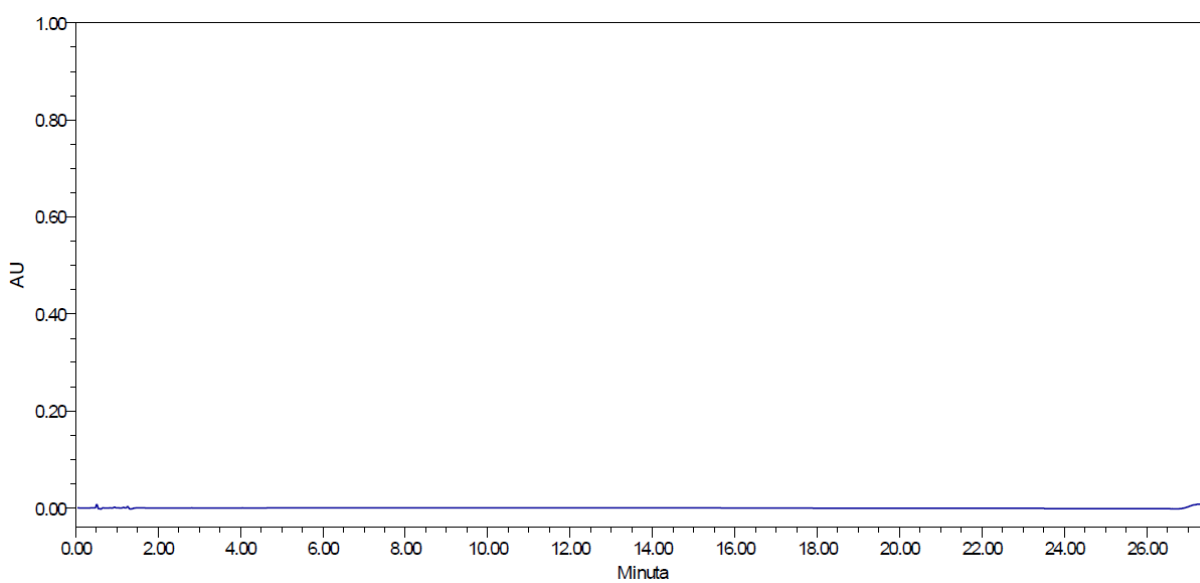
Slika D60. Kromatogram otopine RS pri uvjetima pH 2, Tg 55 °C i tg 25 min i protoku mobilne faze 0,4 mL min<sup>-1</sup>



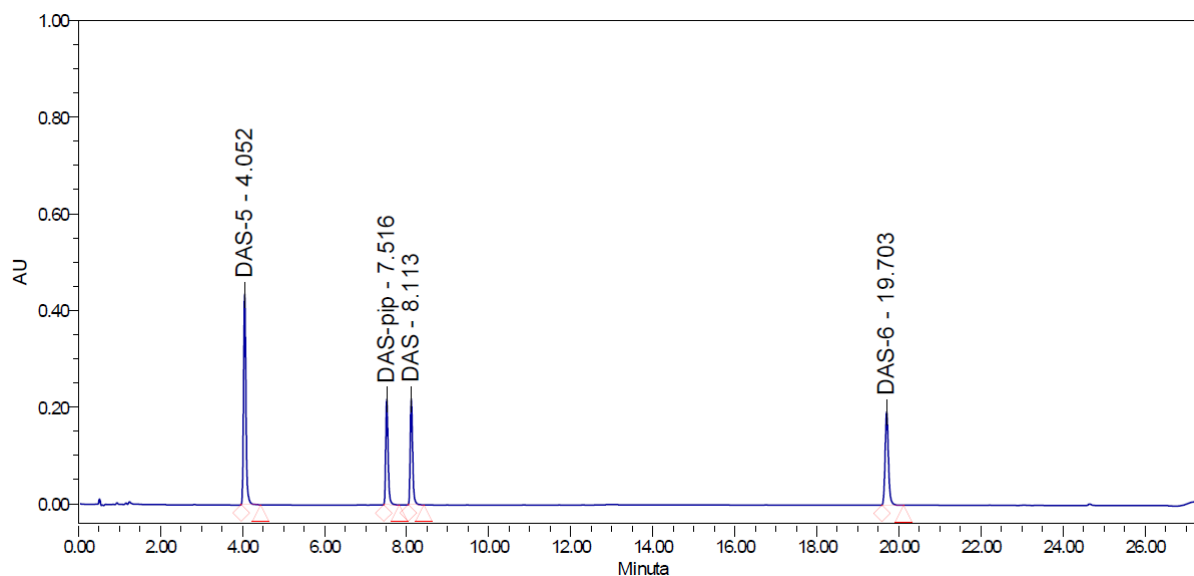
Slika D61. Kromatogram slijepa probe pri uvjetima pH 2, Tg 50 °C, tg 25 min i protoku 0,4 mL min<sup>-1</sup>



Slika D62. Kromatogram otopine RS pri uvjetima pH 2, Tg 50 °C, tg 25 min i protoku 0,3 mL min<sup>-1</sup>



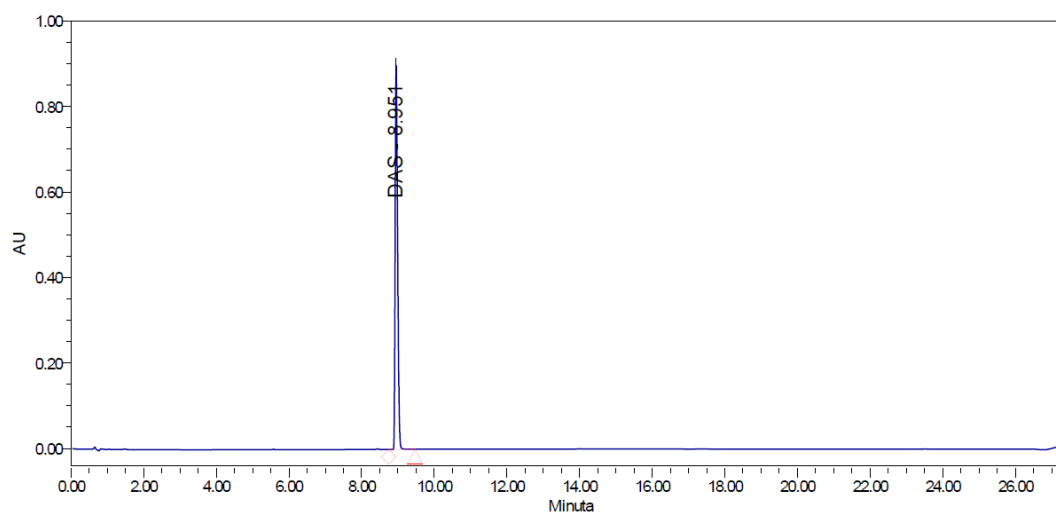
Slika D63. Kromatogram slijepe probe pri uvjetima pH 2, Tg 50 °C, tg 25 min i protoku 0,5 mL min<sup>-1</sup>



Slika D64. Kromatogram otopine RS pri uvjetima pH 2, Tg 50 °C, tg 25 min i protoku 0,5 mL min<sup>-1</sup>

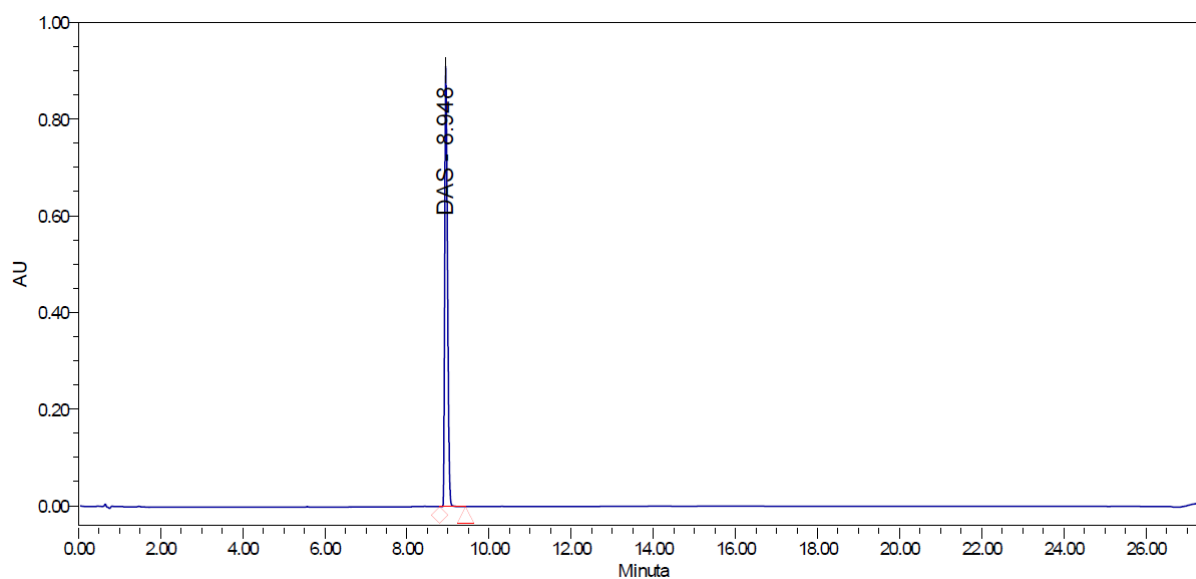
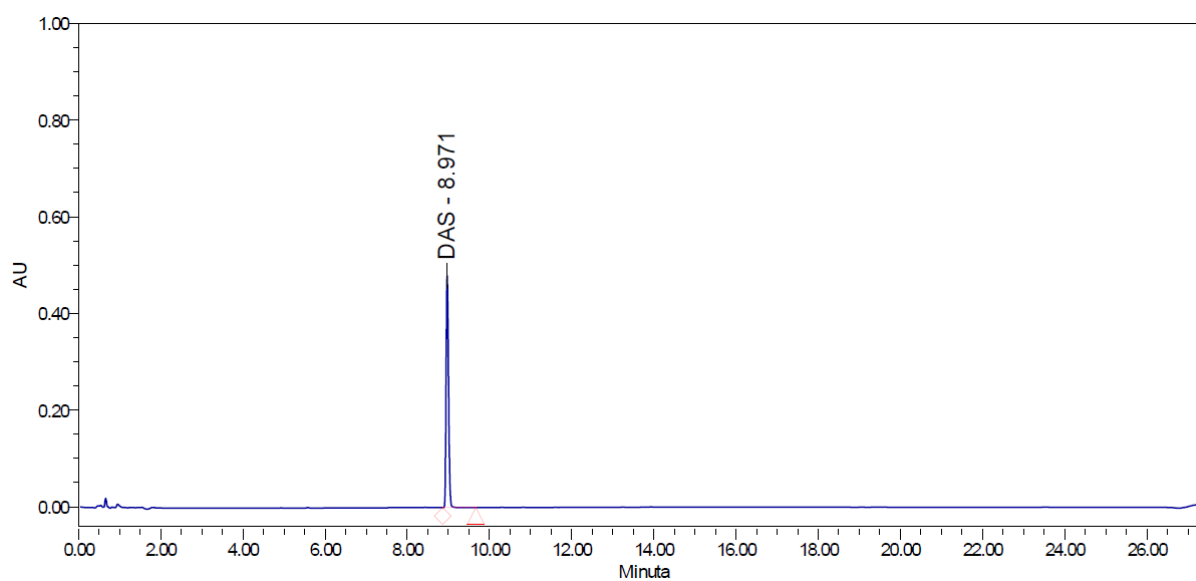
### 8.5. Kromatogrami kontrolnog uzorka i uzoraka otopine dasatiniba podvrgnutog forsiranoj razgradnji na koloni *Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl* 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm pri uvjetima: temperatura kolone (Tg) = 50 °C, vremene gradijentog eluiranja (tg) = 25 min i pH-vrijednosti fosfatnog pufera = 2

#### 8.5.1. Kontrolni uzorak



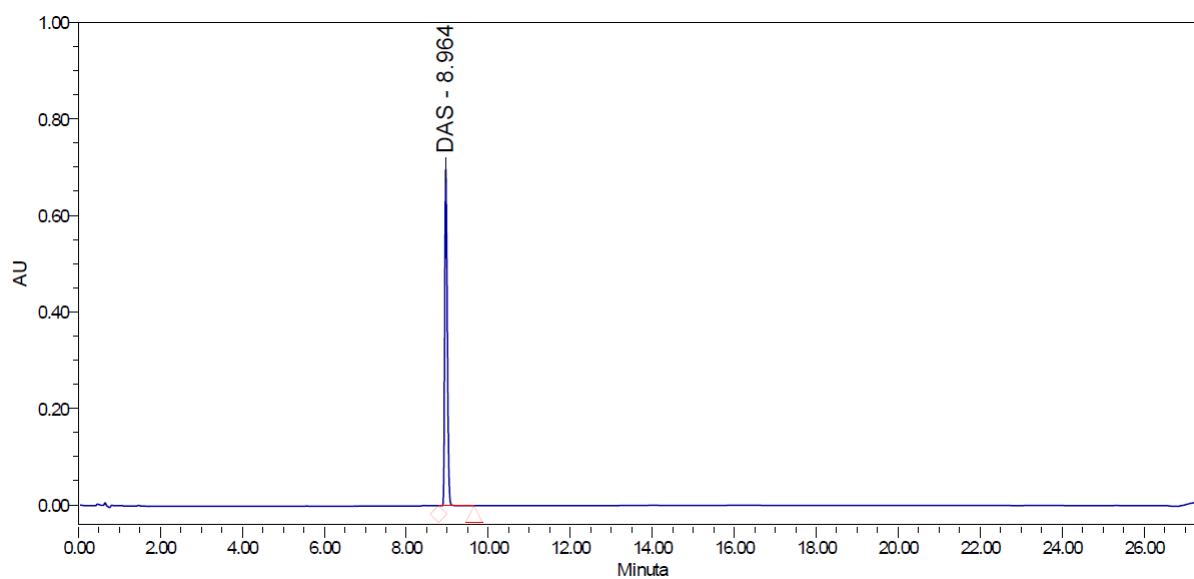
Slika D65. Kromatogram otopine dasatiniba služi kao kontrolni uzorak

## 8.5.2. Razgradnja u kiselom

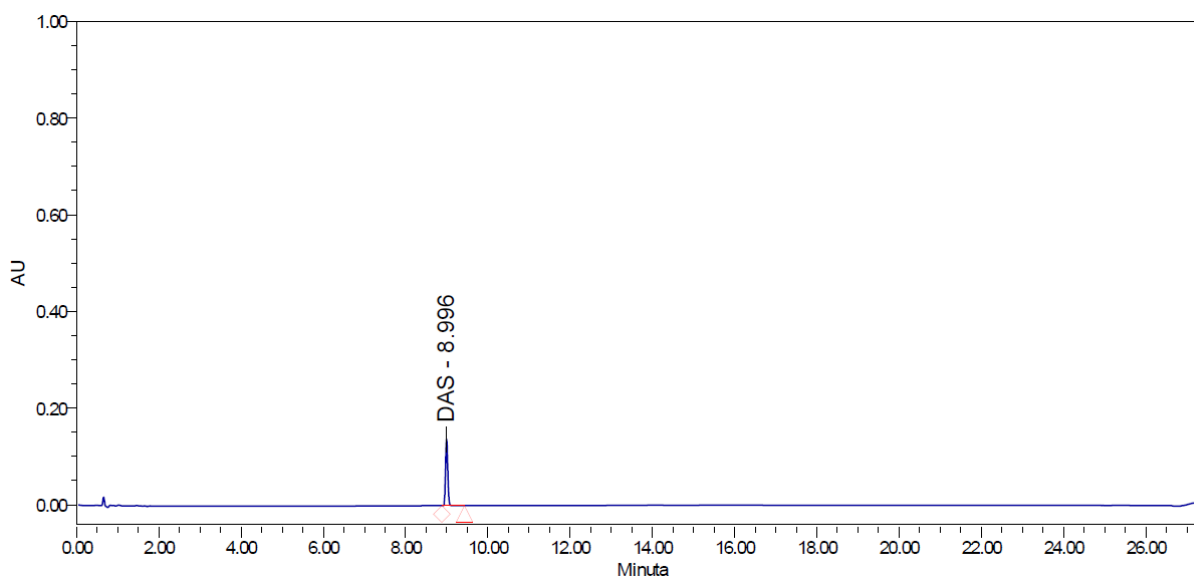
Slika D66. Kromatogram otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s 0,1 mol  $\text{dm}^{-1}$  HClSlika D67. Kromatogram otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s 1 mol  $\text{dm}^{-1}$  HCl



## 8.5.3. Razgradnja u lužnatom

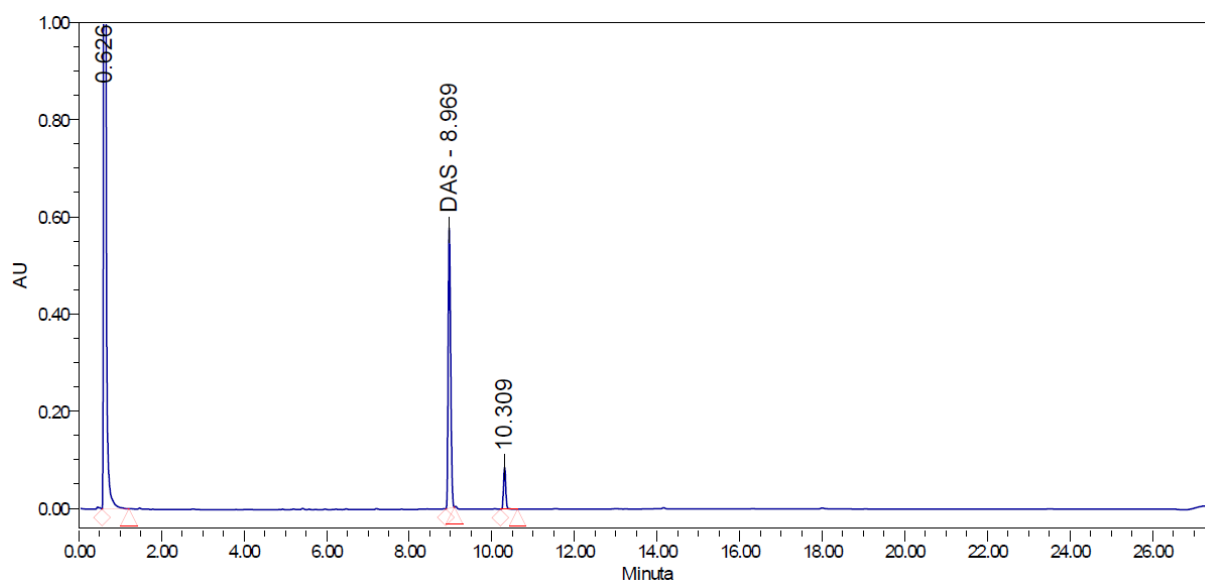


Slika D68. Kromatogram otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$

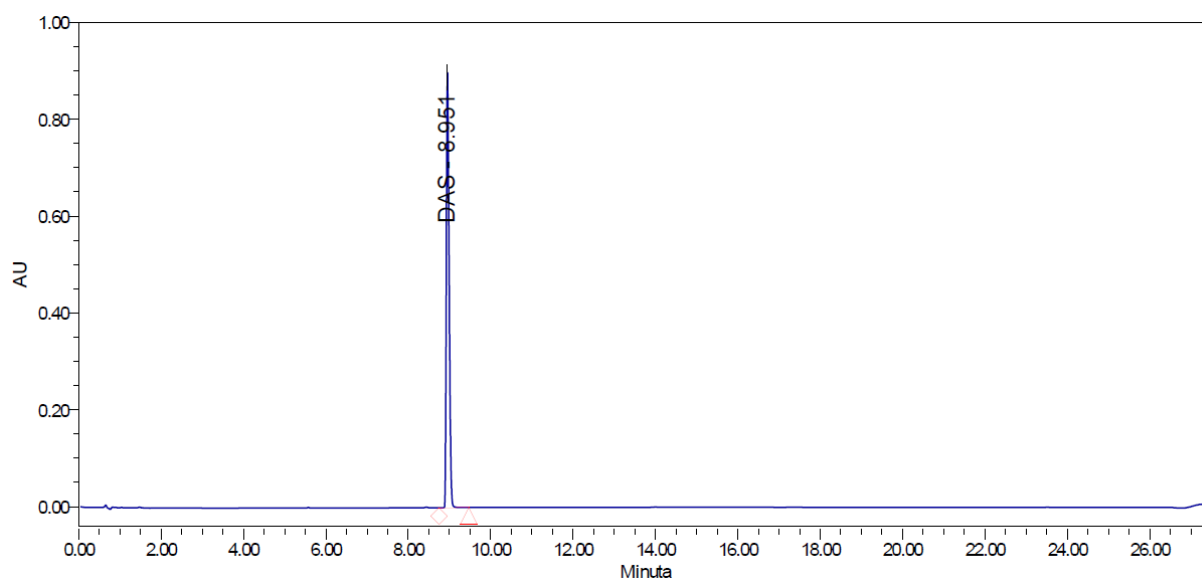


Slika D69. Kromatogram otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s  $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$

## 8.5.4. Razgradnja s peroksidom

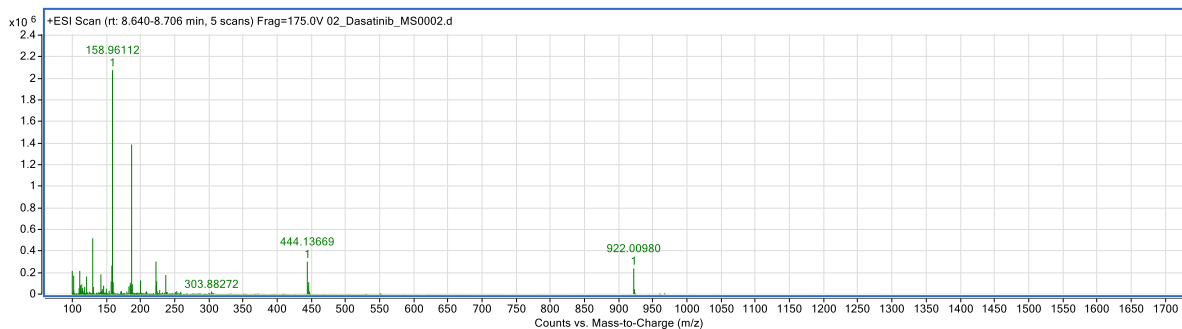
Slika D70. Kromatogram otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s 30 %  $H_2O_2$ 

## 8.5.5. Razgradnja na povišenoj temperaturi

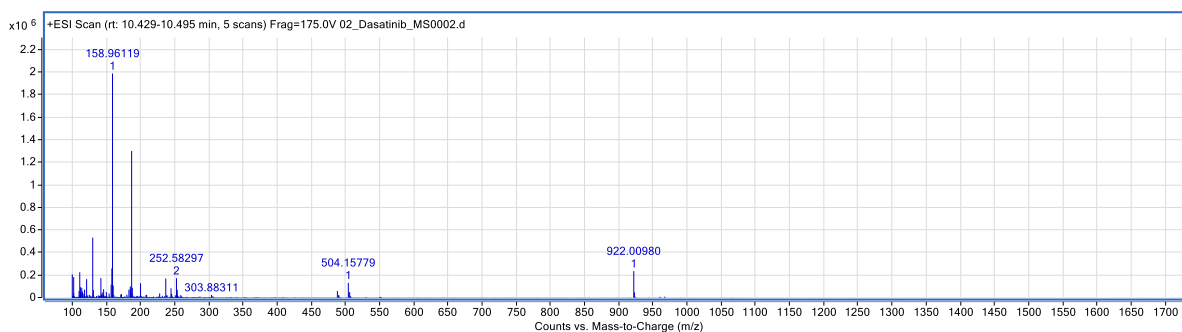


Slika D71. Kromatogram otopine dasatiniba koji je podvrgnut forsiranoj razgradnji s (60 °C)



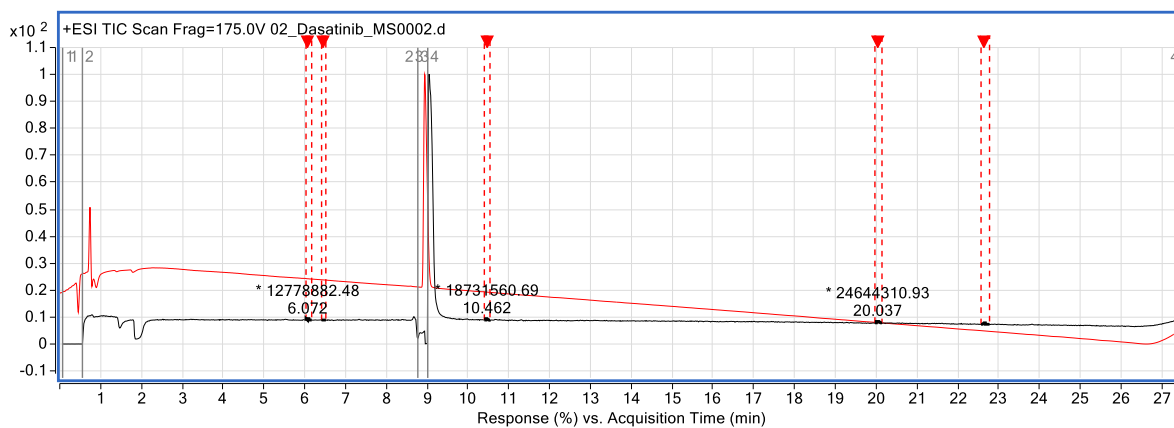


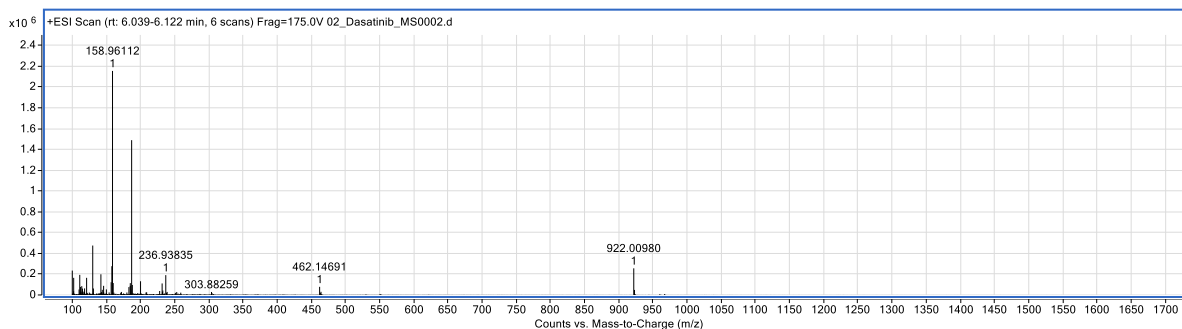
Slika D75. MS spektar dasatiniba (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 8,640-8,706 min)



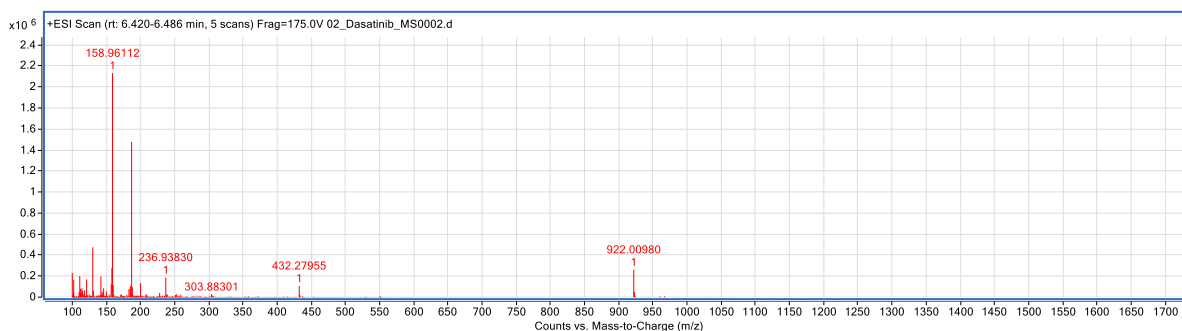
Slika D76. MS spektar dasatiniba (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,429-10,495 min)

### 8.6.2. Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s $0,1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ HCl}$

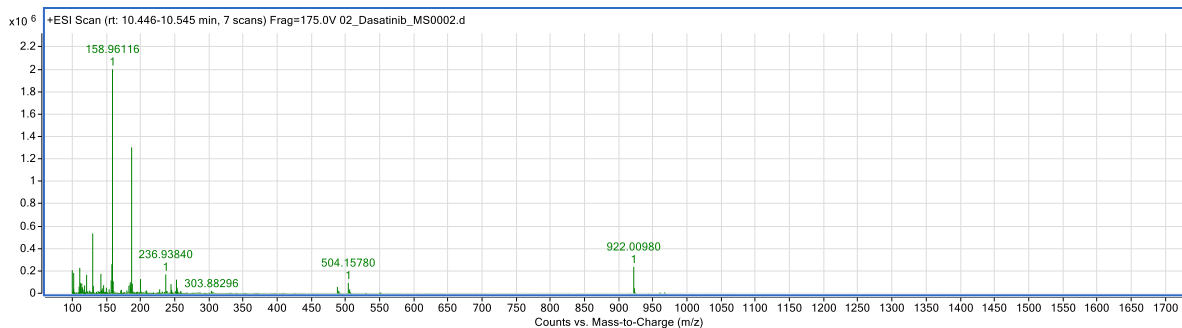
Slika D77. Rezultat LC-MS analize uzorka dasatiniba koji je tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ HCl}$  s označenim pikovima od interesa



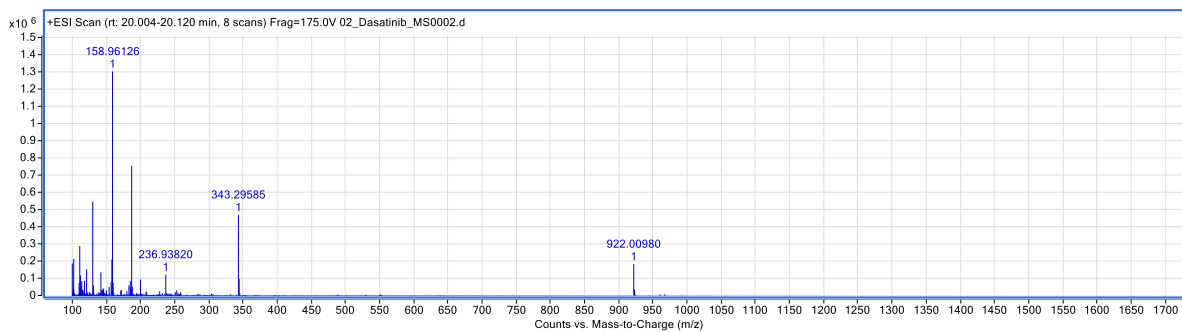
Slika D78. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1}$  HCl (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 6,039-6,122 min)



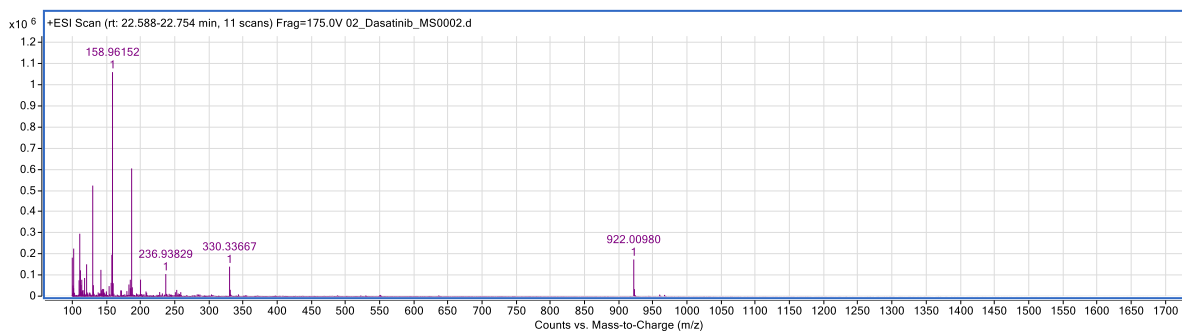
Slika D79. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1}$  HCl (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 6,420-6,486 min)



Slika D80. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1}$  HCl (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,446-10,545 min)

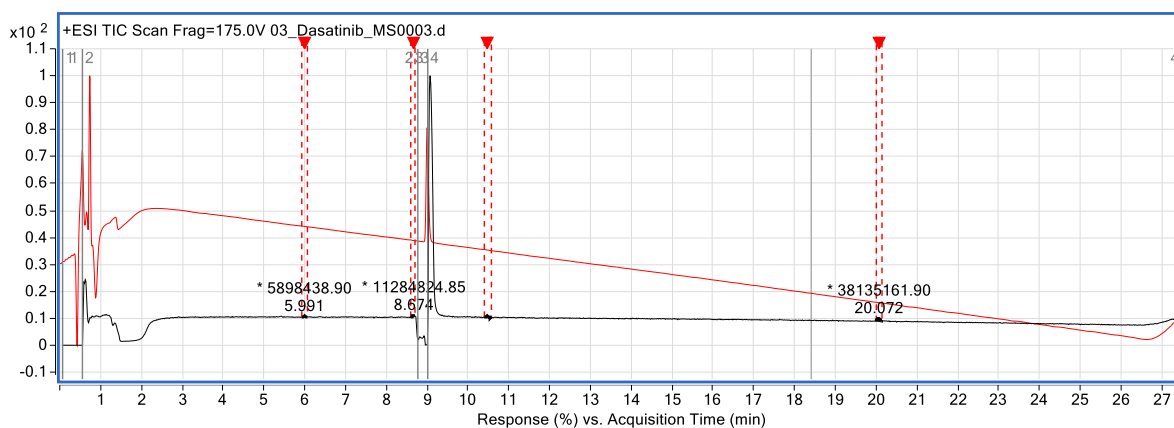


Slika D81. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1}$  HCl (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 20,004-20,120 min)

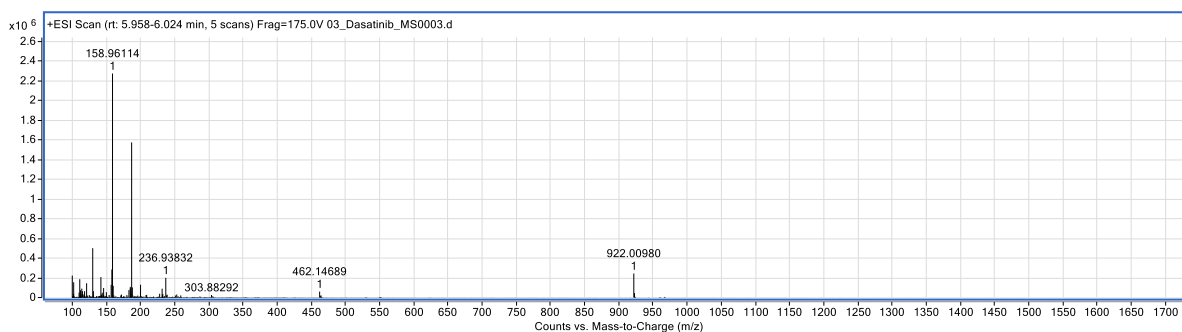


Slika D82. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ HCl}$  (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 22,588-22,754 min)

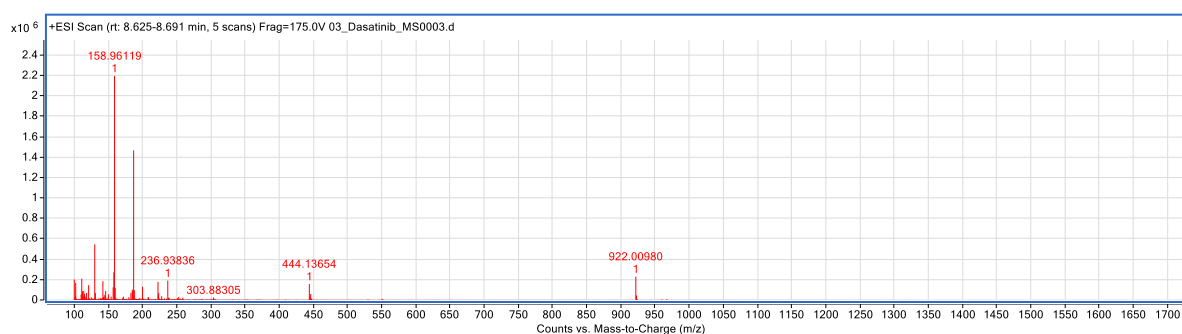
### 8.6.3. Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s $1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ HCl}$



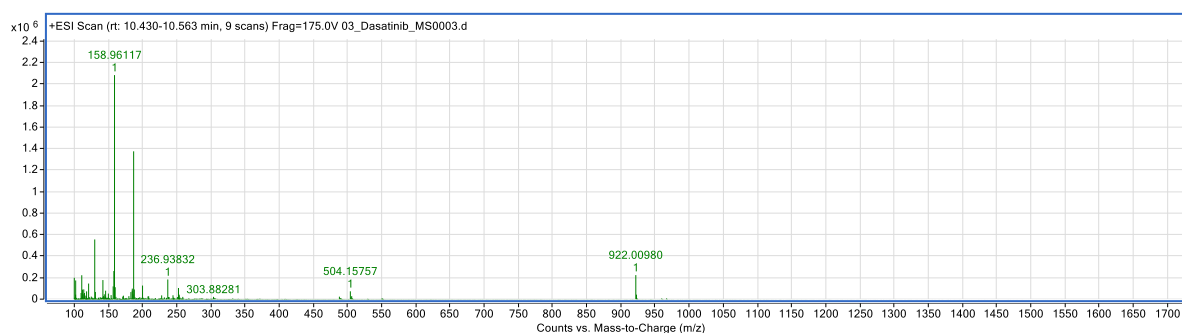
Slika D83. Rezultat LC-MS analize uzorka dasatiniba koji je tretiran s  $1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ HCl}$  s označenim pikovima od interesa



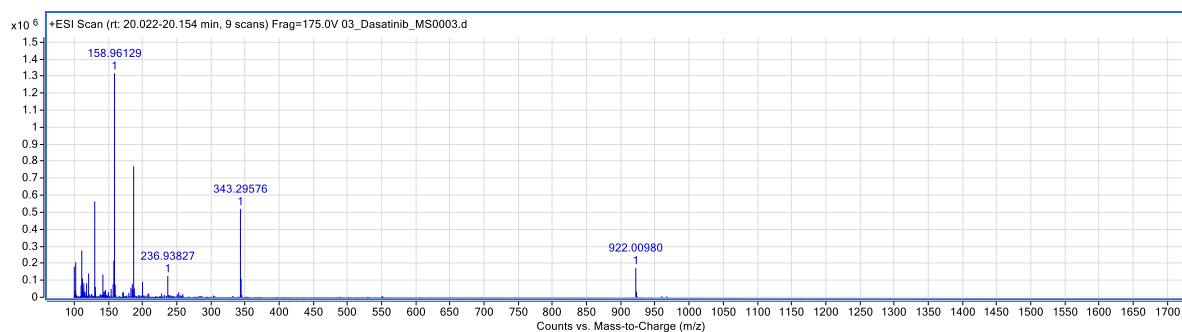
Slika D84. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ HCl}$  (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 5,958- 6,024 min)



Slika D85. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $1 \text{ mol dm}^{-1}$  HCl (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 8,625-8,691 min)

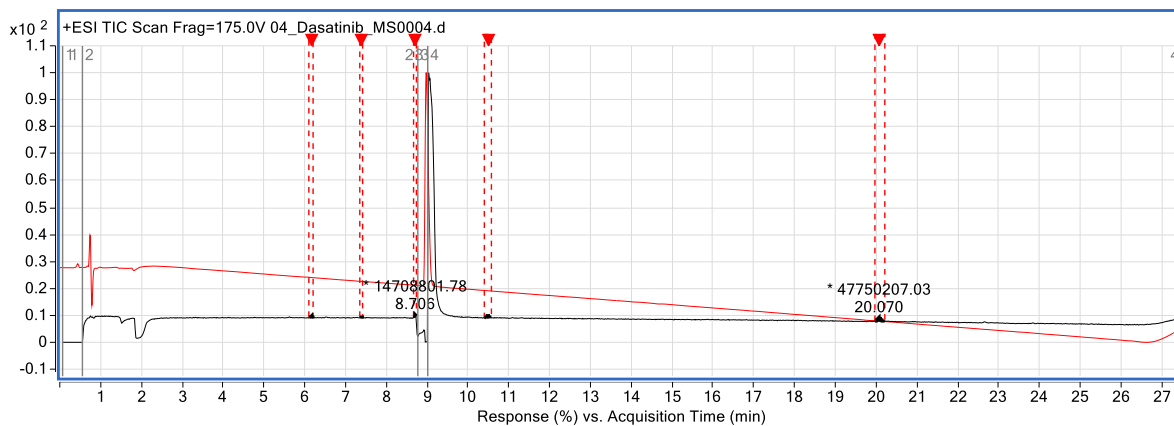


Slika D86. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $1 \text{ mol dm}^{-1}$  HCl (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,430-10,563 min)

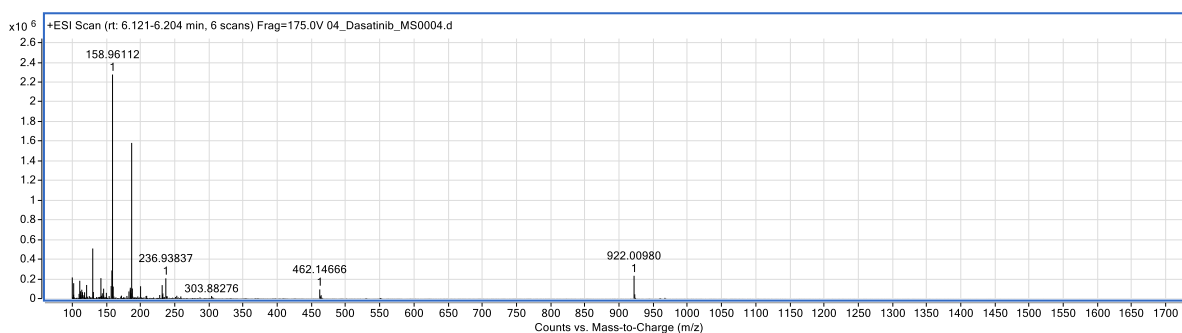


Slika D87. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $1 \text{ mol dm}^{-1}$  HCl (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 20,022-20,154 min)

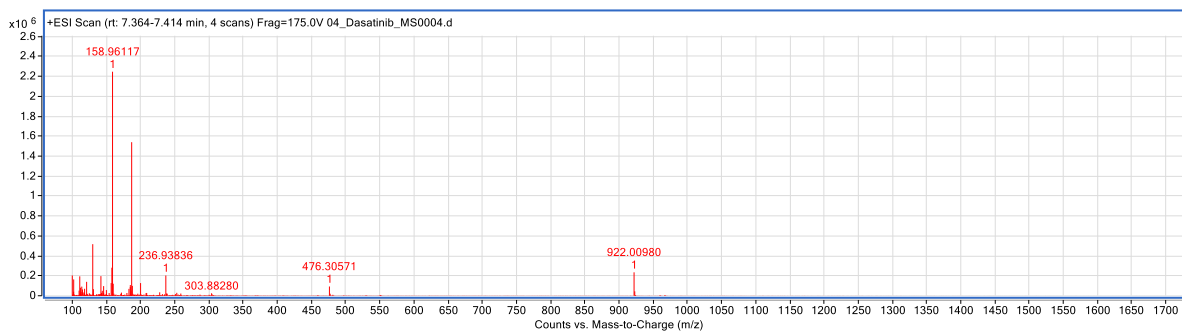
#### 8.6.4. Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s $0,1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ NaOH}$



Slika D88. Rezultat LC-MS analize uzorka dasatiniba koji je tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ NaOH}$  s označenim pikovima od interesa

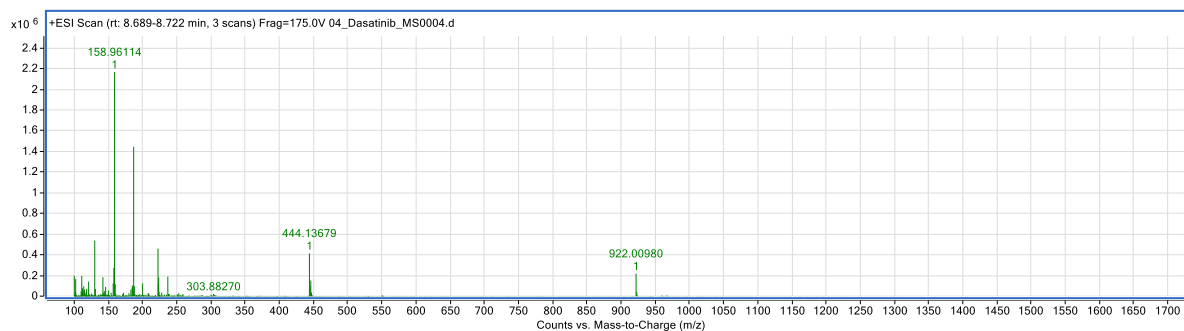


Slika D89. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ NaOH}$  (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 6,121-6,204 min)

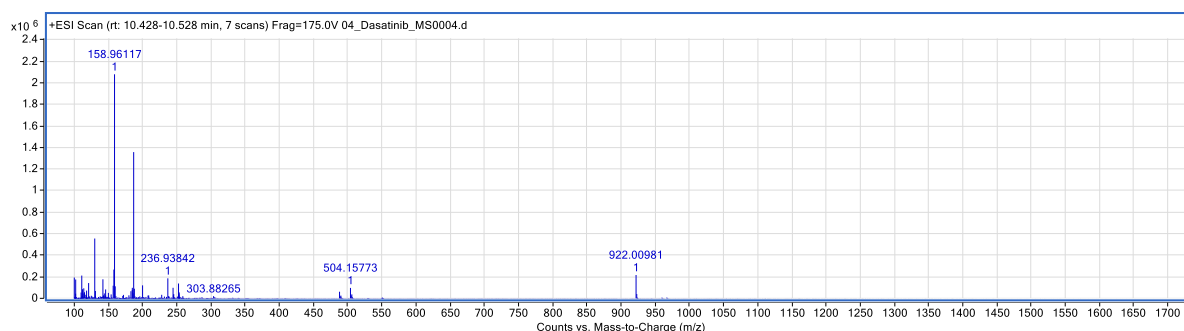


Slika D90. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s  $0,1 \text{ mol dm}^{-1} \text{ NaOH}$  (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 7,364-7,414 min)

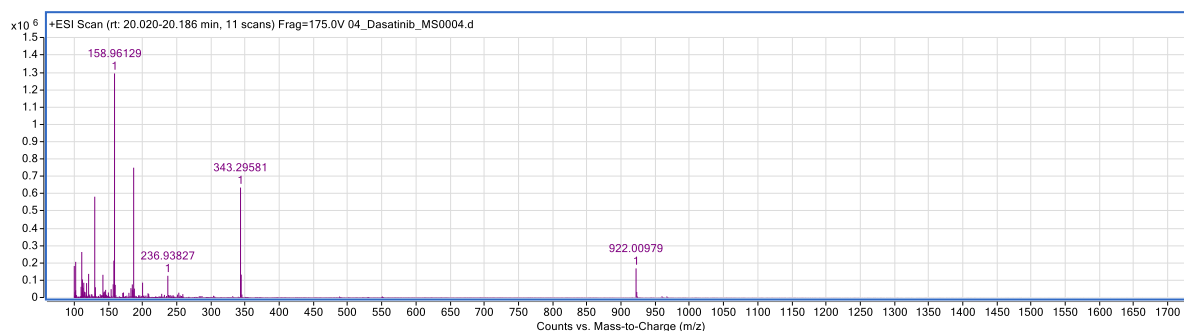




Slika D91. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s 0,1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 8,689-8,722 min)

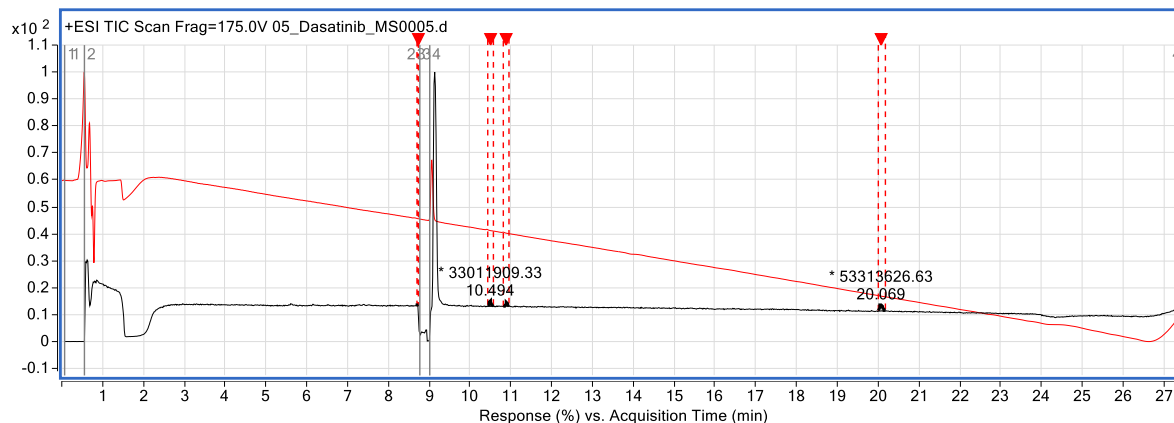


Slika D92. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s 0,1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,428-10,528 min)

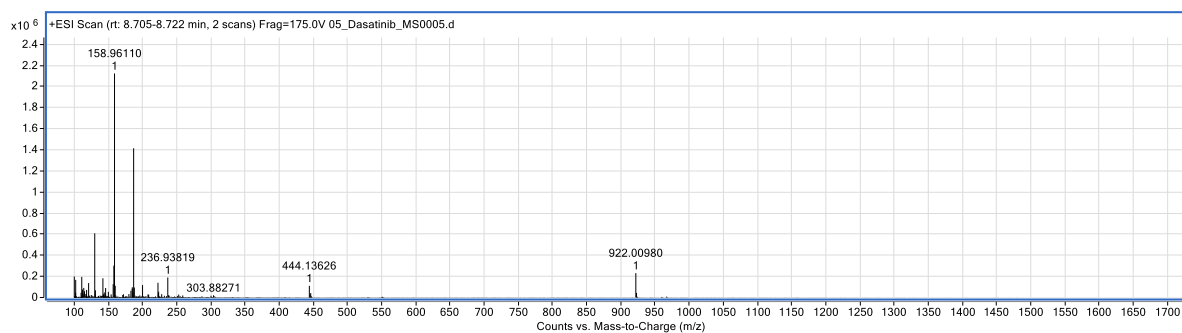


Slika D93. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s 0,1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 20,020-20,186 min)

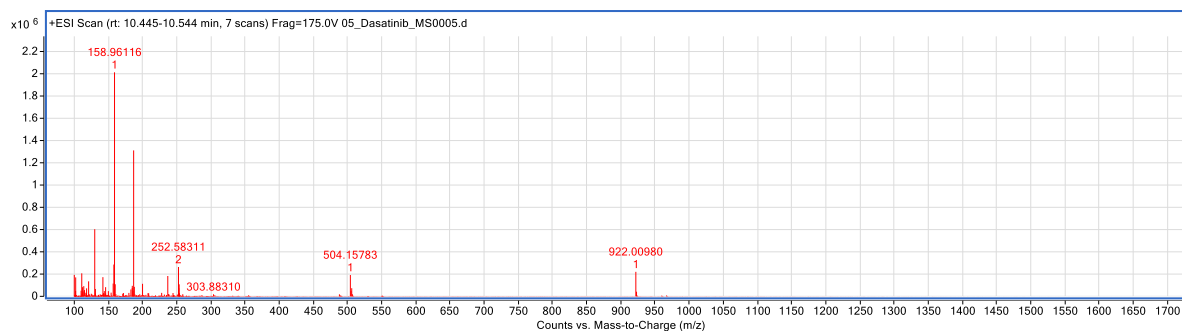
### 8.6.5. Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s 1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH



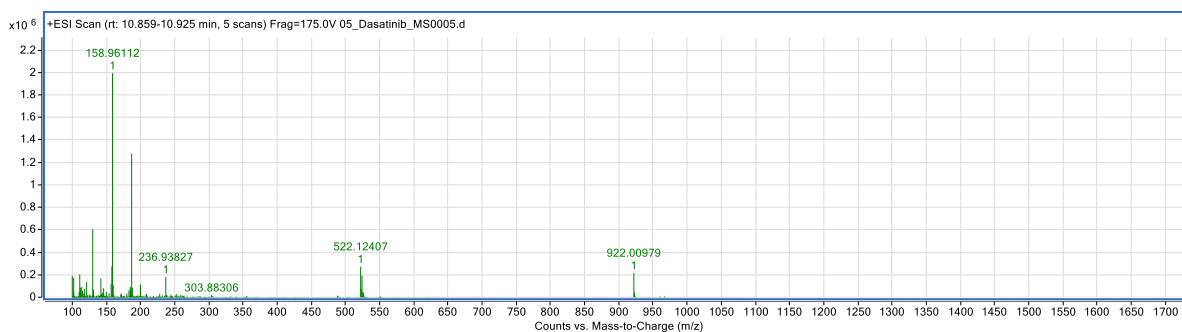
Slika D94. Rezultat LC-MS analize uzorka dasatiniba koji je tretiran s 1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH s označenim pikovima od interesa



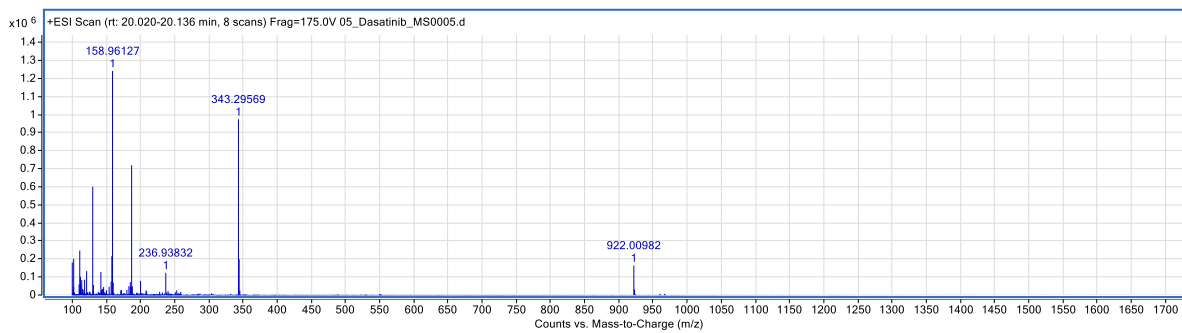
Slika D95. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s 1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 8,705-8,722 min)



Slika D96. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s 1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,445-10,544 min)

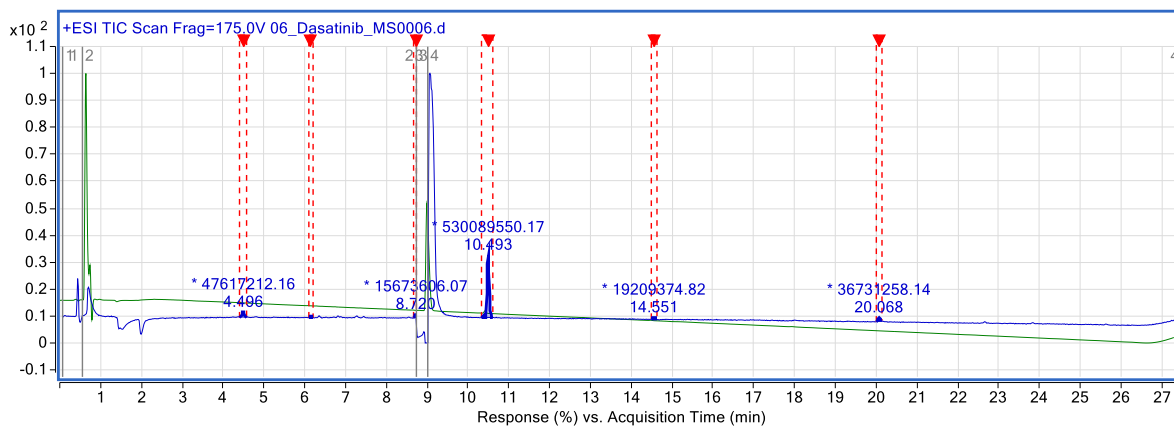


Slika D97. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s 1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,859-10,925 min)

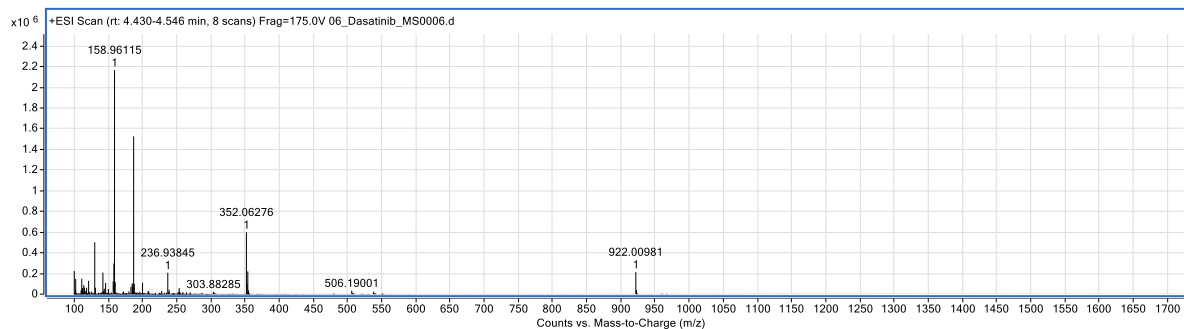


Slika D98. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran s 1 mol dm<sup>-1</sup> NaOH (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 20,020-20,136 min)

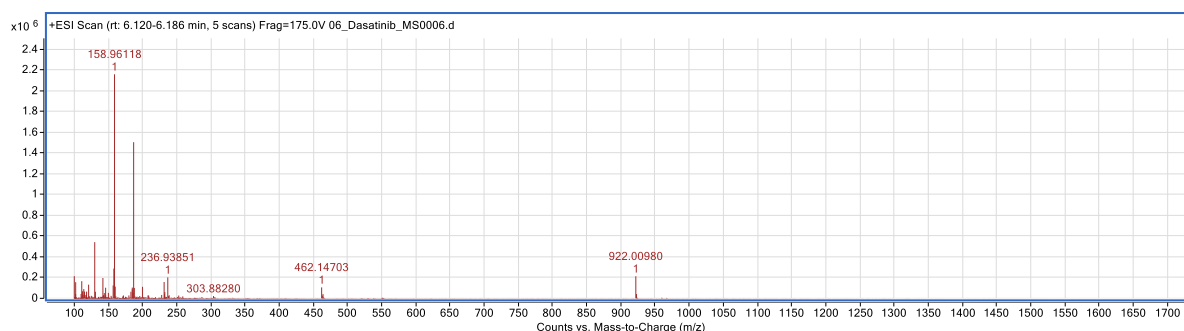
#### 8.6.6. Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji s 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



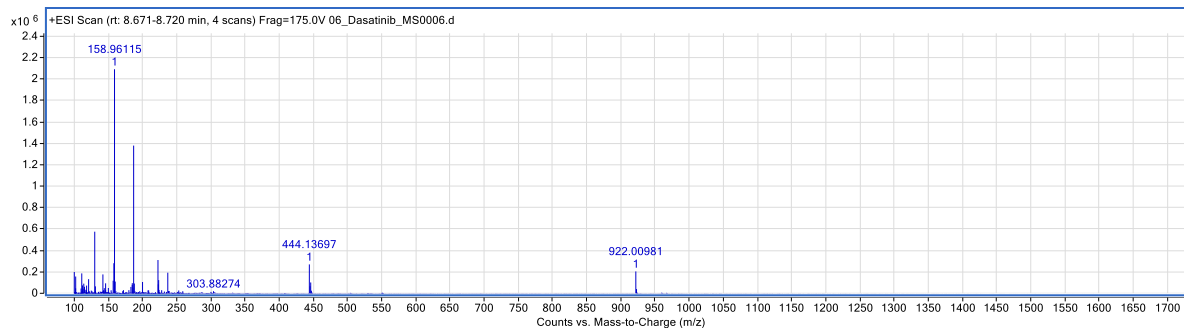
Slika D99. Rezultat LC-MS analize uzorka dasatiniba koji je tretiran s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s označenim pikovima od interesa



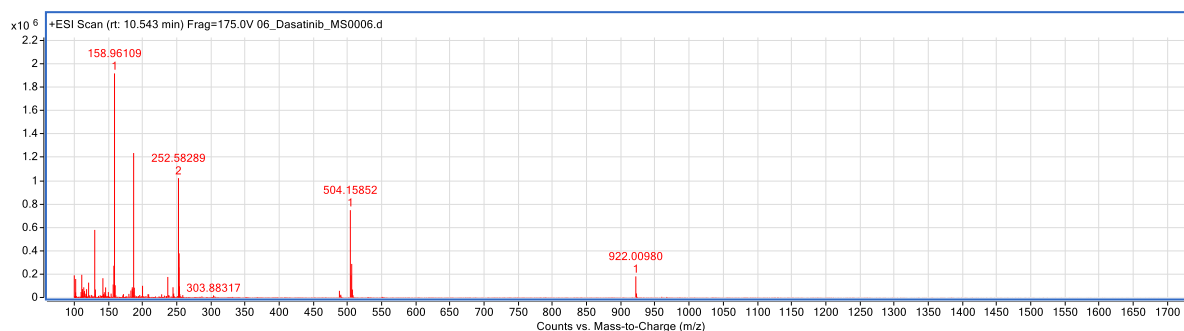
Slika D100. MS spekter uzorka dasatiniba koji tretiran s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 4,430-4,546 min)



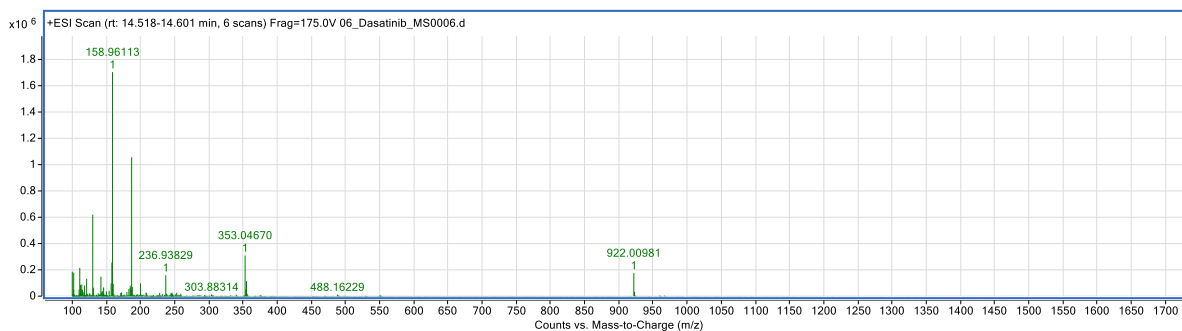
Slika D101. MS spekter uzorka dasatiniba koji tretiran s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 6,120-6,186 min)



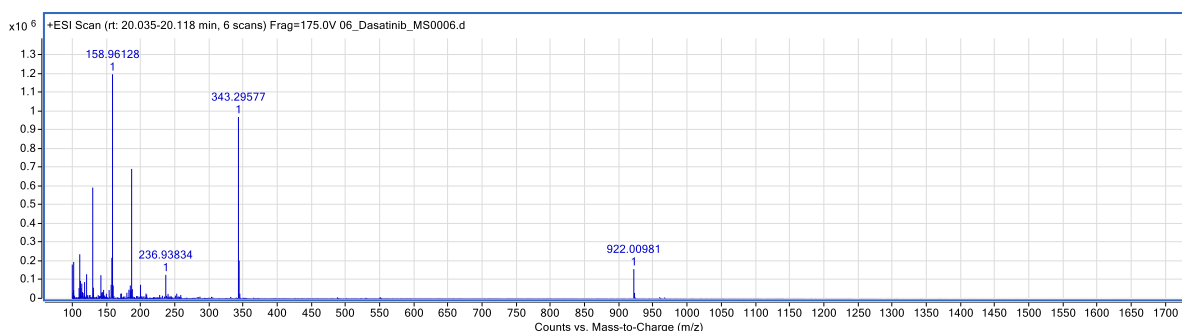
Slika D102. MS spekter uzorka dasatiniba koji tretiran s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 8,671-8,720 min)



Slika D103. MS spekter uzorka dasatiniba koji tretiran s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,543 min)

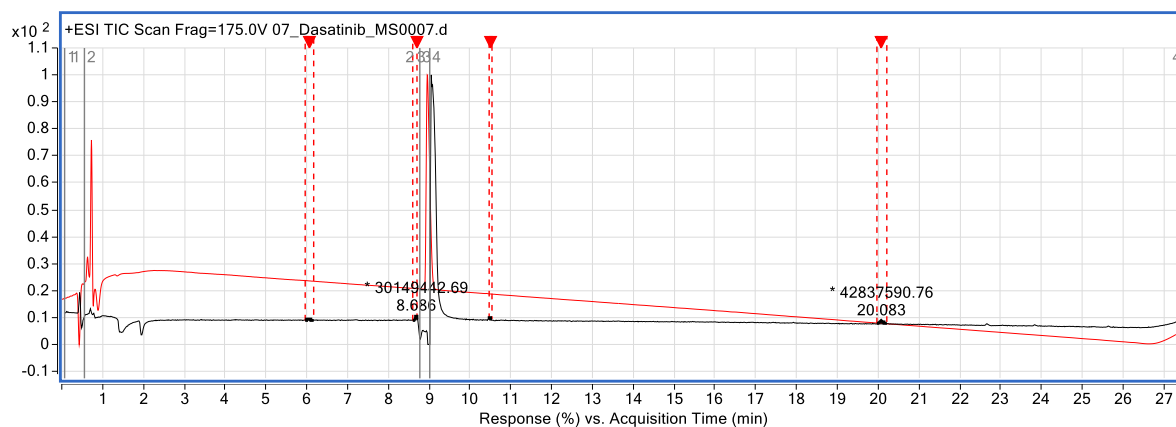


Slika D104. MS spekter uzorka dasatiniba koji tretiran s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 14,518-14,601 min)

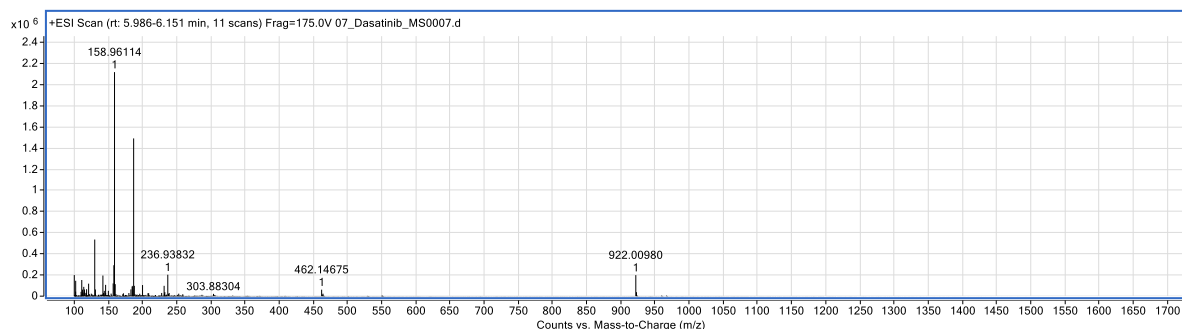


Slika D105. MS spekter uzorka dasatiniba koji tretiran s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 20.035-20.118 min)

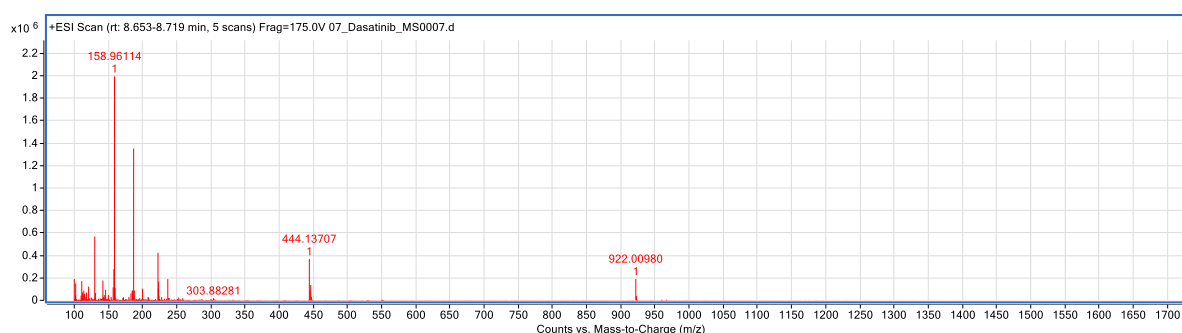
### 8.6.7. Rezultati LC-MS analize dasatiniba koji podvrgnut forsiranoj degradaciji pri povišenoj temperaturi ( 60°C )



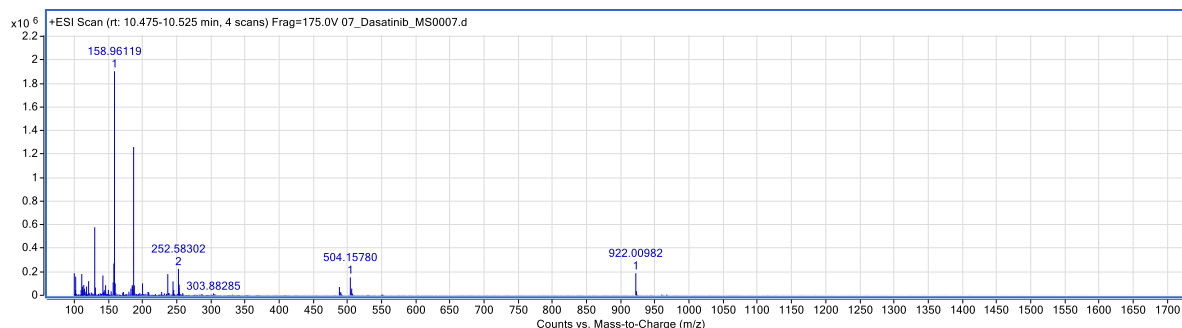
Slika D106. Rezultat LC-MS analize uzorka dasatiniba koji je tretiran pri povišenoj temperaturi ( 60 °C ) s označenim pikovima od interesa



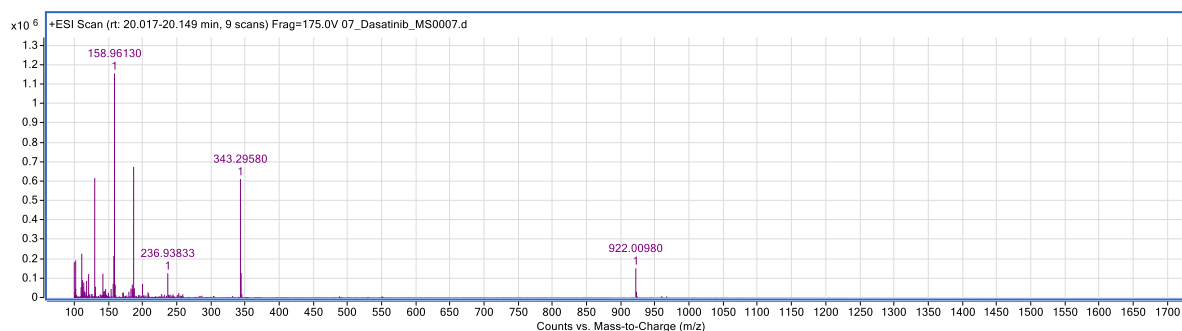
Slika D107. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran pri temperaturi od 60 °C (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 5,986-6,151 min)



Slika D108. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran pri temperaturi od 60°C (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 8,653-8,719 min)

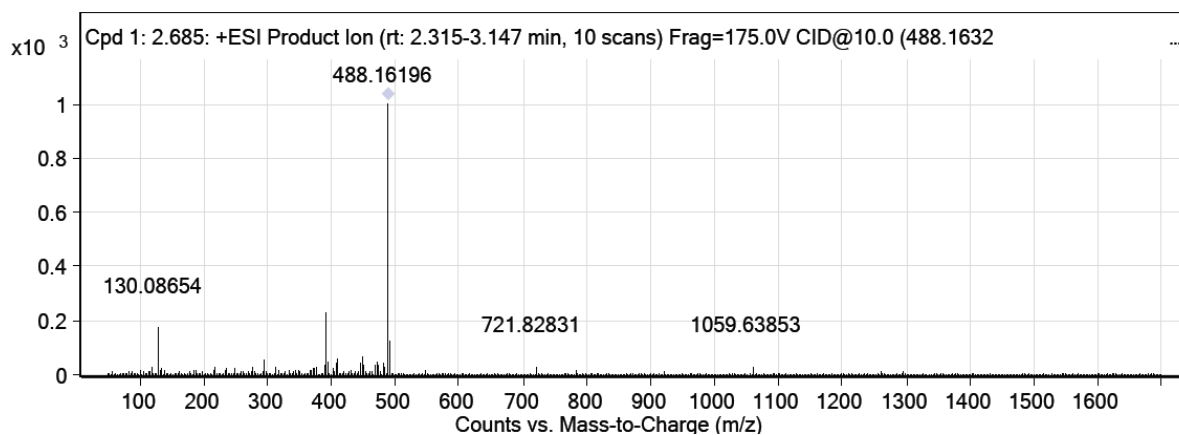
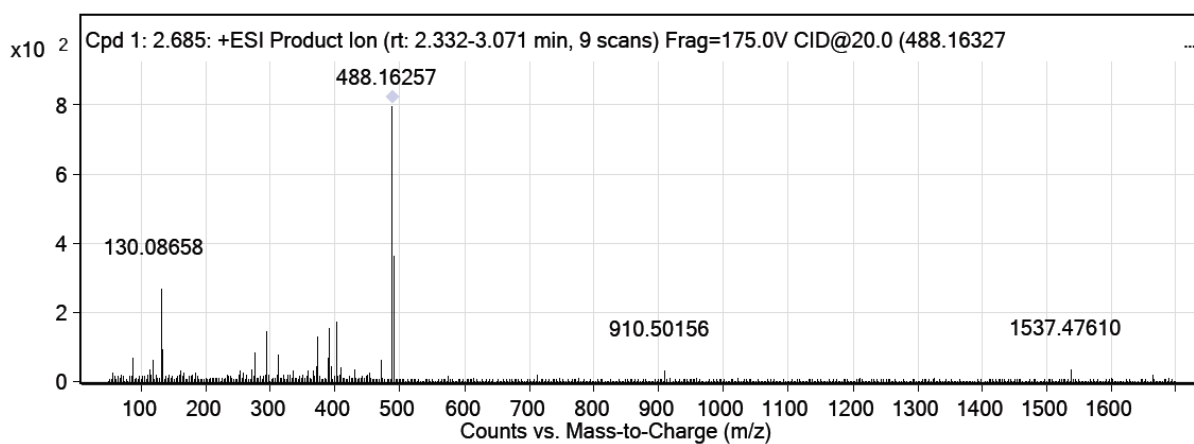
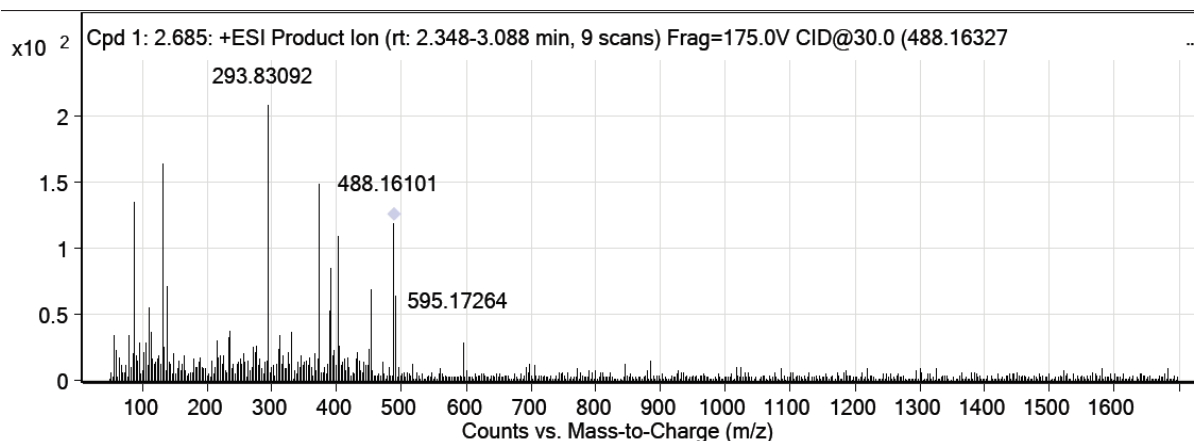


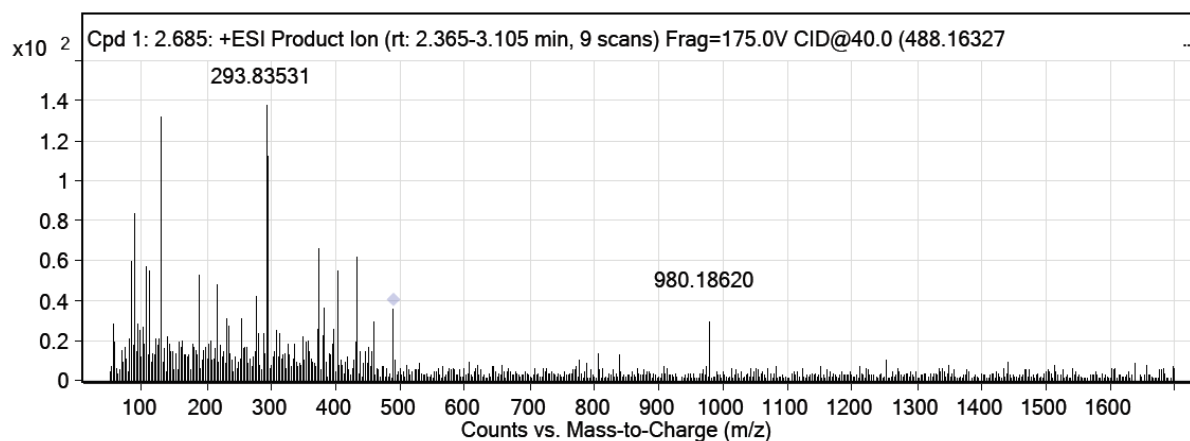
Slika D109. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran pri temperaturi od 60°C (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 10,475-10,525 min)



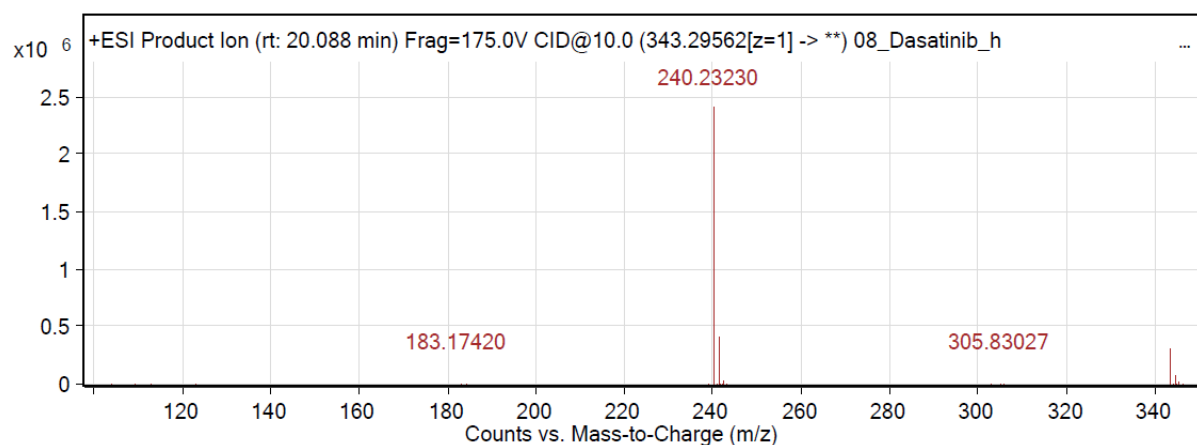
Slika D110. MS spektar uzorka dasatiniba koji tretiran pri temperaturi od 60°C (pik pri ukupnom vremenu zadržavanja 20,017-20,149 min)

## 8.6.8. Rezultati LC-MS/MS analize

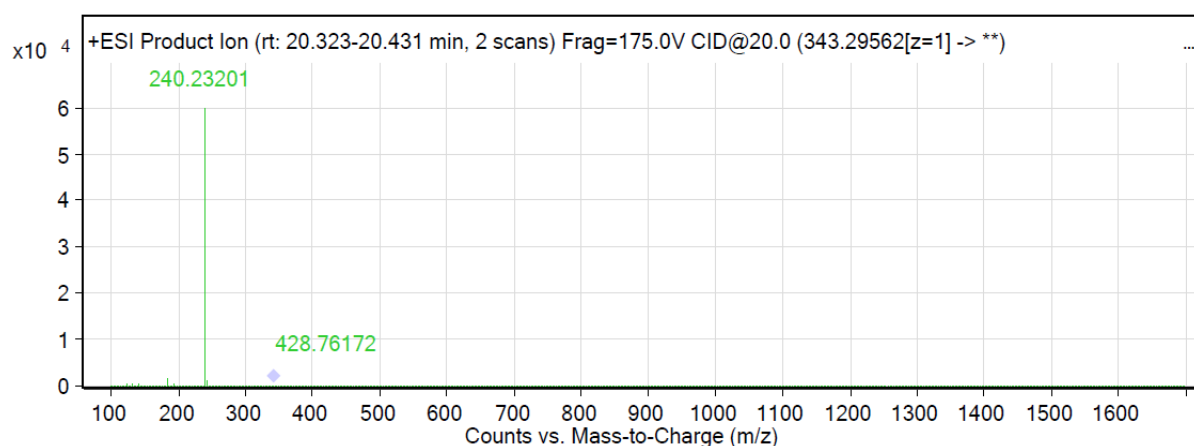
Slika D111. MS/MS spektar iona prekursora omjera  $m/z$  488,16327 koristeći kolizijsku energiju 10 eVSlika D112. MS/MS spektar iona prekursora omjera  $m/z$  488,16327 koristeći kolizijsku energiju 20 eVSlika D113. MS/MS spektar iona prekursora omjera  $m/z$  488,16327 koristeći kolizijsku energiju 30 eV



Slika D114. MS/MS spektar iona prekursora omjera  $m/z$  488,16327 koristeći kolizijsku energiju 40 eV

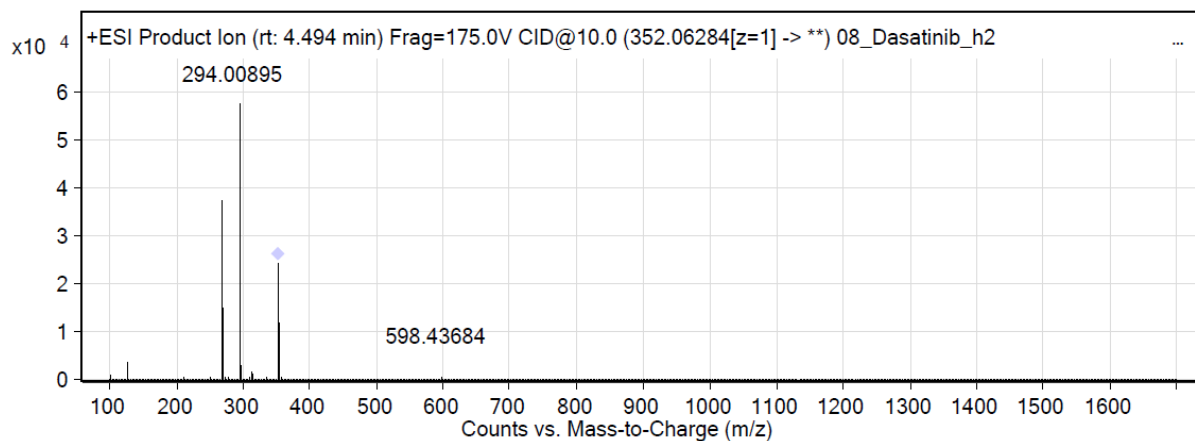


Slika D115. MS/MS spektar iona prekursora DP1 koristeći kolizijsku energiju 10 eV

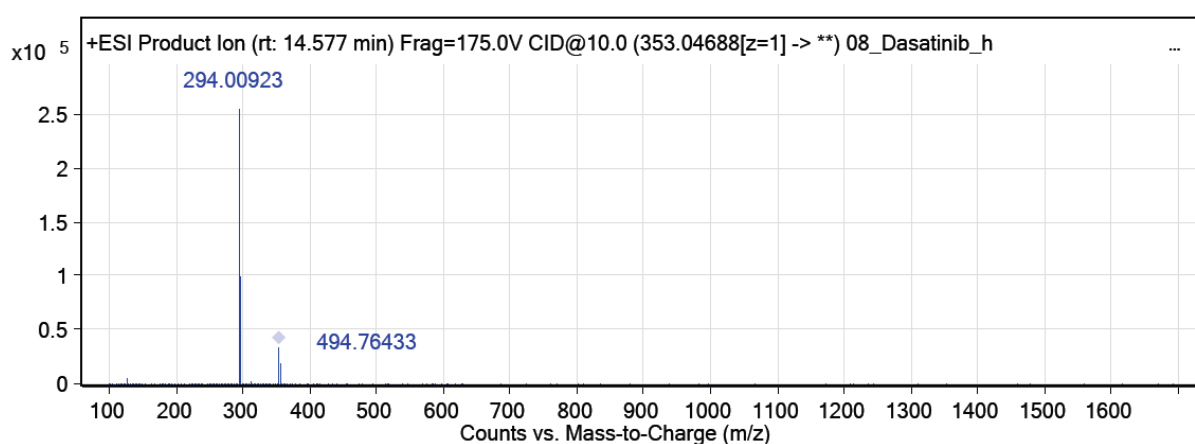


Slika D116. MS/MS spektar iona prekursora DP1 koristeći kolizijsku energiju 20 eV

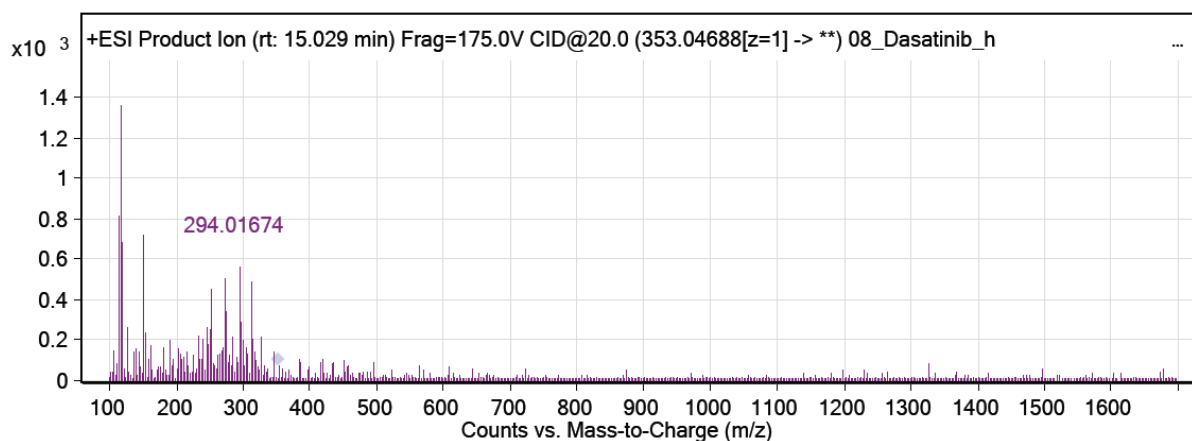




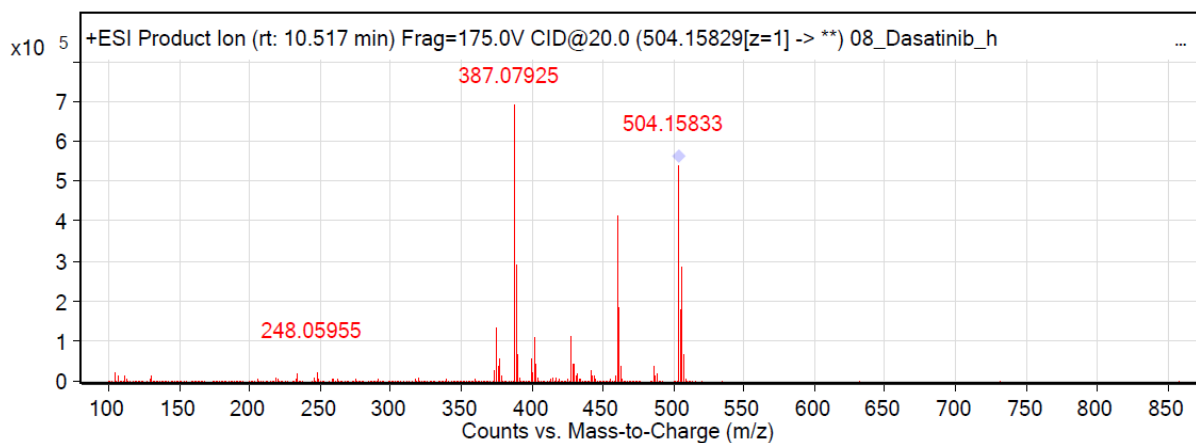
Slika D117. MS/MS spektar iona prekursora DP2 koristeći kolizijsku energiju 10 eV



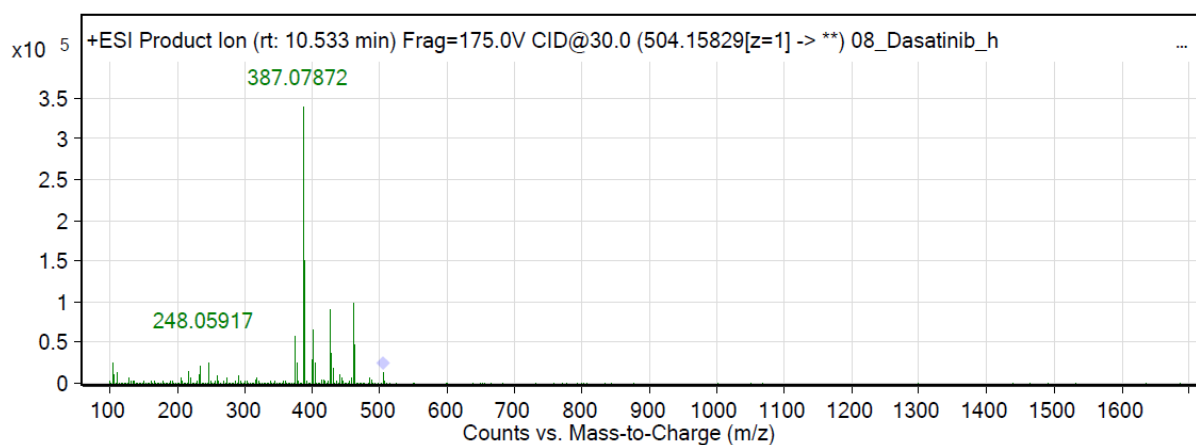
Slika D118. MS/MS spektar iona prekursora DP3 koristeći kolizijsku energiju 10 eV



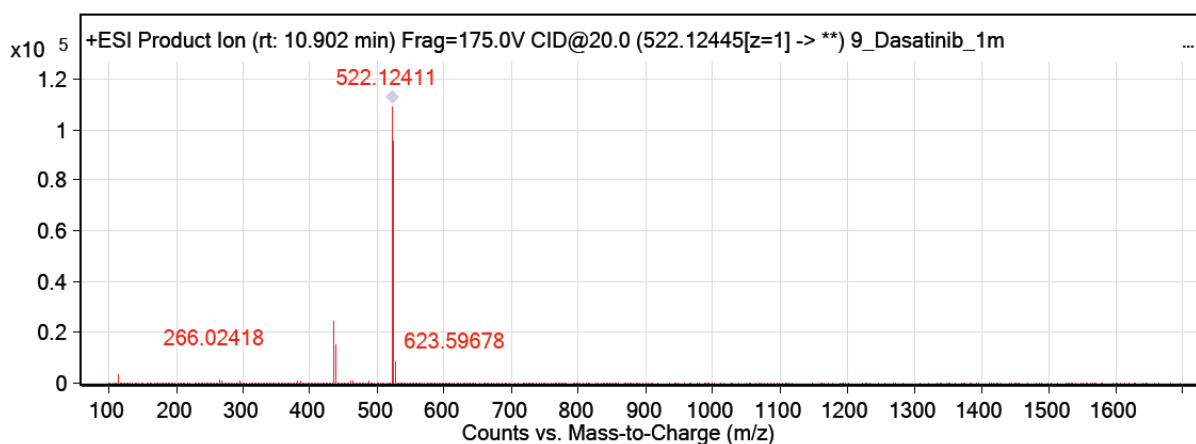
Slika D119. MS/MS spektar iona prekursora DP3 koristeći kolizijsku energiju 20 eV



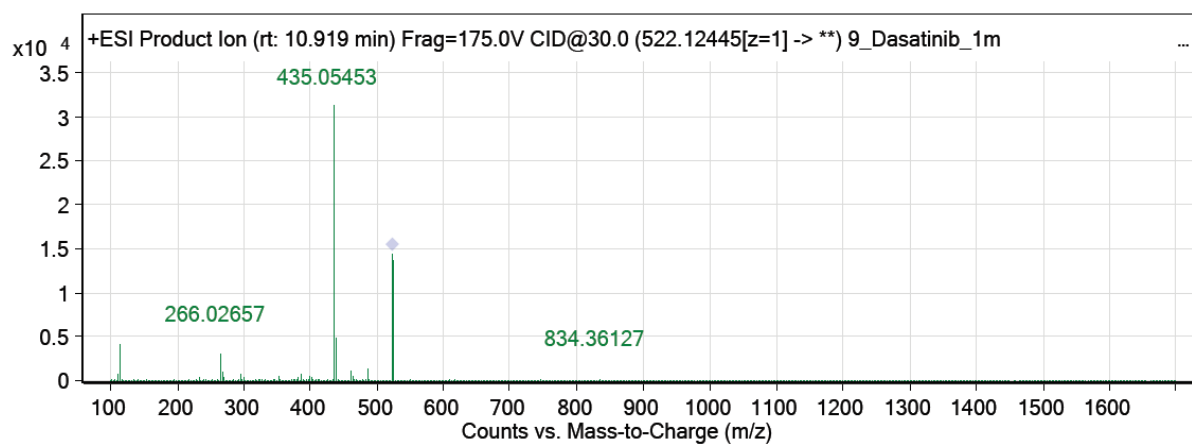
Slika D120. MS/MS spektar iona prekursora DP4 koristeći kolizijsku energiju 20 eV



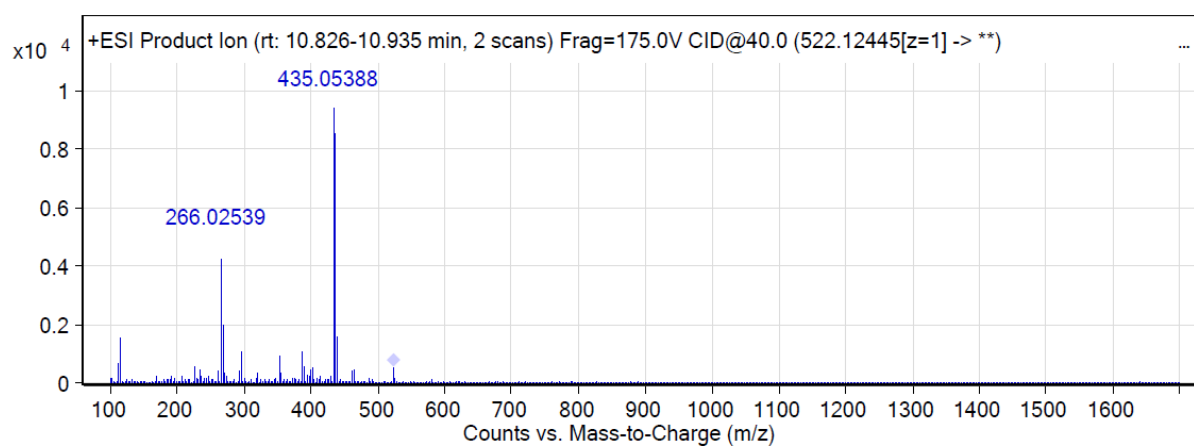
Slika D121. MS/MS spektar iona prekursora DP4 koristeći kolizijsku energiju 30 eV



Slika D122. MS/MS spektar iona prekursora DP5 koristeći kolizijsku energiju 20 eV



Slika D123. MS/MS spektar iona prekursora DP5 koristeći kolizijsku energiju 30 eV



Slika D124. MS/MS spektar iona prekursora DP5 koristeći kolizijsku energiju 40 eV

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Davor Šestan

Datum rođenja: 01. srpanj 1991.

Mjesto rođenja: Čakovec

### Obrazovanje

1998.–2006. Osnovna škola Osnovna škola Prelog, Prelog

2006.–2010. Srednja škola Srednja škola Prelog, Prelog

2010.–2015. Preddiplomski studij Kemija (preddiplomski studij), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Nagrade i priznanja

2017. Case Study Competition, Value Stream Mapping, Pliva, 3. mjesto

2016. Case Study Competition, Internet of things in tourism for T-mobile, 1. mjesto

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu