

# Identifikacija razgradnih produkata ceritiniba vezanim sustavom tekućinska kromatografija ultraviseoke djelotvornosti - tandemna spektrometrija masa

---

**Kovačević, Martina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:607270>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-03**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Martina Kovačević

**IDENTIFIKACIJA RAZGRADNIH  
PRODUKATA CERITINIBA VEZANIM  
SUSTAVOM TEKUĆINSKA  
KROMATOGRAFIJA ULTRAVISOKE  
DJELOTVORNOSTI - TANDEMNA  
SPEKTROMETRIJA MASA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u laboratoriju Analitike istraživanja i razvoja u PLIVA  
Hrvatska d.o.o., pod mentorstvom prof. dr. sc. Nives Galić i neposrednim voditeljstvom Mije  
Antolčić, mag. chem.

## Zahvale

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

*Hvala neposrednoj voditeljici rada, Miji Antolčić, mag. chem. na iznimnoj pomoći tijekom izrade rada. Hvala na svakom savjetu, ugodnoj i prijateljskoj atmosferi, pozitivnoj energiji i razumijevanju.*

*Hvala Mislavu Runji, dipl. chem. ing. na pruženoj prilici, svakom prijedlogu i savjetu tijekom izrade ovoga rada.*

*Hvala mojim roditeljima, Ani i Mijatu, te sestrama Katarini, Marini i Kristini što me pazite, volite i što ste moja istinska motivacija. Hvala vam na žrtvi i odricanju, na razumijevanju i podršci. Vjerovali ste u mene čak i kad sama nisam. Uz vas je život lakši i ljepši.*

*Hvala fra Ivici Vidaku, što ste prisutni u mom životu. Hvala na svakoj pomoći, podršci i savjetu. Vaše riječi uvijek nosim sa sobom kroz život. Hvala Vam na prijateljstvu.*

*Hvala mojim nećacima, Gabrieli, Ivi, Mateju, Mihaelu, Miji i Petru što ste moja velika radost i sreća. Hvala što me podsjećate da sitnice najviše raduju srce. Hvala što mi i u najtežim trenucima vratite osmijeh na lice.*

*Hvala mojim šogorima, Anti i Pavi, na svakom savjetu, nesebičnoj pomoći i bezuvjetnoj podršci. Hvala vam na svemu što činite za mene.*

*Hvala svim kolegama i prijateljima u Zagrebu. Posebno hvala Antoniji, Amandi, Borni, Karli, Martini i Snježani. Učinili ste da svaki ispit bude lakši i da studentski dani ostanu najljepša uspomena. Hvala na prijateljstvu, pomoći i smijehu kojeg pored vas nikada nije manjkalo.*

*Hvala mojim prijateljima, Gabrijeli, Ružici i Valtonu na razumijevanju, slušanju, savjetima i podršci. Hvala na sreći, smijehu i veselju koje uvijek donosite sa sobom.*

*Hvala vam svima što ste bili uz mene. Bez vas nikada ne bih uspjela.*

*Martina Kovačević*

# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Ceritinib .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Forsirana razgradnja.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Hidrolitički uvjeti .....	5
2.2.2. Oksidativni uvjeti .....	6
2.2.3. Fotokemijska razgradnja .....	6
2.2.4. Termička razgradnja.....	6
2.2.5. Forsirana razgradnja ceritiniba .....	7
<b>2.3. Kromatografija.....</b>	<b>8</b>
2.3.1. Kromatografski parametri .....	9
2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	11
2.3.3. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) .....	13
<b>2.4. Spektrometrija masa.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5. Vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS).</b>	<b>16</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Polazni materijali .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Oprema i instrumenti .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Priprema otapala i pokretne faze .....</b>	<b>18</b>
3.3.1. Priprema otapala .....	18
3.3.2. Priprema pokretne faze .....	18
<b>3.4. Priprema temeljne standardne otopine.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Priprema reagensa i uzoraka za studij forsirane razgradnje .....</b>	<b>19</b>
3.5.1. Priprava reagensa za forsiranu razgradnju .....	19
3.5.2. Priprava uzoraka za forsiranu razgradnju .....	20
3.5.3. Slijepa proba .....	22
<b>3.6. Uvjeti mjerenja sustavom UHPLC.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7. Uvjeti mjerenja sustavom 2D-LC-MS.....</b>	<b>24</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Rezultati forsirane razgradnje.....</b>	<b>25</b>

---

4.1.1. Rezultati forsirane razgradnje u oksidacijskim uvjetima .....	26
4.1.2. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti lužine.....	26
4.1.3. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti kiseline .....	28
<b>4.2. Identifikacija razgradnih produkata.....</b>	<b>30</b>
4.2.1. Identifikacija razgradnih produkata u oksidacijskim uvjetima.....	30
4.2.2. Identifikacija razgradnih produkata u bazičnim uvjetima .....	37
4.2.3. Identifikacija razgradnih produkata u kiselim uvjetima .....	44
<b>4.3. Rasprava rezultata dobivenih forsiranom razgradnjom i 2D-LC-MS analizom .....</b>	<b>47</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>49</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>50</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>52</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XIX</b>



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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### IDENTIFIKACIJA RAZGRADNIH PRODUKATA CERITINIBA VEZANIM SUSTAVOM TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI - TANDEMNA SPEKTROMETRIJA MASA

*Martina Kovačević*

Ceritinib je farmaceutik koji se koristi u liječenju specifičnog oblika tumora pluća. Djeluje kao inhibitor kinaze anaplastičnog limfoma. Degradacijski produkti su neželjene tvari koje mogu nastati tijekom proizvodnje ili skladištenjem lijeka. Mogu utjecati na učinkovitost lijekova, stoga je vrlo važno istražiti stabilnost lijeka i odrediti njegove razgradne produkte.

U ovom diplomskom radu korištena je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za odjeljivanje ceritiniba i razgradnih produkata nastalih procesom forsirane razgradnje u kiselom, lužnatom i oksidirajućem mediju. Vezani sustav tekućinske kromatografije spregnute s tandemnom spektrometrijom masa (LC-MS/MS) korišten je pri analizi razgradnih produkata. Na temelju nastalih fragmenata pretpostavljene su strukture 7 razgradnih produkata ceritiniba i predloženi odgovarajući fragmentacijski putovi.

(53 + XIX stranica, 35 slika, 9 tablica, 32 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: ceritinib, forsirana razgradnja, MS/MS, razgradni produkti, UHPLC metoda

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Neposredni voditelj: Mia Antolčić, mag. chem.

Ocjenitelji:

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

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2019.



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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION OF DEGRADATION PRODUCTS OF CERITINIB BY ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETRY

*Martina Kovačević*

Ceritinib is a pharmaceutical used to treat a specific type of lung cancer. This molecule acts as an inhibitor of anaplastic lymphoma kinase. Degradation products are unwanted compounds that can be developed during the manufacturing and storing of a drug. Development of these products can affect the efficacy of pharmaceuticals, therefore the examination of drug stability, and determination of its degradation products is very important.

In this diploma thesis degradation products were generated through force degradation study in acidic, basic and oxidizing media. Degradation products and ceritinib were separated by high performance liquid chromatography (UHPLC). Degradation products were analysed by LC-MS/MS hyphenated system. Based on the resulting fragments, structures of 7 degradation products were proposed, as well as the corresponding fragmentation pathways.

(53 + XIX pages, 35 figures, 9 tables, 32 references, original in croatian)

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

Keywords: ceritinib, degradation products, forced degradation, MS/MS, UHPLC method

Mentor: Dr. Nives Galić, Professor  
Assistant mentor: Mia Antolčić, mag. chem.

Reviewers:

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

Date of exam: 21<sup>st</sup> of February 2019.



## § 1. UVOD

Ispitivanje stabilnosti farmaceutskih molekula vrlo je važan proces budući da stabilnost utječe na kvalitetu, sigurnost i učinkovitost lijekova.<sup>1</sup> Stabilnost farmaceutskog proizvoda definira se kao vremenski period tijekom kojeg lijek zadržava istovjetna svojstva i osobine koje je imao u vrijeme proizvodnje.<sup>2</sup> Sigurnost lijekova određena je farmakološko-toksikološkim profilom same aktivne farmaceutske tvari, pri čemu se najviše pažnje daje nepoželjnim svojstvima uzrokovanih onečišćenjima i razgradnim produktima koji mogu smanjiti kvalitetu i sigurnost lijeka. Onečišćenja i razgradni produkti su tvari koji uz djelatnu tvar mogu nastati u procesu proizvodnje lijeka ili njegovom razgradnjom. U svrhu osiguravanja kvalitete i sigurnosti proizvoda, važno je odrediti i identificirati onečišćenja i razgradne produkte, koji su prisutni u djelatnoj tvari i u gotovom farmaceutskom proizvodu. Adekvatna ispitivanja moguće je provesti praćenjem promjene kvalitete aktivne tvari i lijeka podvrgavanjem aktivne tvari ili lijeka ekstremnim kemijskim i okolišnim uvjetima, odnosno procesom forsirane razgradnje.<sup>3,4</sup>

Ceritinib je aktivna farmaceutska tvar lijeka Zykadia<sup>®</sup>, koji se koristi u liječenju bolesnika s metastaziranim karcinomom pluća nemalih stanica pozitivnih na kinaze anaplastičnog limfoma. Ceritinib djeluje kao visokoselektivan inhibitor kinaze anaplastičnog limfoma.<sup>5</sup> Za određivanje ceritiniba i njegovih razgradnih produkata u gotovom farmaceutskom proizvodu koriste se metode tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa.<sup>6</sup>

U ovom radu identificirani su razgradni produkti ceritiniba nastali procesom forsirane razgradnje. Otopina ceritiniba podvrgnuta je utjecaju kiseline, lužine i vodikovog peroksida pri različitim temperaturama i vremenima zagrijavanja. Uzorci su prvotno analizirani metodom UHPLC. Uzorci kod kojih je došlo do razgradnje podvrgnuti su analizi 2D-LC-MS u svrhu identifikacije razgradnih produkata. Prema dobivenim masama pretpostavljene su moguće strukture razgradnih produkata nastalih forsiranom razgradnjom te njihova fragmentacija.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

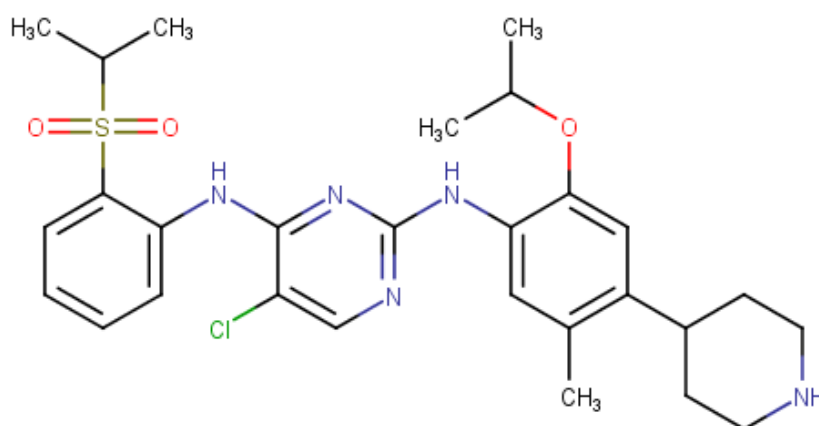
### 2.1. Ceritinib

Ceritinib je aktivna farmaceutska tvar lijeka Zykadia<sup>®</sup>, koji se koristi u liječenju bolesnika s metastaziranim karcinomom pluća nemalih stanica (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) pozitivnih na kinaze anaplastičnog limfoma (engl. *Anaplastic lymphoma kinase*, ALK).<sup>5,7</sup> Karcinom NSCLC najučestaliji je tip raka i najčešće se dijagnosticira u uznapredovalim fazama.<sup>7</sup> Enzim ALK je transmembranska tirozin-kinaza za koju se pretpostavlja da je aktivna u ranom razvoju središnjeg i perifernog živčanog sustava, dok se njena aktivnost u zrelim ljudskim stanicama gasi.<sup>8</sup> Kod približno 5 % bolesnika s karcinomom NSCLC detektirane su mutacije na genu *ALK*. *ALK* je onkogen koji se aktivacijom eksprimira u proteine koji potiču proliferaciju stanice.<sup>8-10</sup>

Crizotinib je prvi inhibitor tirozin-kinaze ALK, te je od 2011. godine korišten kao prva generacija standardne terapije za pacijente s ALK-pozitivnim NSCLC.<sup>11</sup> Međutim, zbog stvaranja rezistentnosti na crizotinib nakon približno 10 mjeseci korištenja lijeka, kod pacijenata su zabilježene mnoge metastaze, najčešće na središnjem živčanom sustavu.<sup>8</sup> Ceritinib, selektivni inhibitor ALK, pokazao je dvadeset puta veću potentnost u odnosu na crizotinib te aktivnost protiv najučestalijih mutacija koje su stvarale rezistenciju na crizotinib.<sup>7-9</sup>

Molekulska formula ceritiniba je  $C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$ , koji se prema pravilima Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) naziva 5-klor-N2-[5-metil-4-(piperidin-4-il)-2-(propan-2-iloksi)fenil]-N4-[2-(propan-2-sulfonyl)fenil]pirimidin-2,4-diamin.

Molarna masa ceritiniba iznosi 558,138 g mol<sup>-1</sup>.<sup>7</sup> Kemijska struktura prikazana je na slici 1.



Slika 1. Struktura ceritiniba

Ceritinib djeluje kao visokoselektivan inhibitor enzima ALK. Inhibira autofosforilaciju proteina ALK, fosforilacije nizvodnih signalnih proteina posredovane enzimom ALK, te proliferaciju stanica tumora pozitivnih na ALK u *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima.<sup>5,7</sup>

Status ALK-pozitivnog karcinoma NSCLC potrebno je utvrditi prije uvođenja terapije lijekom Zykadia<sup>®</sup>, za što je potrebno napraviti specifičan test, odobren od strane Organizacije za hranu i lijekove (engl. *Food And Drug Administration*, FDA). Nakon provođenja točnog i validiranog testa, te utvrđivanja statusa ALK-pozitivnog NSCLC-a uvodi se terapija Zykadiom<sup>®</sup>. Preporučena dnevna doza je 750 mg.<sup>5,10</sup>

Maksimalne koncentracije ceritiniba u plazmi postižu se 4 - 6 sati nakon primjene lijeka. Vrijeme poluživota ( $T_{1/2}$ ) ceritiniba u plazmi nakon jednokratne doze od 750 mg je u rasponu od 31 do 41 sata. Topljivost ceritiniba u vodi iznosi  $0,00222 \text{ mg mL}^{-1}$ , a smanjuje se povećavanjem vrijednosti pH.<sup>10</sup> Stoga tvari koje smanjuju kiselost (primjerice, inhibitori protonске pumpe) mogu promijeniti topljivost ceritiniba i smanjiti njegovu bioraspoloživost.<sup>5,10</sup>

## 2.2. Forsirana razgradnja

Stabilnost farmaceutskog proizvoda definira se kao vremenski period tijekom kojeg lijek zadržava istovjetna svojstva i osobine koja je imao u vrijeme proizvodnje.<sup>2</sup> Sigurnost lijekova određena je farmakološko-toksikološkim profilom same aktivne farmaceutske tvari. Pri analizi aktivne tvari posebna pažnja posvećuje se određivanju nepoželjnih svojstava uzrokovanim onečišćenjima.<sup>3</sup> Onečišćenje je, prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonisation, ICH*), svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita ili pomoćna tvar.<sup>12</sup> Stoga u svrhu osiguravanja kvalitete i sigurnosti proizvoda, FDA zahtijeva testiranja stabilnosti lijeka praćenjem promjene kvalitete aktivne tvari i lijeka u vremenu pod utjecajem različitih okolišnih faktora.<sup>3</sup> Postoje različiti procesi ispitivanja stabilnosti: dugoročna, intermedijarna, ubrzana, te procesi forsirane razgradnje.<sup>1,13,14</sup> Poznavanje stabilnosti molekule pomaže pri odabiru ispravnog pakiranja lijeka, prikladne formulacije, kao i pružanju odgovarajućih uvjeta skladištenja i predviđanju roka valjanosti.<sup>3</sup>

Forsirana razgradnja (engl. *Forced Degradation*) je proces podvrgavanja aktivne tvari ili gotovog lijeka ekstremnim kemijskim i okolišnim uvjetima u svrhu ispitivanja razine razgradnje i razgradnih produktata.<sup>4</sup> Razgradni produkt se prema smjernicama ICH za ispitivanje nečistoća u novim farmaceutskim proizvodima definira kao onečišćenje nastalo kao posljedica kemijske promjene aktivne tvari ili lijeka nastale tijekom proizvodnje i skladištenja u reakciji s vodom ili pomoćnom tvari iz lijeka, pod utjecajem svjetlosti, topline ili promjenom vrijednosti pH.<sup>12</sup> Forsirana razgradnja provodi se zbog dobivanja informacija o stabilnosti aktivne farmaceutske tvari i gotovog lijeka pri različitim uvjetima testiranja. Na temelju rezultata forsirane razgradnje moguće je identificirati razgradne produkte nastale iz aktivne farmaceutske tvari ili gotovog lijeka, odrediti njihove strukture te otkriti mehanizme razgradnje kao što su hidroliza, oksidacija, termoliza ili fotoliza do kojih može doći prilikom razvojne faze lijeka, te na taj način doprinijeti razvijanju stabilnije formulacije.<sup>3,4</sup>

Informacije o onečišćenjima i mehanizmima razgradnje pružaju osnovu za razvoj analitičke metode koja se koristi za kontrolu kvalitete i praćenje stabilnosti aktivne tvari i gotovog farmaceutika, odnosno metode za praćenje stabilnosti (engl. *Stability Indicating Method, SIM*). Cilj forsirane razgradnje je generiranje svih potencijalnih onečišćenja koja mogu nastati nepravilnim skladištenjem proizvoda. Forsiranom razgradnjom moguće je dobiti osnovne

informacije o stabilnosti aktivne tvari i lijeka u vrlo kratkom razdoblju (do dva tjedna), te je stoga važan dio razvoja analitičke metode za praćenje stabilnosti lijeka.<sup>4,13</sup>

Prilikom provođenja forsirane razgradnje uzorci se izlažu visokoj temperaturi, svjetlosti i vlazi, a ispituje se i njihova osjetljivost na oksidanse, kiseline i lužine. Eksperimentalni protokol forsirane razgradnje ovisi o samoj prirodi aktivne tvari i pomoćnih tvari koje ulaze u sastav konačnog farmaceutika. Izbor uvjeta forsirane razgradnje trebao bi biti konzistentan s raspadanjem proizvoda pod normalnim uvjetima proizvodnje, skladištenja i korištenja.<sup>4,15</sup> Prejaki uvjeti razgradnje mogu dovesti do formiranja sekundarnih razgradnih produkata, koji nisu uobičajeni u životnom ciklusu proizvoda, stoga pri izboru uvjeta treba pratiti smjernice koje preporučuje Međunarodna konferencija o harmonizaciji (ICH). Prihvatljive granice razgradnje kreću se u rasponu 5 – 20 %. Smatra se da je razgradnja od 10 % optimalna za razvoj analitičke metode.<sup>3,4,14</sup>

Najčešće se za ispitivanje koristi otopina uzorka ili uzorak u izvornom obliku. Koncentracija tvari koja se ispituje nije definirana regulatornim smjernicama. Međutim, preporučeno je da koncentracija iznosi 1 mg mL<sup>-1</sup>, ili koncentracije u kojoj se aktivna tvar ili lijek očekuju u konačnoj formulaciji.<sup>3</sup>

### 2.2.1. Hidrolitički uvjeti

Hidroliza je najčešća kemijska reakcija razgradnje u širokom rasponu vrijednosti pH. Uključuje razgradnju kemijskog spoja reakcijom s vodom. Ispitivanje razgradnje lijeka uslijed hidrolize provodi se u kiselom i bazičnom mediju. Izbor vrste i koncentracije baze ili kiseline ovisi o stabilnosti aktivne farmaceutske tvari ili gotovog lijeka. Kao prikladni reagensi za kiselu hidrolizu predloženi su klorovodična kiselina ili sumporna kiselina (koncentracije u rasponu 0,1 – 1 mol L<sup>-1</sup>), te natrijev hidroksid i kalijev hidroksid (koncentracije u rasponu 0,1 – 1 mol L<sup>-1</sup>) za baznu hidrolizu. Ispitivanja forsiranom razgradnjom obično započinju pri sobnoj temperaturi, a ukoliko pri tim uvjetima ne dolazi do razgradnje, primjenjuju se više temperature (50 °C – 70 °C). Ovakve vrste ispitivanja obično traju do 7 dana. Otopina razgrađenog uzorka potom se neutralizira odgovarajućom kiselinom ili bazom kako ne bi došlo do daljnje razgradnje.<sup>3,4,16</sup>

### 2.2.2. Oksidativni uvjeti

Prilikom ispitivanja forsirane razgradnje u oksidativnim uvjetima najčešće se kao oksidirajuće sredstvo koristi vodikov peroksid, ali i drugi oksidirajući agensi kao što su kisik, metalni ioni ili radikali. Izbor oksidacijskog sredstva i njegova koncentracija ovise o prirodi aktivne farmaceutske tvari. Smatra se kako primjena 0,1 – 3 % otopine vodikovog peroksida pri neutralnom pH i sobnoj temperaturi, u vremenu do najviše 7 dana, daju optimalan stupanj razgradnje. Uzorci se analiziraju u različitim vremenskim intervalima kako bi se odredio stupanj razgradnje.<sup>3,16</sup>

### 2.2.3. Fotokemijska razgradnja

Fotokemijska ispitivanja bitan su dio studija forsirane razgradnje kako bi se ustanovilo da izloženost lijekova svjetlu ne rezultira neželjenim promjenama, naročito ukoliko je riječ o fotolabilnim molekulama. Provode se izlaganjem uzorka utjecaju ultraljubičastog ili vidljivog dijela elektromagnetskog zračenja. Minimalna jačina svjetlosti koja se primjenjuje prilikom ove vrste ispitivanja je 1,2 milijuna lux sati ( $200 \text{ Wh m}^{-2}$ ). Nakon ispitivanja uzorcima se određuju promjene fizikalnih karakteristika (izgled, bistrina, boja), te sadržaj aktivne tvari i onečišćenja. Prilikom fotokemijskih ispitivanja u uzorcima najčešće dolazi do oksidacije mehanizmom slobodnih radikala.<sup>3,13,16</sup>

### 2.2.4. Termička razgradnja

Ispitivanja termičke razgradnje provode se izlaganjem krute tvari ili otopine povišenim temperaturama. Ukoliko se ispituje stabilnost krutih tvari, uzorci aktivne farmaceutske tvari ili gotovog lijeka podvrgavaju se suhim i vlažnim uvjetima povišene temperature. Utjecaj temperature obično se prati pri temperaturi koja je za  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  iznad temperature za praćenje stabilnosti tvari pri studiju ubrzanog uvjeta čuvanja tvari (najčešće se radi o temperaturama u rasponu  $40 - 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), te vlažnosti iznad 75 % u trajanju 1 – 2 mjeseca. Ispitivanja se provode i pri višim temperaturama, ali tada uključuju kraći vremenski period. Svaki mehanizam razgradnje koji se ubrzava pod utjecajem povišenih temperatura može se opisati kao termolitički put razgradnje. Najčešće reakcije koje se odvijaju prilikom termičke razgradnje su dehidratacija, dekarboksilacija, izomerizacija i dimerizacija.<sup>3,13,16</sup>

### 2.2.5. Forsirana razgradnja ceritiniba

S. Kapavarapu i suradnici<sup>6</sup> razvili su i validirali brzu i učinkovitu stabilitetno - indikativnu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza za određivanje ceritiniba prisutnog u gotovom farmaceutskom proizvodu. Pri tome je korištena BDS C18 kolona i izokratno eluiranje. Kao pokretna faza korišten je pufer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  koncentracije  $c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$  i acetonitril u omjeru 55 : 45. Temperatura kolone iznosila je  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a vrijeme trajanja analize 6 minuta. Protok je postavljen na  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , te je korišten UV detektor pri valnoj duljini od 320 nm. Vrijeme zadržavanja ceritiniba iznosilo je 2,539 minuta.

Metoda je validirana prema smjernicama ICH uz provjeru točnosti, preciznosti, linearnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, robustnost i parametara stabilnosti. Optimizirana metoda pokazala se specifična, robustna i točna za kvalitativnu kontrolu ceritiniba u gotovom farmaceutskom proizvodu. Kako bi se dokazala primjenjivost metode za stabilitetna ispitivanja, stabilnost ceritiniba ispitana je pri različitim stresnim uvjetima metodom forsirane razgradnje, što se pokazalo uspješnim.

Forsirana razgradnja djelatne tvari provedena je pri različitim uvjetima. Testirana je stabilnost izlaganjem ceritiniba neutralnim uvjetima (refluks u vodi 6 sati pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ), utjecaju svjetlosti (7 dana pri  $200 \text{ W m}^{-2}$ ) i toplini (zagrijavanje 6 sati pri  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ ), te u prisutnosti: HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ , NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ , 20 % otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  – sve uz 30 minuta zagrijavanja pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Rezultati ispitivanja pokazali su kako je uz primjenu otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  došlo do nastajanja razgradnog produkta s relativnim vremenom zadržavanja 0,81 minuta. Pri kiseljoj hidrolizi uočen je razgradni produkt s relativnim vremenom zadržavanja 1,16 minuta, dok je pri baznoj hidrolizi došlo do nastajanja razgradnog produkata s relativnim vremenom zadržavanja 1,37 minuta. Nastali razgradni produkti nisu identificirani.

### 2.3. Kromatografija

Kromatografija je analitička metoda odjeljivanja sastojaka ispitivanog uzorka između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Pokretna faza nosi komponente uzorka kroz nepokretnu fazu, a njihovo odjeljivanje temelji se na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz kromatografsku kolonu. Do razlika u brzini kretanja dolazi zbog različite interakcije komponenti smjese s nepokretnom, odnosno nepokretnom i pokretnom fazom. Kromatografske tehnike su najčešće korištene tehnike u analitici lijekova, gdje se primjenjuju za odjeljivanje, identifikaciju i određivanje sadržaja multikomponentnih uzoraka. Farmaceutska primjena najčešće uključuje kontrolu stabilnosti lijeka, kontrolu kvalitete te ispitivanja topljivosti.<sup>17-19</sup>

Postoje različiti kriteriji za podjelu kromatografskih metoda. Uobičajene su tri podjele: prema obliku kromatografske podloge, prema agregatnom stanju pokretne faze, te prema mehanizmu odvajanja. Prema obliku kromatografske podloge kromatografske tehnike se mogu podijeliti na kolonsku i plošnu kromatografiju. Kromatografske tehnike se prema agregatnom stanju pokretne faze mogu podijeliti na tekućinsku kromatografiju (engl. *Liquid Chromatography*, LC) u kojoj je pokretna faza tekućina, plinsku kromatografiju (engl. *Gas Chromatography*, GC) u kojoj je pokretna faza plin, te fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SCF) u kojoj je pokretna faza fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka.<sup>19</sup>

Prema mehanizmu odvajanja kromatografske tehnike možemo podijeliti na adsorpcijsku kromatografiju (engl. *Adsorption Chromatography*), razdjelnu kromatografiju (engl. *Partition Chromatography*), ionsko - izmjenjivačku kromatografiju (engl. *Ion - Exchange Chromatography*), kromatografiju isključenjem (engl. *Exclusion Chromatography*) te afinitetnu kromatografiju (engl. *Affinity Chromatography*) čiji su principi odvajanja opisani u tablici 1.<sup>19</sup>



Tablica 1. Podjela kromatografskih metoda prema mehanizmu odvajanja

Vrsta kromatografske tehnike	Princip odvajanja
Adsorpcijska kromatografija	Različita adsorpcija sastojaka uzorka na površini čvrstog adsorbensa
Razdjelna kromatografija	Različita topljivost sastojaka uzorka u pokretnoj i nepokretnoj fazi (LC)
Ionsko - izmjenjivačka kromatografija	Različit afinitet sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni
Kromatografija isključenjem	Razlika u veličini, obliku ili naboju čestica
Afinitetna kromatografija	Specifična biološka interakcija između analita i liganda na nepokretnoj fazi

### 2.3.1. Kromatografski parametri

Krajnji rezultat svake kromatografske analize je kromatogram. Kromatogram je grafički prikaz odziva detektora u ovisnosti o vremenu ili volumenu eluiranja. Položaj kromatografskog pika na vremenskoj osi pomaže pri identifikaciji uzorka, dok površina ispod pika omogućava određivanje količine svakog pojedinog sastojka.<sup>20</sup>

Kromatografske krivulje karakterizirane su vremenom zadržavanja ( $t_R$ ) i širinom kromatografske krivulje na polovini visine ( $w_h$ ). Vrijeme zadržavanja predstavlja vrijeme u kojem se tvar eluira sa stupca. U praksi je često korišteno relativno vrijeme zadržavanja ( $r_R$ ) koje se računa prema jednadžbi (1), te pokazuje omjer vremena zadržavanja analita od interesa u odnosu na vrijeme zadržavanja standarda.<sup>21-23</sup>

$$r_R = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (1)$$

Kako bi kromatografska analiza bila uspješna, važna je mogućnost dobrog razlučivanja kromatografskih pikova. Razlučivanje ( $R_s$ ) predstavlja mjeru efikasnosti odjeljivanja dvaju spojeva. Razlučivanje je bolje što je vrijednost  $R_s$  koja se određuje prema jednadžbi (2) veća.<sup>20,21</sup>

$$R_s = \frac{2\Delta t}{(w_1 + w_2)} \quad (2)$$

U jednadžbi  $R_s$  predstavlja razlučivanje,  $\Delta t$  razliku vremena zadržavanja između dvaju susjednih pikova, dok  $(w_1 + w_2)$  označava sumu njihovih širina pri osnovici. Razlučivanje ovisi o faktoru zadržavanja ( $k$ ), faktoru razdvajanja ( $\alpha$ ) i broju teorijskih tavana ( $N$ ).<sup>19-21</sup>

Faktor zadržavanja ( $k$ ) pokazuje koliko se dulje zadržava spoj na koloni u odnosu na pretpostavku da nema interakcije s nepokretnom fazom. Definiran je prema jednadžbi (3).

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (3)$$

pri čemu  $t_R$  predstavlja vrijeme zadržavanja analita na koloni i karakteristično je za pojedinu tvar, dok  $t_M$  predstavlja zadržano vrijeme pokretne faze, odnosno vrijeme zadržavanja komponente koja ne stvara interakcije s nepokretnom fazom. Faktor zadržavanja može se mijenjati promjenom sastava pokretne faze u tekućinskoj, odnosno promjenom temperature u plinskoj kromatografiji.<sup>20-22</sup>

Faktor razdvajanja je mjera selektivnosti kromatografskog sustava za dva različita analita, a ovisi o interakciji spoja sa stacionarnom fazom. Moguće ga je definirati kao omjer faktora zadržavanja dva sastojaka ispitivanog uzorka, što je prikazano jednadžbom (4). Predstavlja mjeru relativnog zadržavanja odjeljivanih sastojaka.<sup>20</sup>

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (4)$$

U jednadžbi  $t'_{Rx}$  označava prilagođeno vrijeme zadržavanja, odnosno razliku između vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja nezadržavanog sastojka. Na faktor razdvajanja utječu priroda otapala, pH-vrijednost pokretne faze te priroda nepokretne faze.<sup>20,21</sup>

Djelotvornost kromatografske kolone izražava se brojem teorijskih tavana ( $N$ ). Broj teorijskih tavana predstavlja broj pseudoravnoteža, odnosno broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze i računa se prema jednadžbi (5).

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (5)$$

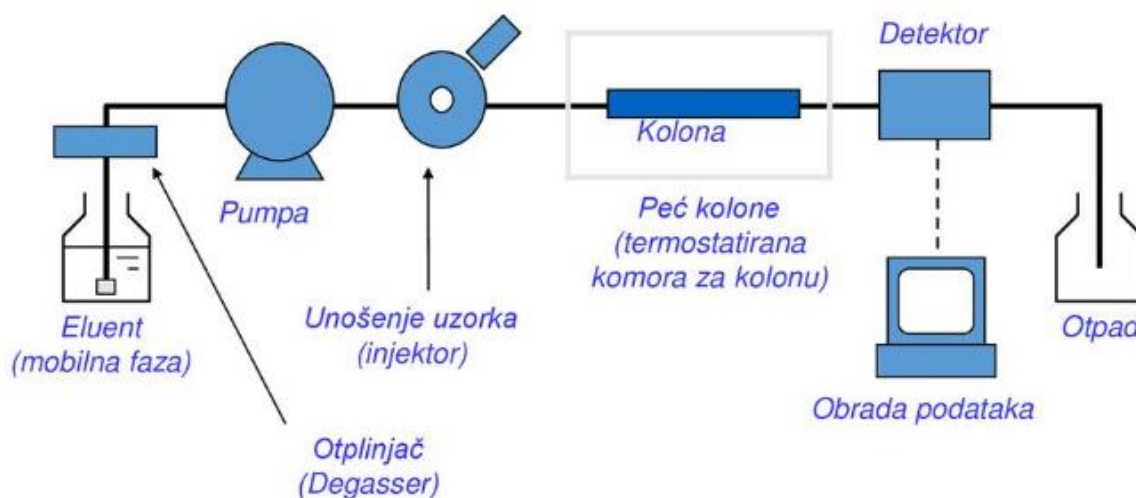
gdje  $N$  predstavlja broj teorijskih tavana,  $t_R$  vrijeme zadržavanja analita, a  $w_b$  širinu pika pri osnovici kromatografske krivulje. Djelotvornost kromatografske kolone se povećava s brojem teorijskih tavana.<sup>19,20</sup>

Tijekom cijelog kromatografskog procesa sastojci smjese su u dinamičkoj ravnoteži između pokretne i nepokretne faze. Dinamička ravnoteža narušava se zbog gibanja pokretne faze. Difundiranje molekula odjeljivanih sastojaka u pore kromatografskog punila dovodi do širenja vrpci. Kako bi se spriječilo širenje vrpci, koriste se čestice manjeg promjera te kolone različitih dimenzija. Smanjenjem promjera čestica punila postiže se bolja sposobnost razlučivanja i određivanja komponenti smjese. Zbog korištenja čestica malih promjera, potrebno je koristiti veće tlakove, te su se stoga razvile tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.<sup>17,21,22</sup>

### 2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Najčešće korištena separacijska tehnika je tekućinska kromatografija, koja se koristi za odjeljivanje otopljenih tvari. S obzirom na polarnost nepokretne faze, može se podijeliti na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. Kromatografija normalnih faza sadrži polarnu nepokretnu fazu i nepolarnu pokretnu fazu, dok kromatografija obrnutih faza sadrži pokretnu fazu polarniju od nepokretne.<sup>19,21,22</sup>

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) napredna je tehnika kolonske tekućinske kromatografije. Koristi se za separaciju, identifikaciju i kvantifikaciju svakog sastojka smjese. Budući da pokretna faza s uzorkom kroz kolonu prolazi pod visokim tlakom (do 400 atm), ova tehnika poznata je i kao tekućinska kromatografija visokog tlaka.<sup>17</sup> Za postizanje visokog tlaka kod HPLC potrebna je složenija oprema u odnosu na običnu tekućinsku kromatografiju. HPLC se sastoji od sustava za dovođenje pokretne faze, sustava za uvođenje uzorka, kućišta za kolonu, detektora te sustava za obradu podataka.

Slika 2. Dijelovi HPLC kromatografa<sup>32</sup>

Sustav za dovođenje pokretne faze, koji je cjevčicama povezan s crpnim sustavom, sastoji se od spremnika pokretne faze (1 – 4 kanala) koji služe za skladištenje otapala iz kojega crpka kontinuirano vuče određeni volumen određenog otapala. Crpke (samostojeće, binarne ili kvaterne) omogućavaju konstantan protok pokretne faze u sustavu i rade pri visokim tlakovima. Za pokretnu fazu koriste se otapala visoke čistoće, bez prisustva otopljenih plinova ili suspendiranih čestica. Sastav pokretne faze tijekom ispiranja može biti stalan (izokratno eluiranje) ili se može kontinuirano mijenjati tijekom ispiranja (gradijentno eluiranje).<sup>17,19,20</sup> Pokretna faza treba biti kompatibilna s analitom, razgradnim produktom i potencijalnim onečišćenjima.<sup>3</sup>

Injektor služi za unos uzorka. Sastoji se od ventila, automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*) koji može biti termostatisiran, injekcijske igle i graduirane injekcije ili crpke, te kapilare određenog volumena. Automatski uzorkivač omogućava automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu.<sup>20</sup>

Kolone koje se koriste u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti su uske čelične cijevi u kojima se nalazi nepokretna faza. Čestice nepokretne faze su pretežno sitne čestice veličine od 3  $\mu\text{m}$  do 10  $\mu\text{m}$ , čime se povećava površina nepokretne faze. Najčešće se kod kromatografije normalnih faza za punilo upotrebljava silikagel, čija se površina može kemijski modificirati za kromatografiju obrnutih faza. Dimenzije kolone mogu biti različite. Duljine kolone mogu biti od 50 mm do 3000 mm, dok unutarnji promjer može biti od 2 mm do 5 mm.

Automatski uzorkivač kao i kućište u kojemu se nalazi kolona mogu biti termostatorani. Temperatura ima važnu ulogu u procesu razdvajanja, budući da utječe na veze koje se javljaju između uzorka i nepokretne faze. Stoga se temperatura pokretne faze i kolone tijekom ispitivanja održavaju konstantnim.<sup>17,19</sup>

Sastojci razdvojeni na kromatografskoj koloni se mogu detektirati bilježenjem promjena određenog svojstva pokretne faze ili analita. Najčešće korišteni detektori su UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski, amperometrijski ili maseni spektrometar. Svaki detektor je specifičan i jedan od drugog se razlikuju u načinu rada, ali svaki od njih daje signal koji je proporcionalan određenom svojstvu analita. Za strukturnu karakterizaciju onečišćenja najčešće se koriste spregnute tehnike tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa gdje se analit detektira spektrometrom masa.<sup>17,20</sup>

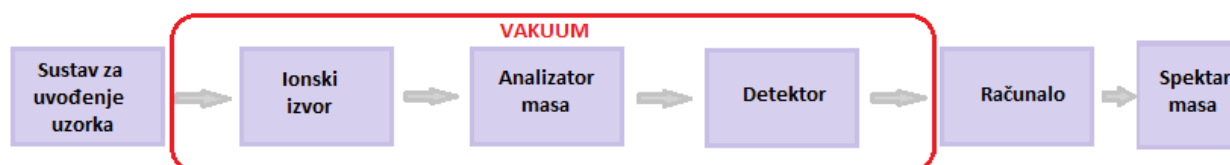
Priroda analizirane tvari, sastav pokretne i nepokretne faze, prolazak pokretne faze s uzorkom uz visok tlak kroz kolonu te stvaranje specifične kemijske interakcije utječu na različito zadržavanje komponenti smjese na kromatografskoj koloni i njihovo razdvajanje. Prilikom ispitivanja stabilnosti lijekova, HPLC obrnutih faza je najčešće korištena analitička tehnika zbog preciznosti, osjetljivosti i mogućnosti detekcije komponenata različite polarnosti. Prilikom ispitivanja forsirane razgradnje, kromatogram uzorka koji je bio izložen ekstremnim uvjetima razgradnje uspoređuje se s kromatogramom slijepe probe (otopina identična otopini uzorka bez prisutne aktivne farmaceutske tvari). Kvantificiraju se i identificiraju samo pikovi koji nisu prisutni u kromatogramu slijepe probe.<sup>17,24</sup>

### 2.3.3. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra - High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) poboljšani je oblik tekućinske kromatografije. Načela UHPLC su jednaka kao kod HPLC, a osnovna razlika je u veličini čestica punila koja su kod UHPLC manje od 2  $\mu\text{m}$ , te se stoga primjenjuju tlakovi do 1000 bara. Promjene u tehnologiji instrumenta i kolone dovele su do povećanja razlučivosti, kraćeg vremena trajanja analize te velike osjetljivosti. Osim navedenog, smanjena je i potrošnja reagensa, te se stoga UHPLC metode često koriste u farmaceutskoj industriji.<sup>25,26</sup>

## 2.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS) je analitička instrumentna tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu molekula. Bazira se na formiranju pozitivno ili negativno nabijenih iona koji se razdvajaju na temelju omjera njihove mase i naboja ( $m/z$ ).<sup>27</sup> Glavna tri dijela instrumenta su: ionizator, analizator masa i detektor.<sup>28</sup>



Slika 3. Shematski prikaz spektrometra masa

Prilikom analize molekula prvi korak je ionizacija molekula u ionskom izvoru. Izvori ionizacije dijele se na one u kojima se uzorak najprije prevodi u plinovito stanje i zatim ionizira poput kemijske ionizacije (engl. *Chemical Ionization*, CI) ili ionizacija elektronima (engl. *Electron Impact*, EI) te na izvore u kojima se uzorak neposredno iz kondenzirane faze prevodi u ione poput matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix - Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) ili elektroraspršenja (engl. *Electrospray Ionization*, ESI).<sup>30</sup> Ionizacija uključuje dovođenje energije molekuli prilikom čega može doći do fragmentacije molekule na dva ili više fragmenta, što ukazuje na dijelove od kojih je molekula sastavljena. Ionizirane molekule koje nisu podlegle fragmentaciji u spektru daju signal s najvećom vrijednosti  $m/z$  i nazivaju se molekulski ion.<sup>3</sup> Načini ionizacije razlikuju se po količini energije koja se predaje molekuli te po svojstvima analita. Veća količina energije uzrokuje jaču fragmentaciju molekule.<sup>29</sup> Razvoj ionizacijskih tehnika omogućio je primjenu MS za analizu proteina, budući da omogućavaju transformaciju biomolekula iz otopine u plisnku fazu.<sup>27</sup>

Jedna od često korištenih tehnika ionizacije u vezanim sustavima LC-MS je elektroraspršenje (ESI) budući da omogućava direktno prevođenje iona iz otopine u ione u plinskoj fazi pri atmosferskom tlaku.<sup>27,30</sup> Omogućava analizu termički nestabilnih ili slabo hlapivih spojeva. Proces elektroraspršenja moguće je podijeliti u tri faze: nastajanje kapljica, smanjenje kapljica te nastajanje iona u plinskoj fazi.<sup>30</sup> Uzorak se analizira u obliku otopine gdje se kao otapalo koristi tvar hlapljivija od analita.<sup>3</sup> Otopina koja sadrži analit uvodi se u metalnu

kapilaru na koju se primjenjuje električno polje. Utjecaj električnog polja dovodi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Ionizacija elektroraspršenjem može biti pozitivna ili negativna, ovisno o primijenjenom naponu. Priključivanje kapilare na pozitivan kraj izvora napona uzrokuje putovanje pozitivno nabijenih iona prema katodi i njihovu akumulaciju na površini tekućine.<sup>30</sup> Otapalo grijanjem isparava, veličina kapljica se smanjuje ali naboj ostaje konstantan, dolazi do Coulombovog dijeljenja i nastajanja manjih kapljica te analit kristalizira ili prelazi u plinsku fazu.<sup>3,20</sup> Metoda je osjetljiva, s granicama detekcije reda veličine atomola ( $10^{-18}$  mol) i često se koristi za ionizaciju makromolekula koje lako fragmentiraju.<sup>3,30</sup>

Nakon ionizacije, ioni se provode u analizator koji ih razdvaja u vremenu i/ili prostoru prema njihovim omjerima  $m/z$ .<sup>3</sup> Osjetljivost MS ovisi o analizatoru masa u kojemu se razdvajaju ioni. Najčešće se koriste kvadrupolni analizator masa (engl. *Quadrupole*, Q) i analizator masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of Flight*, TOF). Analizator masa koji mjeri vrijeme leta razdvaja ione iste energije, ali različite vrijednosti odnosa  $m/z$  budući da putuju različitim brzinama. Ioni se najprije ubrzavaju jednakim potencijalom, ali zbog različitog omjera  $m/z$  ioni se počinju razdvajati, budući da ioni s većim omjerom putuju sporije od onih s manjim omjerom. Masa se računa iz mjerenja vremena u kojem ioni dođu od izvora do detektora. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od 4 cilindrične elektrode, gdje su dvije suprotne pozitivno nabijene, a druge dvije negativno nabijene. Na elektrode se primjenjuje kombinacija izmjeničnog i istosmjernog potencijala. Nastalo oscilirajuće električno polje do detektora propušta samo ione određenog omjera  $m/z$ , odnosno one koji se gibaju stabilnom putanjom, dok se ostali ioni u doticaju s elektrodom neutraliziraju. Spektrometri masa s analizatorom MS/MS mogu se podijeliti u tri skupine: spektrometri masa s jednim analizatorom (kod kojih je teorijski moguća analiza do  $MS^n$ ), spektrometri masa s više analizatora (moguća analiza do  $MS^2$ ), te hibridni spektrometri masa s dva analizatora između kojih se nalazi kolizijska ćelija (mogućnost analize do  $MS^2$ ). Analizatori se povezuju s ciljem ujedinjenja najboljih karakteristika pojedinih analizatora masa. Spajanje kvadrupola i vremena leta rezultiralo je proizvodnjom MS visoke rezolucije.<sup>19,20,31</sup>

Izlazeći iz analizatora, ioni odlaze na detektor (najčešće elektronski multiplikator ili fotomultiplikator) gdje se registrira broj iona pri svakoj vrijednosti  $m/z$  i nastaje električni signal. Kao konačni rezultat dobije se spektar masa. MS analiza može dati važne informacije o analitima, uključujući njihovu strukturu, čistoću i sastav, te se stoga često koristi za

identifikaciju i strukturnu karakterizaciju farmaceutskih molekula i njihovih razgradnih produkata.<sup>3,19,27</sup>

## **2.5. Vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS)**

Zbog brzine, razlučivanja i osjetljivosti, LC instrumenti se često kombiniraju sa spektrometrima masa, što predstavlja dodatnu mogućnost analize iona u vremenu ili prostoru. Cilj vezanih sustava je unapređivanje separacije ili izazivanja dodatne fragmentacije za kvalitetnije određivanje strukture analiziranog spoja.<sup>3,20</sup>

Za povezivanje LC i MS koriste se različiti međuspojevi (engl. *Interface*) koji omogućuju djelomično uvođenje tekuće faze u spektrometar masa te djelotvorno uklanjanje suviška otapala prije uvođenje analita, kako ne bi došlo do narušavanja vakuumiranog sustava. Spektrometrom masa detektiraju se odijeljeni sastojci eluirani s HPLC kolone.<sup>19</sup>

Primjer prednosti korištenja LC-MS/MS tehnike nad LC-MS tehnikom je u analizi strukturnih izomera sličnog kemijskog ponašanja na koloni, koji jednostrukim ioniziranjem daju iste ione u masenom spektrometru, dok dodatnom fragmentacijom, odnosno primjenom LC-MS/MS tehnike daju različite ionske fragmente.<sup>3</sup> Primjena sustava LC-MS/MS dovela je do razvoja brzih i osjetljivih metoda za analizu farmaceutika, mogućih onečišćenja u lijeku te razgradnih produkata.<sup>13</sup>



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Polazni materijali

Kao polazni materijal korišten je uzorak ceritiniba, CRT, sintetiziran i dobiven u TAPI Pliva, Hrvatska.

- **Kemikalije**
  - Acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , LC čistoće prema europskoj farmakopeji (J. T. Baker, Engleska)
  - Amonijak,  $\text{NH}_3$ , vodena otopina,  $w \geq 25\%$   $\text{NH}_3$  u  $\text{H}_2\text{O}$  (Honeywell, Njemačka)
  - Amonijev formijat,  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$ , za HPLC,  $w \geq 99,0\%$  (Honeywell, Njemačka)
  - Klorovodična kiselina,  $\text{HCl}$ ,  $w = 37\%$  (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
  - Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , LC čistoće prema europskoj farmakopeji Ph Eur (J. T. Baker, Engleska)
  - Mravlja kiselina,  $\text{HCOOH}$ , aditiv za LC-MS (Honeywell, Njemačka)
  - Natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$ , (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
  - Visoko pročišćena voda
  - Vodikov peroksid,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $w = 30\%$  (p.a.) (Merck)

### 3.2. Oprema i instrumenti

- **Kromatograf:** Acquity UPLC H-Class (Waters, SAD)
  - Kvaterna pumpa
  - Detektor: QDa
  - Automatski uzorkivač s kontrolom temperature
  - Injektorski sustav
- **Kromatografska kolona:** BEH Phenyl, 2,1 mm × 100 mm, 1,7  $\mu\text{m}$
- **Računalni program:** Waters<sup>®</sup>Empower<sup>™</sup> softver

- **2D-LC-MS**
- **Kromatograf:** 1290 Infinity II LC System (Agilent, SAD)
  - Binarna pumpa
  - Detektor: DAD
  - Automatski uzorkivač s kontrolom temperature
  - Injektorski sustav
- **Kromatografska kolona:** BEH Phenyl, 2,1 mm × 100 mm, 1,7 μm
- **Detektor:** 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (Agilent, SAD)
  - ESI sustav za ionizaciju
  - Uređaj za samouzorkovanje
- **Računalni program:** Agilent MassHunter softver

#### Ostala oprema:

- Membranski filtri za pokretnu fazu, RC58, veličina pora 0,2 μm (Whatman, Njemačka)
- Mikrovaga, model XP56 (Mettler-Toledo AG, Švicarska)
- pH metar, model PHM220 (Radiometer Analytical SAS, Francuska)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digital 10P (Bandelin, Njemačka)
- Bočice za uzorke od 2,0 mL, PTFE čepovi sa silikonskom septumom

### 3.3. Priprema otapala i pokretne faze

#### 3.3.1. Priprema otapala

Izbor otapala ovisi o topljivosti aktivne farmaceutske tvari i njegovih onečišćenja u pojedinom otapalu. Prema prijašnjim ispitivanjima<sup>6</sup>, ceritinib je pokazao najbolje otapanje u metanolu. Stoga je za pripravu otapala u volumenu od 100 mL korišten metanol i ultračista voda u omjeru 8 : 2.

#### 3.3.2. Priprema pokretne faze

Pripremljen je pufer volumena 1 L, koncentracije  $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH-vrijednosti 4,3. Odvagano je 0,62 g amonijeva formijata,  $\text{HCOONH}_4$ , te otopljeno u 1 L ultračiste vode (engl. *Ultrapurewater*). Otopina je 2 minute stavljena na ultrazvučnu kupelj. Otopina je profiltriran preko filtera veličine pora 0,2 μm. pH-vrijednost podešena je dodatkom razrijeđene otopine

mravlje kiseline, HCOOH, budući da je pH vrijednost bila viša od željene. Pufer je korišten kao pokretna faza A, dok je za pokretnu fazu B korišten kupovni acetonitril (ACN), CH<sub>3</sub>CN.

### 3.4. Priprema temeljne standardne otopine

Pripremljena je temeljna standardna otopina (engl. *stock solution*) ceritiniba masene koncentracije  $\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ . U tikvicu od 25 mL odvagano je 49,52 mg CRT te je dodana mala količina pripravljenog otapala za otapanje uzorka. Tikvica je stavljena na ultrazvučnu kupelj 2 minute. Nakon toga nadopunjena je otapalom do oznake.

Budući da je u svrhu ispitivanja forsirane razgradnje pri različitim uvjetima iskorištena pripremljena standardna otopina ceritiniba, naknadno je na isti način priređeno još 5 mL standardne otopine ceritiniba masene koncentracije  $\gamma = 2 \text{ mg mL}^{-1}$ , otapanjem 10,01 mg uzorka CRT u 5 mL otapala.

### 3.5. Priprema reagensa i uzoraka za studij forsirane razgradnje

Ispitan je utjecaj kiseline, lužine i peroksida različitih koncentracija na stabilnost ceritiniba pri različitim temperaturnim uvjetima te uz promjenu vremenskog perioda zagrijavanja.

#### 3.5.1. Priprava reagensa za forsiranu razgradnju

Za forsiranu razgradnju ceritiniba korištene su otopine HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ , otopine NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ , te 20 % i 30 % otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- (1) Iz koncentrirane otopine HCl pripravljeno je po 20 mL otopine HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ . U tikvicu s 16,67 mL ultračiste vode otpipetirano je 3,33 mL HCl za pripravu otopine HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ . Za pripravu otopine HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  u tikvicu s 11,68 mL ultračiste vode otpipetirano je 8,32 mL koncentrirane HCl.
- (2) Pripremljeno je 20 mL otopine NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ . Odvagano je 1,62 g NaOH i otopljeno u 20 mL ultračiste vode. Za pripremu 20 mL otopine NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  odvagano je 4,03 g NaOH te je dodano 20 mL ultračiste vode.

- (3) Iz 30 % otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  pripravljeno je 20 mL 20 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  dodatkom 12,85 mL 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  u tikvicu s 7,15 mL ultračiste vode.

### 3.5.2. Priprava uzoraka za forsiranu razgradnju

U tikvicama od 5 mL priređeno je 6 otopina za reakcije forsirane razgradnje. U prvu tikvicu dodano je 2 mL standardne otopine CRT te 2 mL prethodno pripravljene otopine HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ . Tikvica je stavljena na zagrijavanje 30 minuta na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  sa svrhom odvijanja reakcije. Nakon 30 minuta dodano je 2 mL NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  za neutralizaciju i zaustavljanje reakcije razgradnje. U drugu tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL standardne otopine CRT i 2 mL otopine HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ . Tikvica je stavljena na zagrijavanje 30 minuta pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , nakon čega je dodano 2 mL otopine NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  za neutralizaciju.

U treću tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL standardne otopine CRT i 2 mL otopine NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ , te je tikvica zagrijavana 30 minuta na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon 30 minuta reakcija je zaustavljena neutralizacijom dodavanjem 2 mL otopine HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ . U četvrtu tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL standardne otopine CRT te 2 mL prethodno pripravljene otopine NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ . Tako priređena otopina u tikvici zagrijavana je 30 minuta na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , nakon čega je neutralizirana s 2 mL otopine HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ .

U petu tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL standardne otopine CRT te 2 mL 20 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tikvica je stavljena na zagrijavanje 30 minuta pri temperaturi od  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . U šestu tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL standardne otopine CRT i 2 mL otopine 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tikvica je zagrijavana 30 minuta na  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  zbog odvijanja reakcije.

Osim navedenih otopina, priređeno je i 2 mL otopine CRT koje je služila kao provjera (standardna otopina CRT : diluent = 1 : 1). Pripravljene uzorci (6) te otopina CRT za provjeru uzorkovani su u bočice za uzorke, te su postavljeni na UHPLC instrument, a poslije su korištene i za analizu 2D-LC-MS. Budući da su rezultati UHPLC analize pokazali da je do znatnog raspadanja CRT došlo samo u reakciji s 20 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pripremljeni su novi uzorci s ekstremnijim uvjetima razgradnje u prisutnosti kiseline i baze.

Pripremljena su dva dodatna uzorka za forsiranu razgradnju tako što je u tikvice od 5 mL dodano po 2 mL standardne otopine CRT, te je u prvu tikvicu dodano 2 mL otopine HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ , a u drugu tikvicu 2 mL NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ .

Priređeni uzorci zagrijavani su 60 minuta na 80 °C, te su nakon zagrijavanja neutralizirani odgovarajućom kiselinom (HCl), odnosno, bazom (NaOH) koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ . Uzorci su stavljeni u bočice za uzorke te su korišteni za analizu UHPLC, a potom i analizu 2D-LC-MS.

Priređena su 3 uzorka za forsiranu razgradnju u prisutnosti kiseline i baze koji su zagrijavani pri nešto nižim temperaturama, dulji vremenski period. U 3 tikvice od 5 mL dodano je 2 mL standardne otopine CRT, te redom: 2 mL otopine HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  u prvu tikvicu, 2 mL otopine NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  u drugu tikvicu, te 2 mL otopine NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  u treću tikvicu. Uzorci su zagrijavani dva dana na temperaturi 70 °C. Zbog isparavanja otapala i kristalizacije spoja, nakon dvodnevnog zagrijavanja, u tikvice je dodano otapalo (do približno 4 mL koliko je iznosio početni volumen) te je bilo potrebno koristiti ultrazvučnu kupelj dvije minute. Nakon otapanja kristaliziranog spoja, uzorci su neutralizirani odgovarajućom kiselinom (HCl), odnosno bazom (NaOH) odgovarajuće koncentracije ( $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  ili  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Uzorci su stavljeni u bočice za uzorke te su korišteni za UHPLC analizu, a potom i 2D-LC-MS analizu. Rezultati UHPLC analize pokazali su da je došlo do razgradnje CRT.

Priređena su dva uzorka za forsiranu razgradnju kako bi se ispitaio utjecaj ekstremnih uvjeta zagrijavanja na ceritinib. U prvu tikvicu dodano je 2 mL standardne otopine CRT i 2 mL otopine HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ . U drugu tikvicu dodano je 2 mL standardne otopine CRT i 2 mL otopine NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ . Uzorci su zagrijavani šest dana pri 70 °C. Tijekom zagrijavanja dodavano je otapalo (do približno 4 mL koliko je iznosio početni volumen) zbog isparavanja. Uzorak s bazom zbog zamućenja nije dalje korišten, dok je uzorak s otopinom HCl prebačen u bočicu za uzorke i korišten za UHPLC analizu, a potom i 2D-LC-MS analizu.

U tablici 2. prikazani su svi priređeni uzorci te reagensi i uvjeti pri kojima su uzorci zagrijavani u svrhu nastajanja razgradnih produkata ceritiniba.

Tablica 2. Uzorci forsirane razgradnje i uvjeti razgradnje

Uzorak	Reagens	Temperatura	Vrijeme
1	20 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 °C	30 min
2	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 °C	30 min
3	2 mol L <sup>-1</sup> HCl	60 °C	30 min
4	5 mol L <sup>-1</sup> HCl	60 °C	30 min
5	5 mol L <sup>-1</sup> HCl	80 °C	60 min
6	5 mol L <sup>-1</sup> HCl	70 °C	2 dana
7	5 mol L <sup>-1</sup> HCl	70 °C	6 dana
8	2 mol L <sup>-1</sup> NaOH	60 °C	30 min
9	5 mol L <sup>-1</sup> NaOH	60 °C	30 min
10	5 mol L <sup>-1</sup> NaOH	80 °C	60 min
11	2 mol L <sup>-1</sup> NaOH	70 °C	2 dana
12	5 mol L <sup>-1</sup> NaOH	70 °C	2 dana
13	2 mol L <sup>-1</sup> NaOH	70 °C	6 dana

### 3.5.3. Slijepa proba

Privedene su 4 slijepa probe. Prva slijepa proba sadržavala je samo otapalo. Druga slijepa proba sadržavala je 500 µL otapala i 500 µL otopine 20 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Treća slijepa proba sadržavala je 330 µL otapala, 330 µL otopine HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i 330 µL otopine NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$ . Četvrta slijepa proba sadržavala je 330 µL otapala, 330 µL otopine HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  te 330 µL otopine NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.6. Uvjeti mjerenja sustavom UHPLC

Svi prethodno priređeni uzorci uzorkovani u bočice za uzorke postavljeni su na UHPLC instrument. Kromatografski parametri UHPLC metode za identifikaciju razgradnih produkata CRT, koja je razvijena u sklopu doktorske disertacije Mije Antolčić opisani su u tablici 3.

Tablica 3. Kromatografski parametri UHPLC metode za analizu ceritiniba i njegovih razgradnih produkata

<b>Kromatografska kolona</b>	<b>BEH Phenyl, 2,1 mm × 100 mm, 1,7 μm</b>		
<b>Vodena pokretna faza „A“</b>	10 mmol L <sup>-1</sup> HCOONH <sub>4</sub> ; pH = 4,3		
<b>Organska pokretna faza „B“</b>	CH <sub>3</sub> CN		
<b>Gradijent</b>	Vrijeme / min	A %	B %
	0,00	90	10
	2,00	81	19
	3,50	65	35
	6,00	58	42
	9,00	45	55
	12,00	10	90
	14,00	10	90
	15,00	90	10
17,00	90	10	
<b>Otapalo</b>	8 : 2 (MeOH : ultračista voda)		
<b>Volumen injektiranja / μL</b>	1		
<b>Brzina protoka / mL min<sup>-1</sup></b>	0,40		
<b>Valna duljina detekcije / nm</b>	210		
<b>Temperatura kolone / °C</b>	55		

### 3.7. Uvjeti mjerenja sustavom 2D-LC-MS

Za identifikaciju nepoznatih komponenti nastalih tijekom forsirane razgradnje korišten je 2D-LC-MS sustav: *Agilent UHPLC 1290 Infinity* s binarnom pumpom i kromatografskom kolonom *BEH Phenyl*, 2,1 mm × 100 mm, 1,7 μm, uz detektor s nizom dioda (DAD) i *Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS*.

Kao pokretna faza B korišten je ACN. Za pokretnu fazu A korišten lako hlapivi pufer, amonijev formijat (HCOONH<sub>4</sub>) koji je pogodan za ionizaciju u MS-u. Postavljeni su jednaki uvjeti kao za UHPLC analizu. Temperatura kolone iznosila je 55 °C. Vrijeme analize iznosilo je 17 minuta. Protok je postavljen na 0,4 mL min<sup>-1</sup>. Postavljeni su svi uzorci forsirane razgradnje, slijepe probe te uzorak CRT koji je služio kao kontrola. Snimljeni spektri su uspoređeni sa spektrom otapala. Pikovi koji nisu uočeni u spektru masa otapala su izdvojeni, a njihova masa i vrijeme zadržavanja zabilježeni.

Analiza je provedena uz pozitivnu ionizaciju. Na ionima s odabranim omjerom  $m/z$  provedeni su MS/MS eksperimenti. Provedena je razgradnja pri različitim energijama sudara (0, 10, 20, 30, 40 eV).



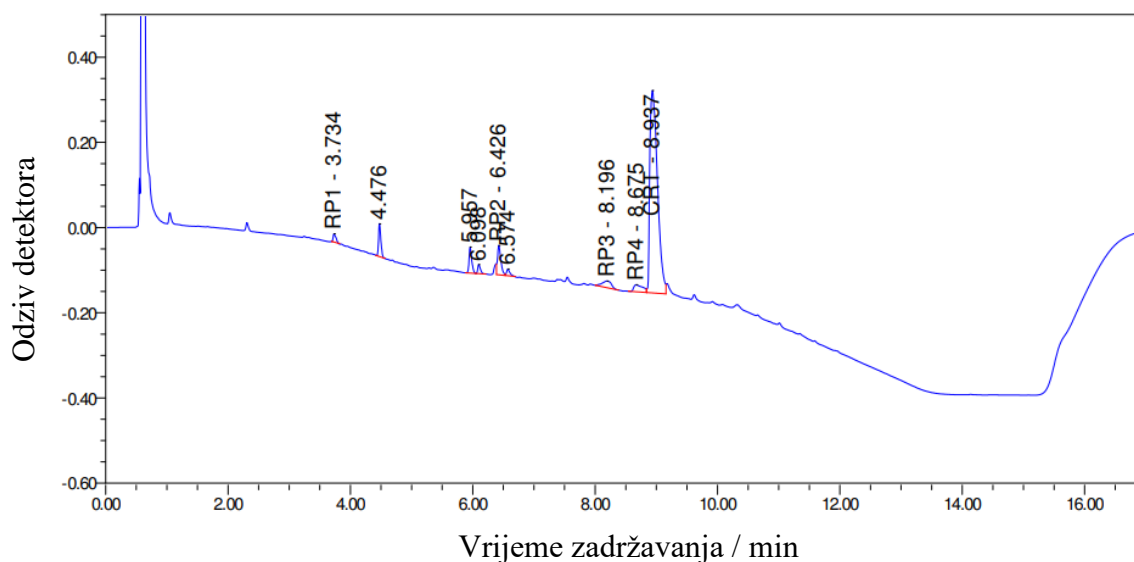
## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati forsirane razgradnje

Ispitivanja forsirane razgradnje bitna su za bolje razumijevanje stabilnosti aktivne farmaceutske tvari ili gotovog lijeka te pomažu u dobivanju informacija o razgradnim putevima lijeka i karakterizaciji glavnih razgradnih produkata. Identifikacija razgradnih produkata ima važnu ulogu u utvrđivanju sigurnosti lijeka. S. Kapavarapu i suradnici<sup>6</sup> razvili su metodu za određivanje ceritiniba u lijeku pri različitim eksperimentalnim uvjetima. Rezultati ispitivanja forsirane razgradnje ceritiniba su pokazali kako nije došlo do nastajanja razgradnih produkata ceritiniba pri uvjetima povišene temperature, neutralnim uvjetima te fotostabilitetnim ispitivanjima. Ispitivanja su pokazala nastajanje razgradnih produkata uz prisutnost oksidansa, kiseline i lužine. Stoga je u ovom radu u svrhu identifikacije razgradnih produkata, forsirana razgradnja ceritiniba fokusirana na razgradnju pri uvjetima povišene temperature uz različita vremena zagrijavanja u otopinama oksidansa ( $H_2O_2$ ), kiseline (HCl) i lužine (NaOH) različitih koncentracija. Uzorci su najprije analizirani koristeći metodu UHPLC. Uzorci kod kojih je došlo do razgradnje podvrgnuti su analizi sustavom 2D-LC-MS u svrhu identifikacije razgradnih produkata.

#### 4.1.1. Rezultati forsirane razgradnje u oksidacijskim uvjetima

Slijedeći uvjete iz rada<sup>6</sup> u kojima su uzorci ceritiniba zagrijavani 30 minuta pri 60 °C uz korištenje 20 % i 30 % otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uočeno je nastajanje razgradnih produkata. Uzorci su analizirani koristeći UHPLC metodu. Oksidacijski razgradni produkti (**RP**) identificirani su kao **RP1**, **RP2**, **RP3** i **RP4**.

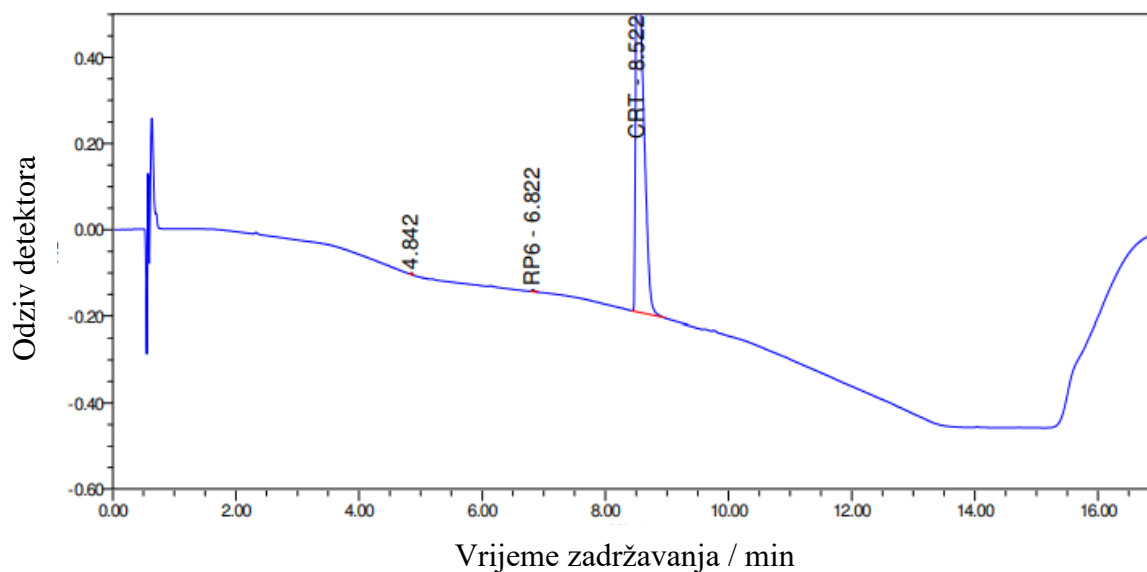


Slika 4. Kromatogram otopine ceritiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji otopinom 20 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uz zagrijavanje 30 minuta pri 60 °C

#### 4.1.2. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti lužine

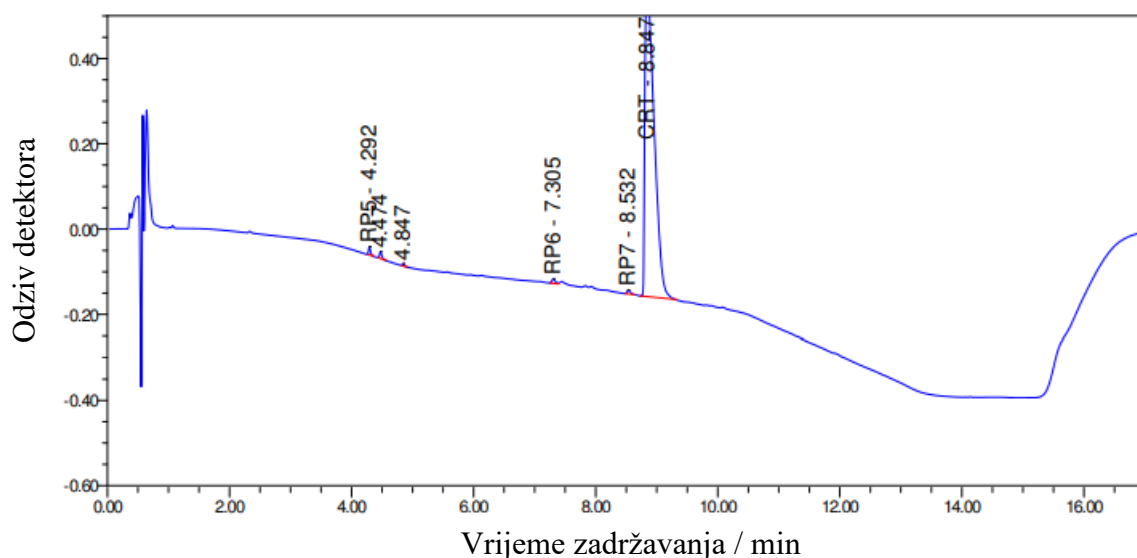
Zagrijavanjem ceritiniba 30 minuta pri 60 °C s otopinom NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  nije došlo do očekivane razgradnje kakva je zabilježena u radu<sup>6</sup>. Razlika u izvođenju eksperimenta u odnosu na S. Kapavarapu i suradnike uočena je u provođenju neutralizacije kiselinom nakon zagrijavanja od 30 min pri 60 °C. U radu nije zabilježeno provođenje iste, niti je zabilježeno vrijeme snimanja uzoraka nakon provođenja studije forsirane razgradnje.

Kako bi se postigla željena razgradnja uzorci tretirani lužinom izloženi su ekstremnijim uvjetima, odnosno zagrijavanju 30 minuta pri 60 °C u otopini NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  nakon čega je uzorak ponovno neutraliziran i analiziran UHPLC-om. Zabilježen je nastanak jako malih količina razgradnog produkta **RP6**.



Slika 5. Kromatogram otopine ceritiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji otopinom NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  uz zagrijavanje 30 minuta pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$

Kako bi se postigla značajnija razgradnja, uzorci ceritiniba podvrgnuti su još ekstremnijim uvjetima, odnosno uzorci ceritiniba tretirani lužinom zagrijavani su 60 minuta pri  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , te 2 dana pri  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  u otopinama NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ , nakon čega su neutralizirani kiselinom odgovarajuće koncentracije i analizirani. Nastajanje više razgradnih produkata (**RP5**, **RP6**, **RP7**) uočeno je pri analizi uzorka koji je zagrijavan 2 dana pri  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

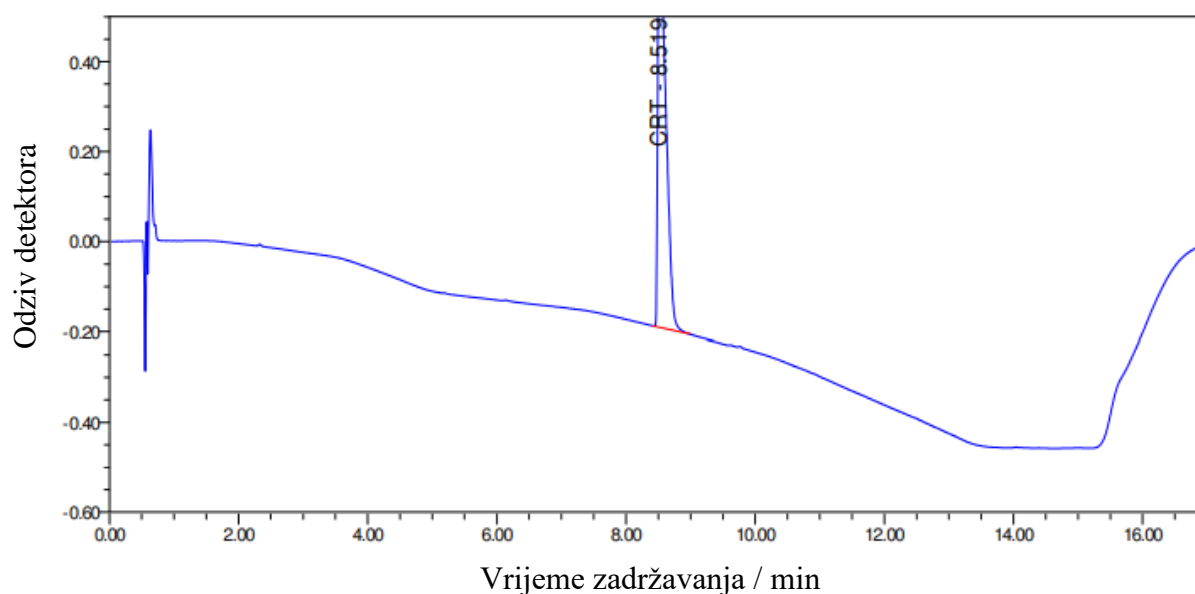


Slika 6. Kromatogram otopine ceritiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji otopinom NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  uz zagrijavanje 2 dana pri  $70 \text{ }^\circ\text{C}$

Podvrgavanjem ceritiniba zagrijavanju 6 dana pri 70 °C s otopinom NaOH koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  uočena je precipitacija te uzorak nije bilo moguće koristiti za daljnju analizu.

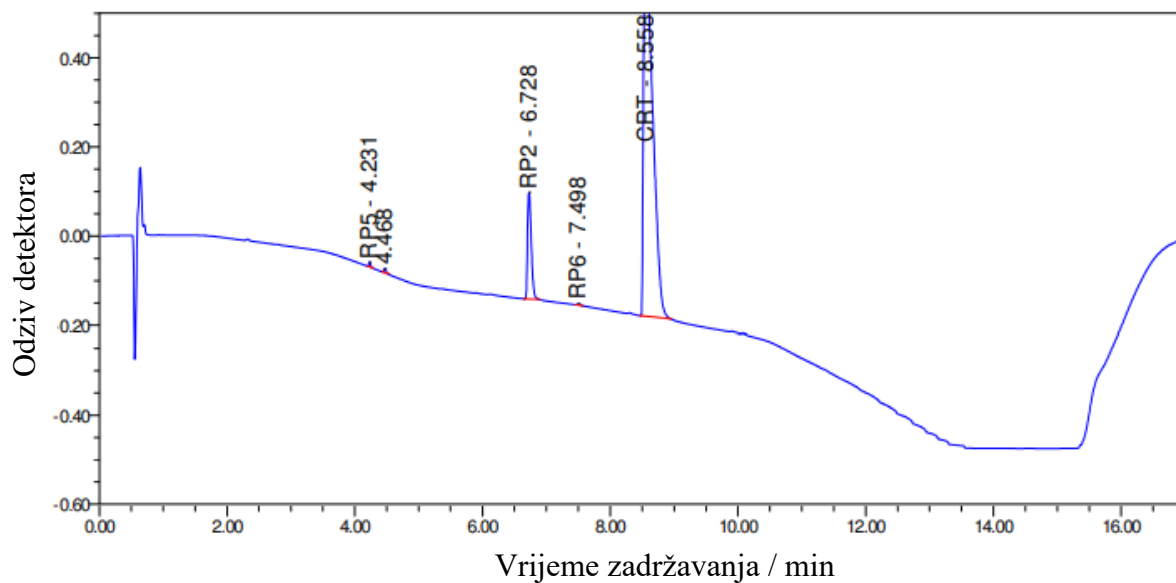
#### 4.1.3. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti kiseline

Uzorci ceritiniba podvrgnuti zagrijavanju s otopinom HCl koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  30 minuta pri 60 °C nakon UHPLC analize nisu pokazali nastajanje razgradnih produkata koji su opisani u literaturi<sup>6</sup>.



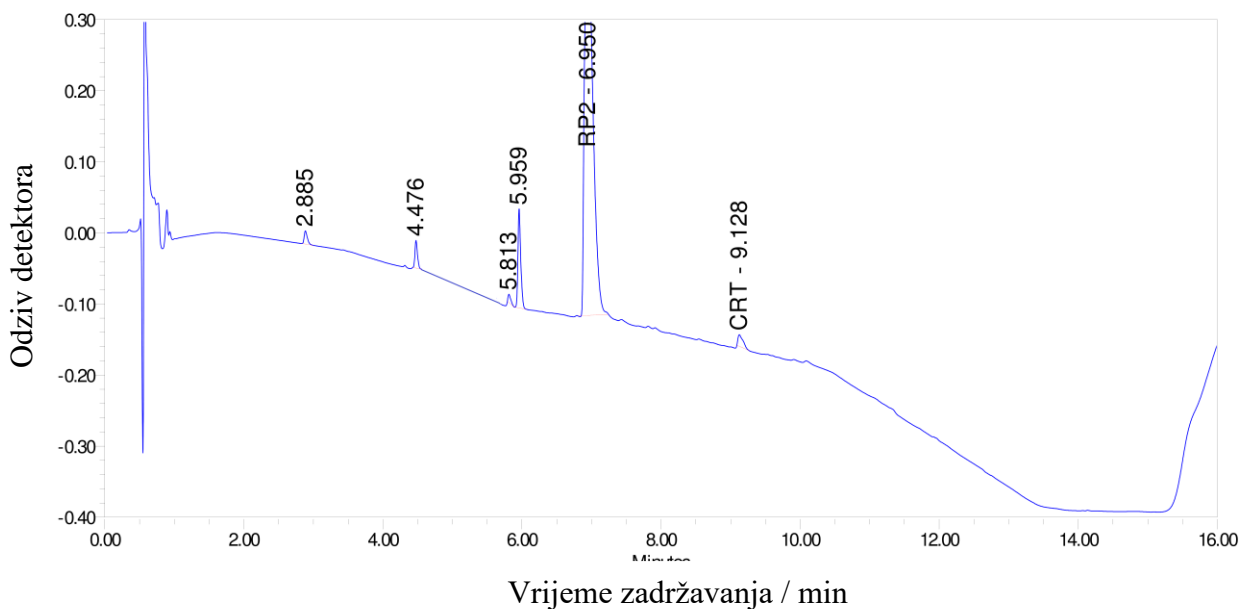
Slika 7. Kromatogram otopine ceritiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji otopinom HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  uz zagrijavanje 30 minuta pri 60 °C

Stoga su uzorci podvrgnuti ekstremnijim uvjetima zagrijavanja. Zagrijavanje uzorka ceritiniba 60 minuta pri 80 °C također nije dovelo do razgradnje. Rezultati UHPLC analize uzoraka zagrijavanih u trajanju od 2 dana pri 70 °C pokazali su da je došlo do nastajanja razgradnih produkata **RP2**, **RP5** i **RP6**.



Slika 8. Kromatogram otopine ceritiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji otopinom HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  uz zagrijavanje 2 dana pri  $70 \text{ }^\circ\text{C}$

Uzorci ceritiniba u prisutnosti kiseline su zagrijavani 6 dana pri  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  kako bi se pratila povećana razgradnja. U navedenom slučaju gotovo sav ceritinib prešao je u razgradni produkt **RP2**.



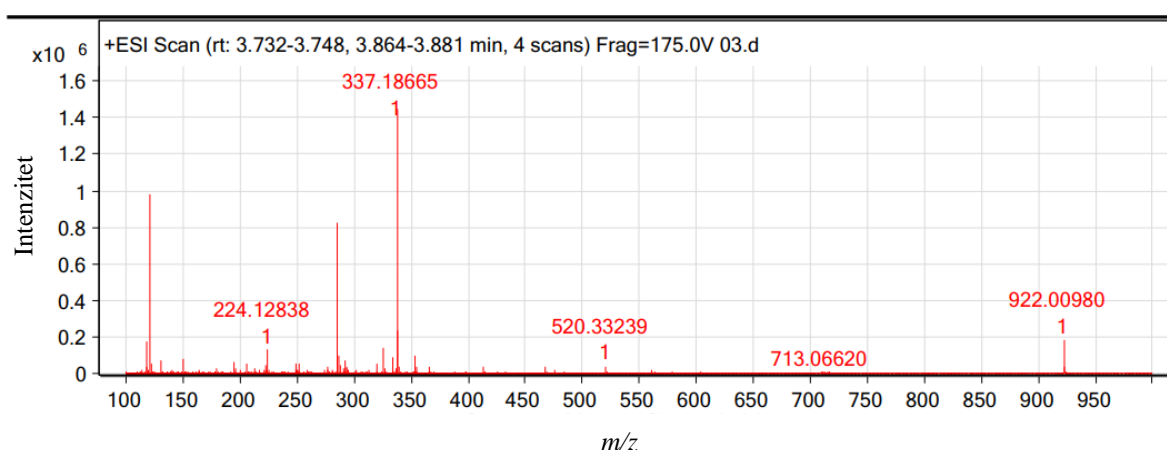
Slika 9. Kromatogram otopine ceritiniba podvrgnute forsiranoj razgradnji otopinom HCl koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  uz zagrijavanje 6 dana pri  $70 \text{ }^\circ\text{C}$

## 4.2. Identifikacija razgradnih produkata

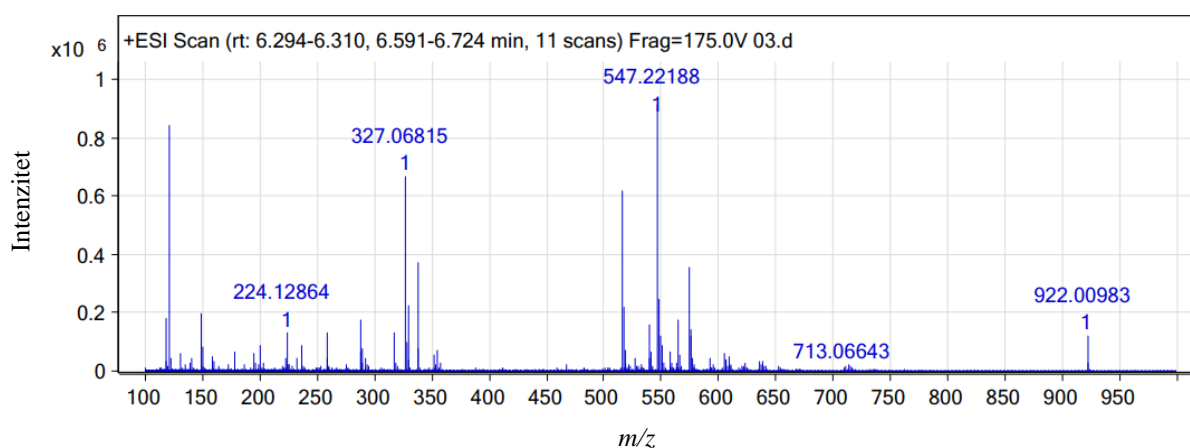
Analiza kromatograma uzoraka ceritiniba podvrgnutih oksidaciji te kiseloj i baznoj hidrolizi pokazala je da je došlo do nastajanja nekoliko razgradnih produkata (**RP1** – **RP7**). Određivanje  $m/z$  vrijednosti te strukturna karakterizacija razgradnih produkata provedena je vezanim sustavom UHPLC-MS te tandemnom spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem. Korištena je kolona (BEH Phenyl, 2,1 mm × 100 mm, 1,7 μm) kao kod prethodnog mjerenja, te su postavljeni jednaki kromatografski uvjeti. Temperatura kolone iznosila je 55 °C, vremenski gradijent 12 minuta, s ukupnim trajanjem analize 17 minuta.

### 4.2.1. Identifikacija razgradnih produkata u oksidacijskim uvjetima

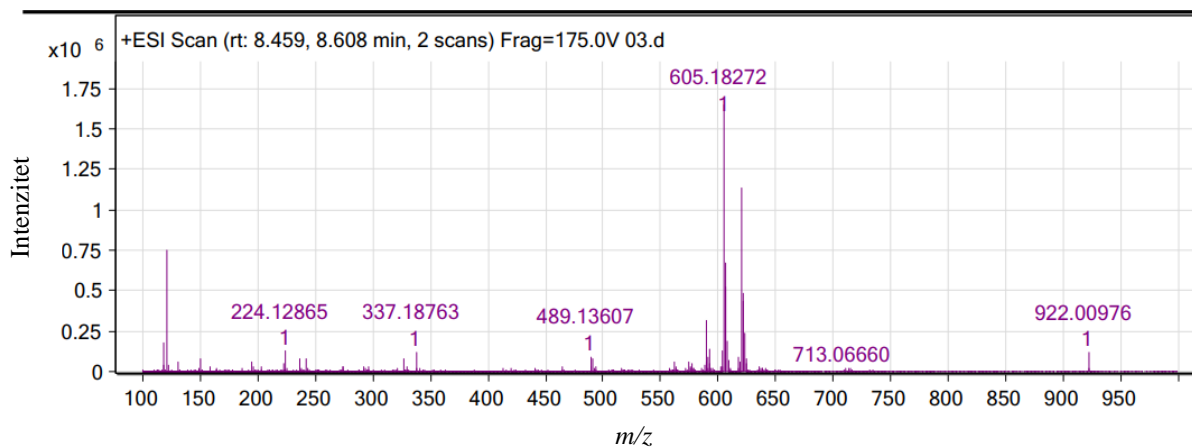
Sniman je MS i MS/MS spektar uzorka u kojemu je provedena forsirana razgradnja ceritiniba potaknuta otopinom 20 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na osnovi masa fragmenata očitanih iz MS spektra (slike 10 – 13), pretpostavljene su strukture razgradnih produkata: produkt **RP1** s vrijednosti  $m/z$  od 337, produkt **RP2** s vrijednosti  $m/z$  327, produkt **RP3** s vrijednosti  $m/z$  605 te produkt **RP4** s vrijednosti  $m/z$  590, koje su prikazane u tablici 4. U slučaju MS spektara prikazanih na slikama 11., 12. i 13. vidljivi su izotopni signali korisni za određivanje broja atoma klora u molekuli koji daje doprinos signalu (M+2)<sup>+</sup>. Također je vidljivo kako signal pri vrijednosti  $m/z$  (M+2) iznosi trećinu intenziteta signala pri vrijednosti  $m/z$  M. Navedeni razgradni produkti do sada nisu bili zabilježeni.



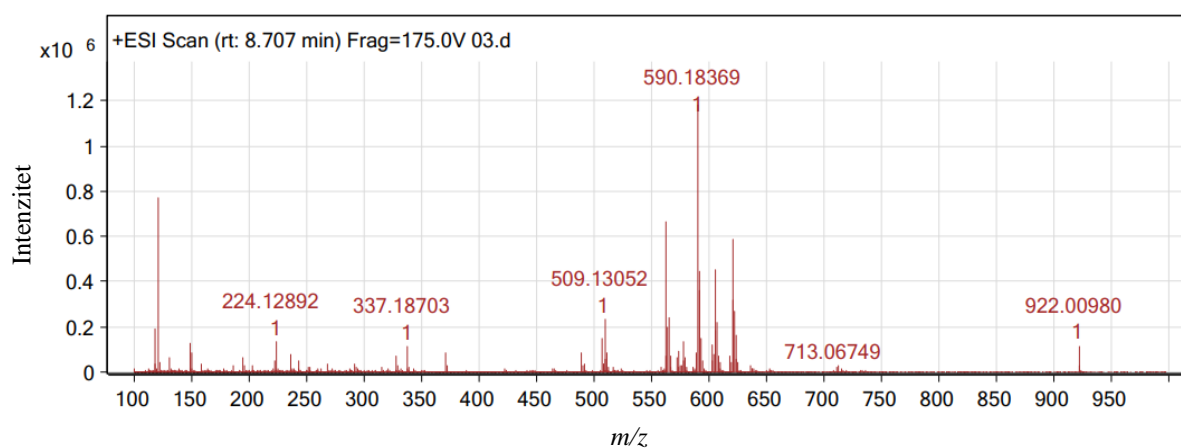
Slika 10. MS spektar razgradnog produkta **RP1** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u oksidativnim uvjetima



Slika 11. MS spektar razgradnog produkta **RP2** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u oksidativnim uvjetima

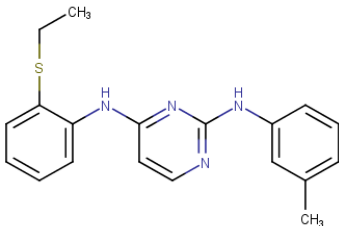
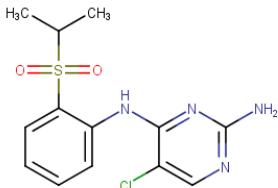
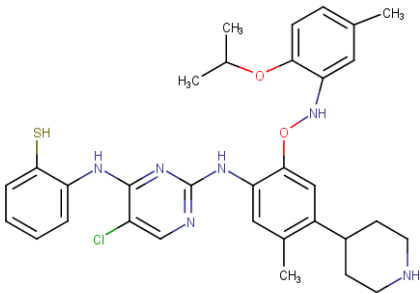
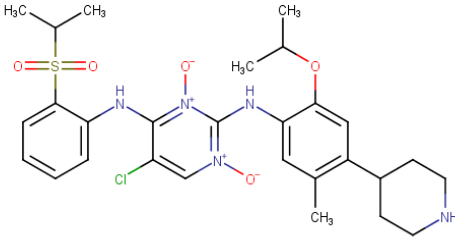


Slika 12. MS spektar razgradnog produkta **RP3** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u oksidativnim uvjetima



Slika 13. MS spektar razgradnog produkta **RP4** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u oksidativnim uvjetima

Tablica 4. Razgradni produkti ceritiniba nakon forsirane razgradnje potaknute otopinom 20 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i njihove strukture

Razgradni produkt	Kemijska formula	M + 1	Točna masa	Struktura
RP1	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> S	337,15	336,14	
RP2	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	327,07	326,06	
RP3	C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	605,2	604,2	
RP4	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S	590,18	589,2	

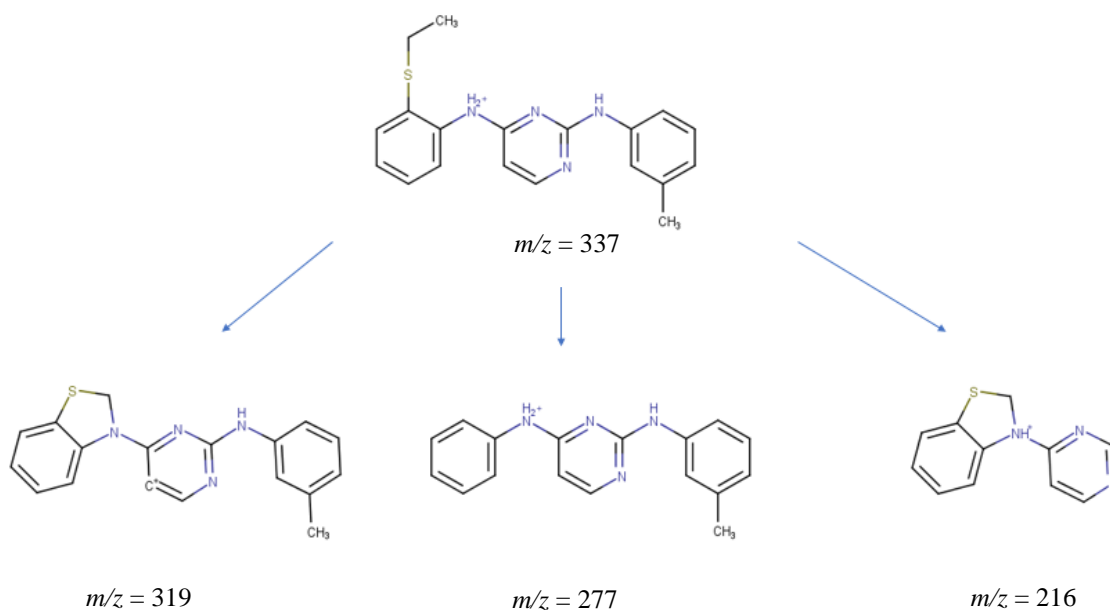


U tablici 5. navedene su mase nastalih fragmenata ceritiniba nakon forsirane razgradnje potaknute u otopini 20 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gdje su prikazana i njihova relativna vremena zadržavanja. MS/MS spektri nalaze se u dodatku (slike D1 - D4). Na temelju struktura razgradnih produkata ceritiniba i masa nastalih fragmenata pretpostavljen je način razgradnje (slike 14 - 17).

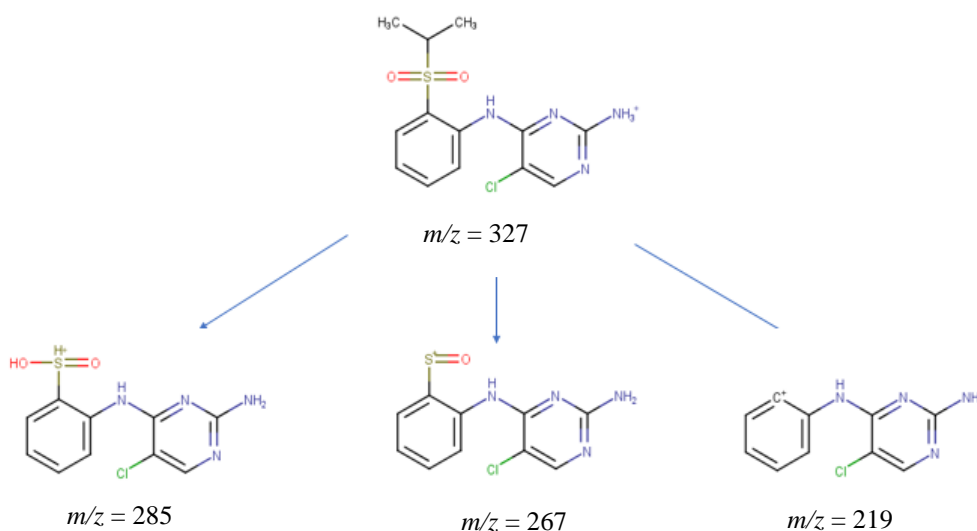
Tablica 5. Relativna vremena zadržavanja razgradnih produkata ceritiniba nastalih forsiranom razgradnjom u otopini 20 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i njihovi fragmenti nakon analize MS/MS-om

RAZGRADNI PRODUKT	RELATIVNO VRIJEME ZADRŽAVANJA ( $r_R = t(RP) / t(CERITINIB)$ ) / min	POČETNI ION $m/z$	ENERGIJA SUDARA / eV	IONI PRODUKTI $m/z$
RP1	0,42	337	20	319, 277, 260, 216
RP2	0,72	327	20	285, 267, 219, 176
RP3	0,92	605	20	563, 545, 485
RP4	0,97	590	30	548, 530, 470, 191

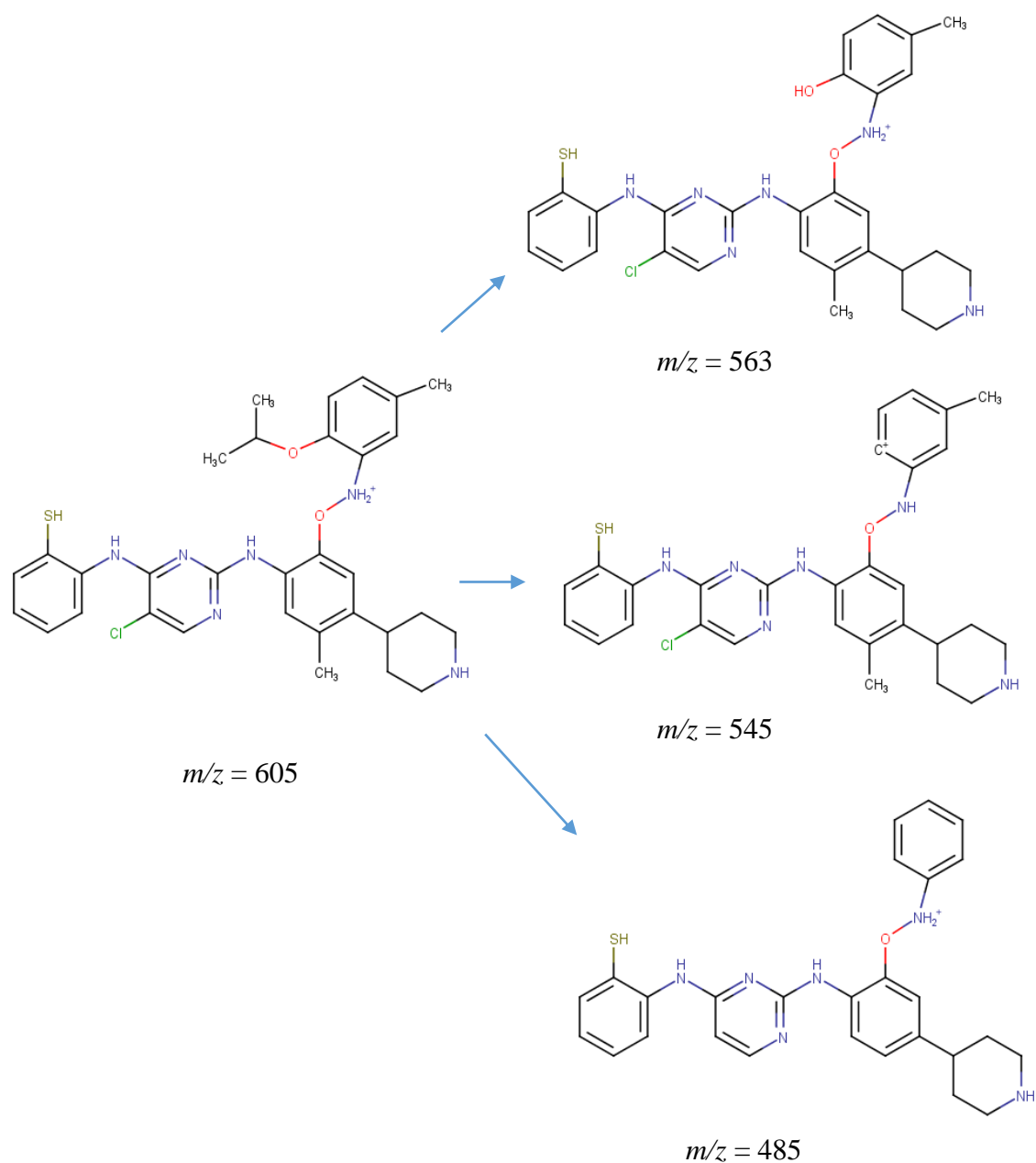
Signal protonirane molekule **RP1** opažen je pri vrijednosti  $m/z$  337, što odgovara molekulskoj formuli [C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>S]<sup>+</sup>. U MS/MS spektru (slika D1) razgradnog produkta **RP1** mogu se uočiti signali iona produkata pri vrijednostima  $m/z$ : 319 (gubitak CH<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>), 277 (gubitak S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 216 (gubitak CH<sub>3</sub>-NH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>). Pretpostavljeni način fragmentacije prikazan je slikom 14.

Slika 14. Fragmentacija razgradnog produkta **RP1**,  $m/z$  337

Signal protonirane molekule **RP2** opažen je pri vrijednosti  $m/z$  327, što odgovara molekularnoj formuli  $[C_{13}H_{16}ClN_4O_2S]^+$ . MS/MS spektar razgradnog produkta **RP2** prikazan je na slici D2. Signali iona produkata su pri vrijednostima  $m/z$ : 285 (gubitak  $C_3H_6$ ), 267 (gubitak  $C_3H_6-H_2O$ ), 219 (gubitak  $C_3H_6-H_2O-SO$ ). Pretpostavljeni način fragmentacije prikazan je slikom 15.

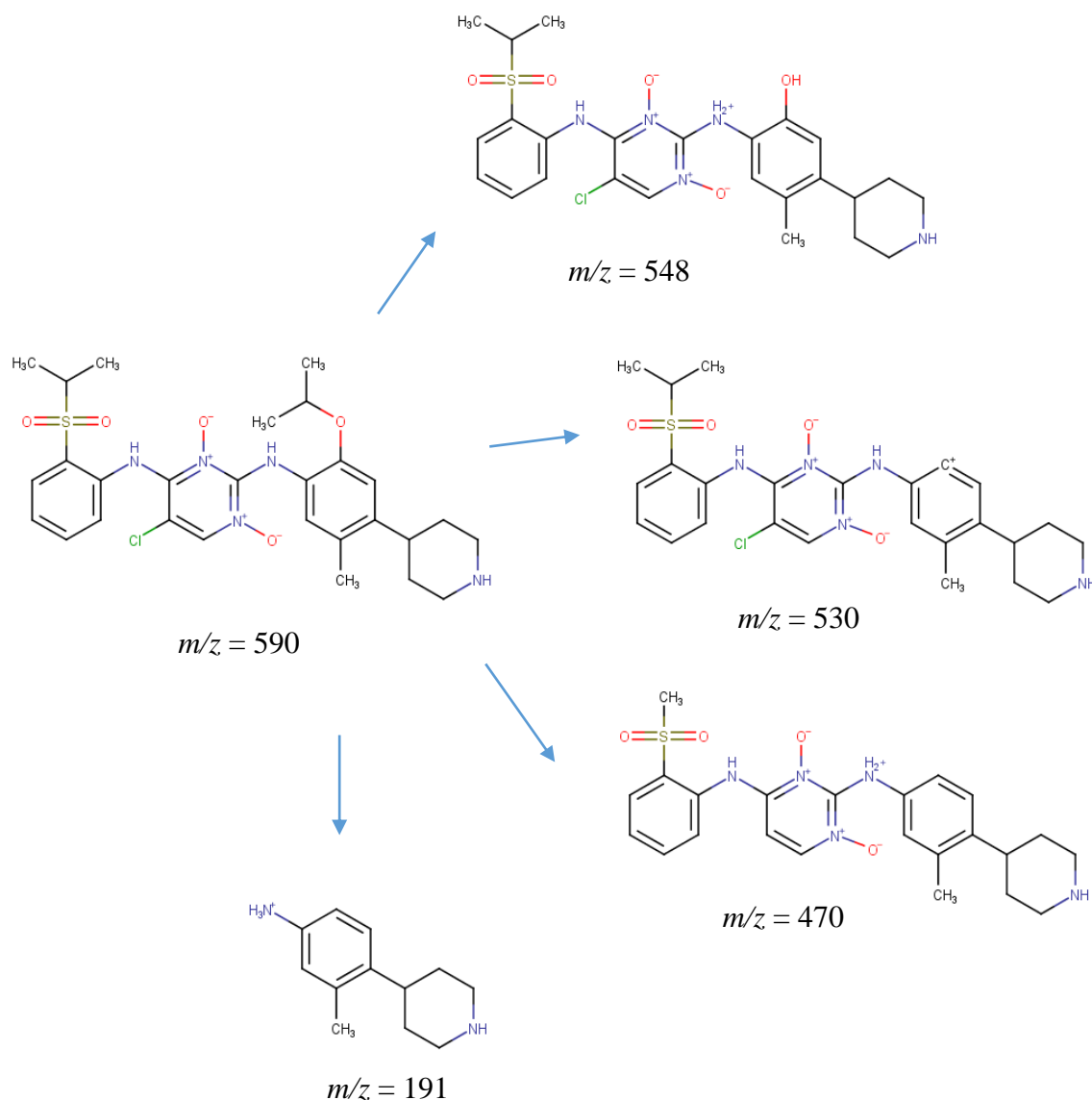
Slika 15. Fragmentacija razgradnog produkta **RP2**,  $m/z$  327

Signal protonirane molekule **RP3** opažen je pri vrijednosti  $m/z$  605, što odgovara molekulskoj formuli  $[C_{32}H_{38}ClN_6O_2S]^+$ . U MS/MS spektru razgradnog produkta **RP3** (slika D3) prisutni su signali iona produkata pri vrijednostima  $m/z$ : 563 (gubitak  $C_3H_6$ ), 545 (gubitak  $C_3H_6-H_2O$ ), 485 (gubitak  $C_3H_4-OH-C_2H_4-Cl$ ). Pretpostavljeni način fragmentacije prikazan je slikom 16.



Slika 16. Fragmentacija razgradnog produkta **RP3**,  $m/z$  605

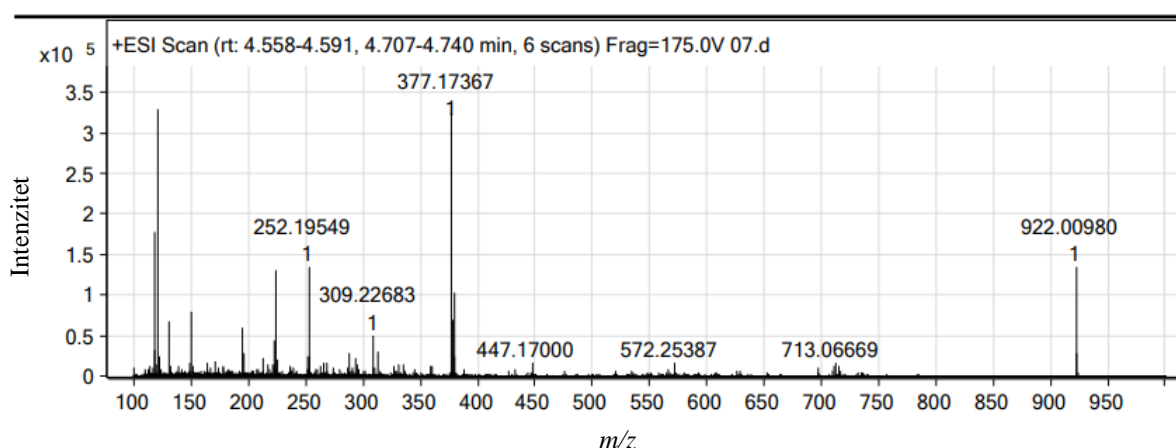
Signal protonirane molekule **RP4** opažen je pri vrijednosti  $m/z$  590, što odgovara molekulskoj formuli  $[C_{28}H_{37}ClN_5O_5S]^+$ . MS/MS spektar razgradnog produkta **RP4** prikazan je na slici D4. Signali iona produkata su pri vrijednostima  $m/z$ : 548 (gubitak  $C_3H_6$ ), 530 (gubitak  $C_3H_6-H_2O$ ), 470 (gubitak  $C_3H_4-OH-C_2H_4-Cl$ ). Pretpostavljeni način fragmentacije prikazan je slikom 17.



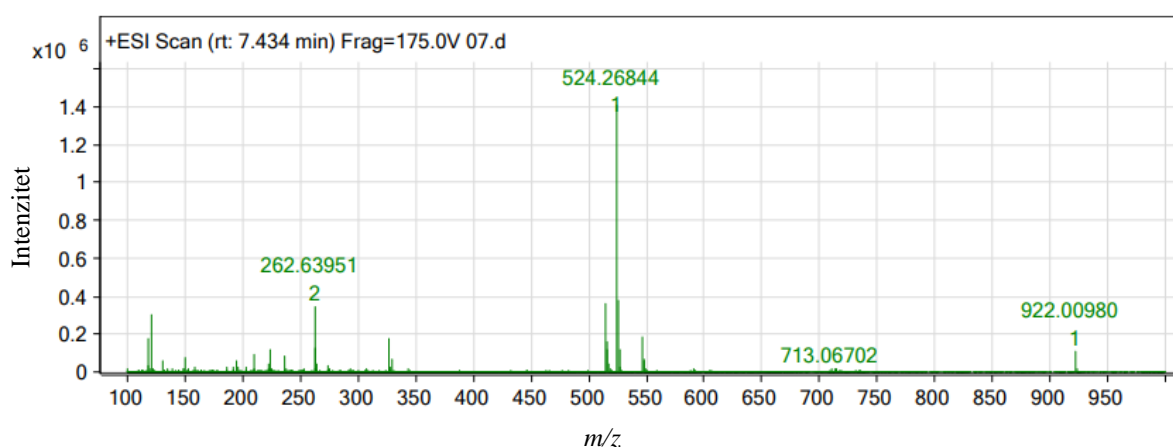
Slika 17. Fragmentacija razgradnog produkta **RP4**,  $m/z$  590

#### 4.2.2. Identifikacija razgradnih produkata u bazičnim uvjetima

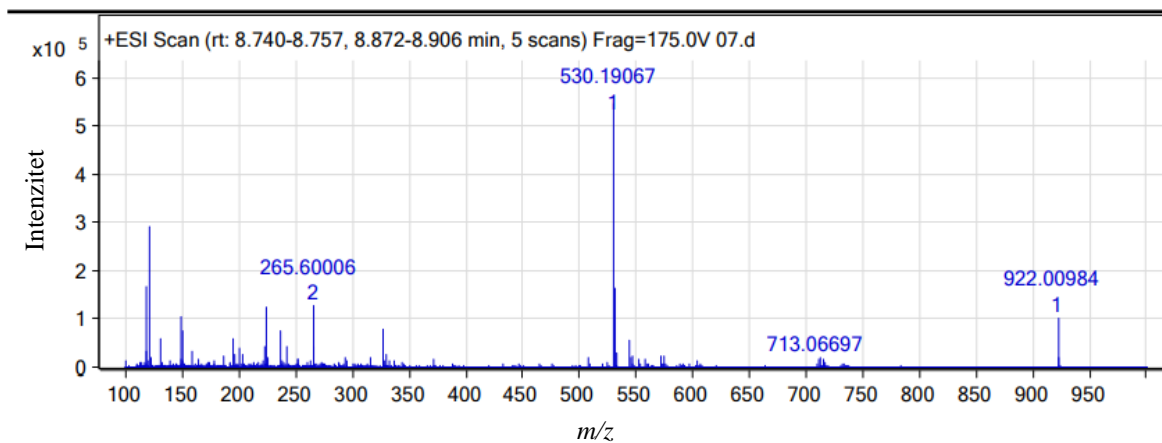
Sniman je uzorak u kojemu je provedena forsirana razgradnja ceritiniba potaknuta otopinom NaOH. Na osnovi masa fragmenata očitanih iz MS spektra (slike 18 – 20) pretpostavljene su strukture razgradnih produkata koje se nalaze u tablici 6. U slučaju spektra masa prikazanog na slici 18. vidljiv je izotopni signal  $(M+2)^+$  karakterističan za molekule koje imaju u sebi atom klora.



Slika 18. MS spektar razgradnog produkta **RP5** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u bazičnim uvjetima



Slika 19. MS spektar razgradnog produkta **RP6** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u bazičnim uvjetima



Slika 20. MS spektar razgradnog produkta **RP7** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u bazičnim uvjetima

Tablica 6. Razgradni produkti ceritiniba nakon forsirane razgradnje potaknute otopinom NaOH i njihove strukture

Razgradni produkt	Kemijska formula	M + 1	Točna masa	Struktura
RP5	$C_{19}H_{25}ClN_4O_2$	377,2	376,2	
RP6	$C_{28}H_{37}N_5O_3S$	524,3	523,3	
RP7	$C_{30}H_{35}N_5O_2S$	530,2	529,2	

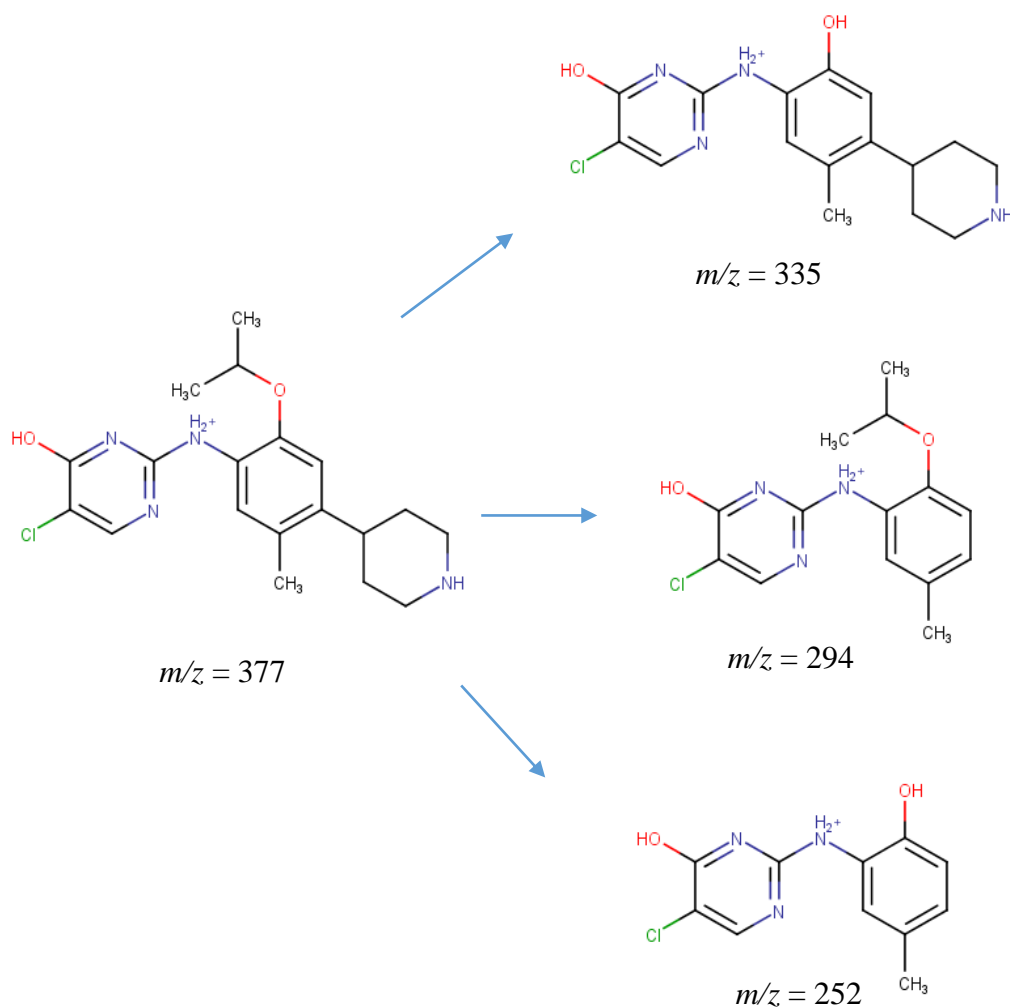
U tablici 7. navedene su mase nastalih fragmenata ceritiniba nakon forsirane razgradnje potaknute otopinom NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  i njihova relativna vremena zadržavanja. MS/MS spektri nalaze se u dodatku (slike D5 - D7). Na temelju struktura razgradnih produkata ceritiniba i masa nastalih fragmenata pretpostavljen je način fragmentacije.

Tablica 7. Relativna vremena zadržavanja razgradnih produkata ceritiniba nastalih forsiranom razgradnjom u otopini NaOH i njihovi fragmenti nakon analize MS/MS-om

RAZGRADNI PRODUKT	RELATIVNO VRIJEME ZADRŽAVANJA $(t_{R(RP)}/t_{R(CERITINIB)}) /$ min	POČETNI ION $m/z$	ENERGIJA SUDARA / eV	IONI PRODUKTI $m/z$
RP5	0,49	377	20	335, 294, 252
RP6	0,8	524	30	482, 464, 441, 422, 399
RP7	0,95	530	20	289, 261

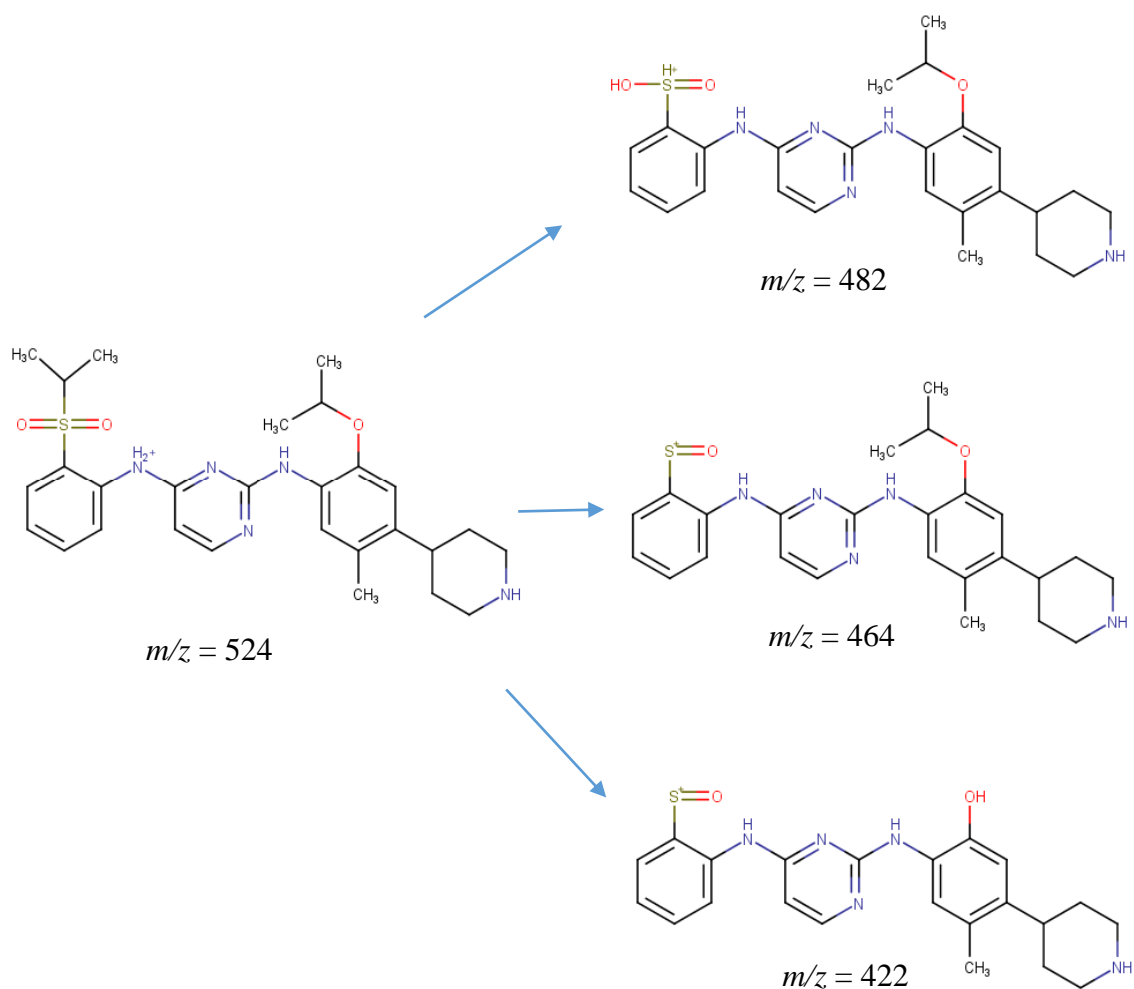


Signal protonirane molekule **RP5** opažen je pri vrijednosti  $m/z$  377, što odgovara molekulskoj formuli  $[C_{19}H_{26}ClN_4O_2]^+$ . U MS/MS spektru razgradnog produkta **RP5** (slika D5) mogu se uočiti signali iona produkata pri vrijednostima  $m/z$ : 335 (gubitak  $C_3H_6$ ), 294 (gubitak  $C_5H_{10}N$ ), 252 (gubitak  $C_3H_6-C_5H_{10}N$ ). Pretpostavljeni način fragmentacije prikazan je slikom 21.



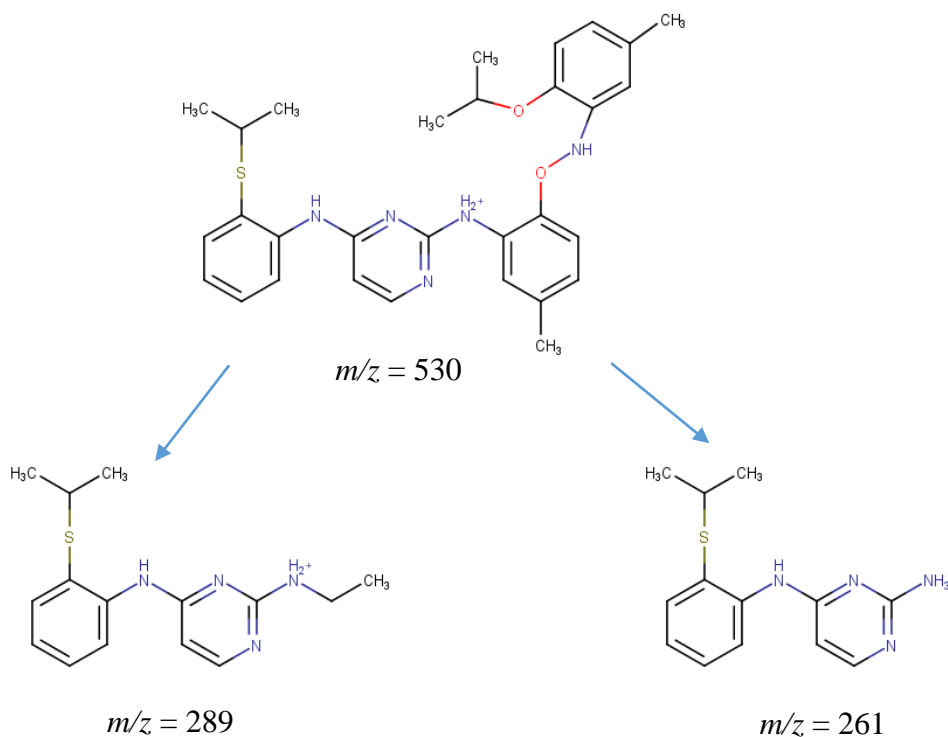
Slika 21. Fragmentacija razgradnog produkta **RP5**,  $m/z$  377

Signal protonirane molekule **RP6** opažen je pri vrijednosti  $m/z$  524, što odgovara molekularnoj formuli  $[C_{28}H_{38}N_5O_3S]^+$ . MS/MS spektar razgradnog produkta **RP6** prikazan je na slici D6. Signali iona produkata su pri vrijednostima  $m/z$ : 482 (gubitak  $C_3H_6$ ), 464 (gubitak  $C_3H_6-H_2O$ ), 422 (gubitak  $C_3H_6-H_2O-C_3H_6$ ). Pretpostavljeni način fragmentacije prikazan je slikom 22.



Slika 22. Fragmentacija razgradnog produkta **RP6**,  $m/z$  524

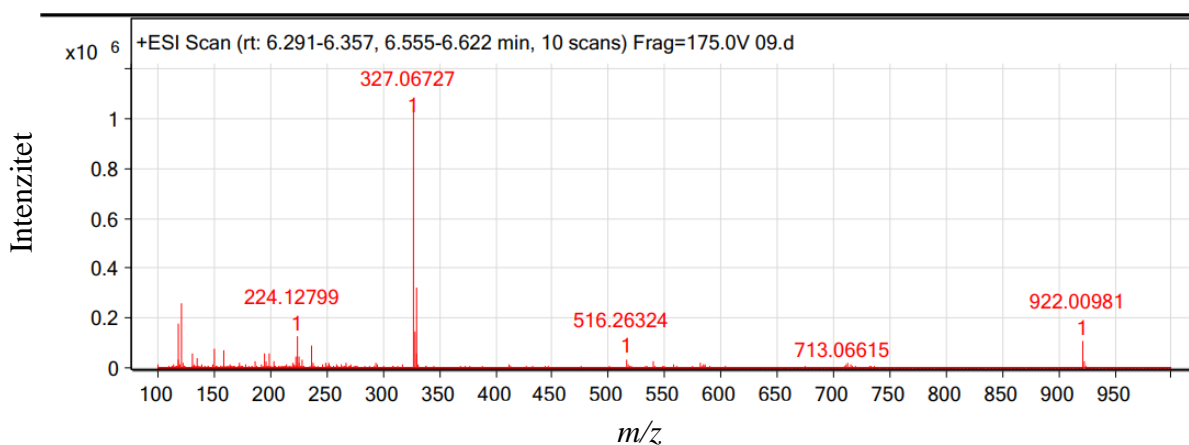
Signal protonirane molekule **RP7** opažen je pri vrijednosti  $m/z$  530, što odgovara molekulskoj formuli  $[C_{30}H_{36}N_5O_2S]^+$ . U MS/MS spektru razgradnog produkta **RP7** (slika D7) mogu se uočiti signali iona produkata pri vrijednostima  $m/z$ : 289 (gubitak  $C_3H_6-O-C_6H_3-CH_3-NH-O-C_4H_2-CH_3$ ), 261 (gubitak  $C_3H_6-(O-C_6H_3-CH_3)_2-NH$ ). Pretpostavljeni način fragmentacije prikazan je slikom 22.



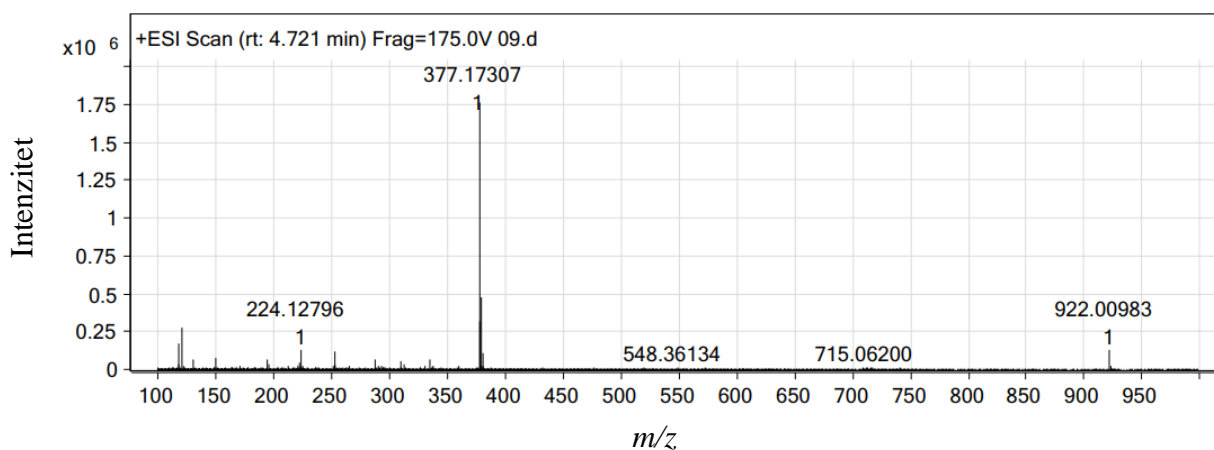
Slika 23. Fragmentacija razgradnog produkta **RP7**,  $m/z$  530

#### 4.2.3. Identifikacija razgradnih produkata u kiselim uvjetima

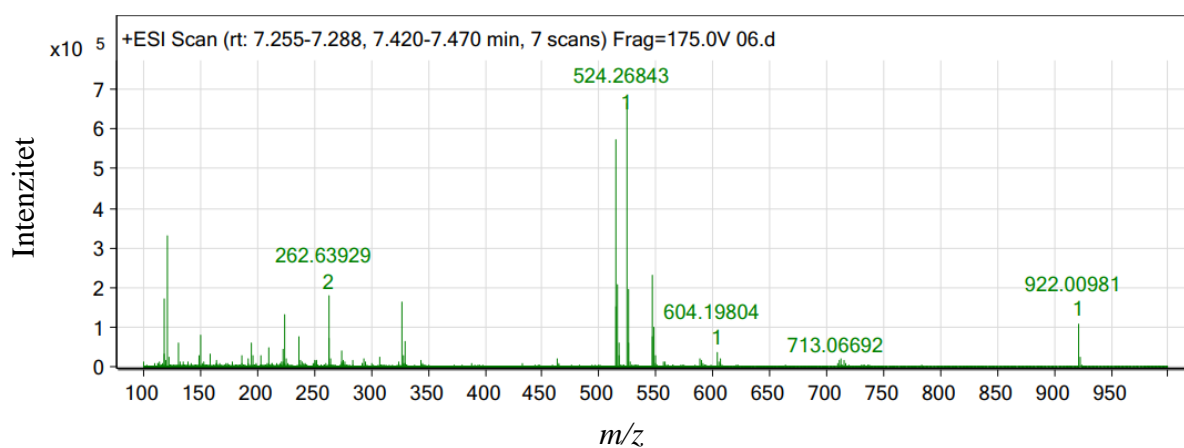
Sniman je uzorak u kojemu je provedena forsirana razgradnja ceritiniba potaknuta otopinom HCl. Na osnovi masa fragmenata dobivenih iz MS spektara (slike 23 – 25) pretpostavljene su strukture razgradnih produkata koje se nalaze u tablici 8.



Slika 23. MS spektar razgradnog produkta **RP2** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u kiselim uvjetima



Slika 24. MS spektar razgradnog produkta **RP5** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u kiselim uvjetima



Slika 25. MS spektar razgradnog produkta **RP6** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u kiselim uvjetima

Tablica 8. Razgradni produkti ceritiniba nakon forsirane razgradnje potaknute otopinom HCl i njihove strukture

Razgradni produkt	Kemijska formula	M + 1	Točna masa	Struktura
RP5	$C_{19}H_{25}ClN_4O_2$	377,2	376,2	
RP2	$C_{13}H_{15}ClN_4O_2S$	327,07	326,06	
RP6	$C_{28}H_{37}N_5O_3S$	524,3	523,3	

U tablici 9. navedene su mase nastalih fragmenata ceritiniba nakon forsirane razgradnje u prisutnosti otopine NaOH koncentracije  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$  gdje su prikazana i njihova relativna vremena zadržavanja. MS/MS spektri nalaze se u dodatku (slike D8 - D10). Na temelju struktura razgradnih produkata ceritiniba i masa nastalih fragmenata pretpostavljen je način fragmentacije.

Tablica 9. Relativna vremena zadržavanja razgradnih produkata ceritiniba nastalih forsiranom razgradnjom u otopini HCl i njihovi fragmenti nakon analize MS/MS-om

RAZGRADNI PRODUKT	RELATIVNO VRIJEME ZADRŽAVANJA ( $t_{R(RP)}/t_{(CERITINIB)}$ ) / min	POČETNI ION $m/z$	ENERGIJA SUDARA / eV	IONI PRODUKTI $m/z$
RP5	0,49	377	20	335, 294, 252
RP2	0,79	327	20	285, 267, 219
RP6	0,88	524	30	482, 364, 441, 399

Masa molekulskih iona kao i masa iona produkata nastalih forsiranom razgradnjom u kiselim uvjetima već su identificirani kao razgradni produkti ceritiniba nastali u oksidativnim (**RP2**), odnosno bazičnim (**RP5** i **RP6**) uvjetima razgradnje, te su pretpostavljeni načini fragmentacije prikazani slikama 15, 21 i 22.

### 4.3. Rasprava rezultata dobivenih forsiranom razgradnjom i 2D-LC-MS analizom

Razgradnja ceritiniba rađena je prema uvjetima iz rada S. Kapavarapu i suradnici, u kojem je razvijena i validirana metoda za određivanje ceritiniba u gotovom lijeku. Kako bi nastali razgradni produkti ceritiniba, otopina uzorka podvrgnuta je utjecaju kiseline, lužine i oksidansa, uz različita vremena i temperature zagrijavanja. Pri tome su korištene vodene otopine 20 % i 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, te otopine kiseline (HCl) i baze (NaOH) koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i  $c = 5 \text{ mol L}^{-1}$ .

Najizraženija razgradnja ceritiniba postignuta je u oksidirajućim uvjetima, dodatkom 20 % i 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Do raspada je došlo pri najblažim uvjetima razgradnje (zagrijavanje pri 60 °C u trajanju 30 minuta), dok je za nastajanje razgradnih produkata ceritiniba u prisutnosti kiseline i lužine bilo potrebno koristiti jače uvjete razgradnje. Navedeno ukazuje na nestabilnost ceritiniba u oksidativnim uvjetima, u kojima nastaju razgradni produkti **RP1**, **RP2**, **RP3** i **RP4**. Pri bazičnim uvjetima hidrolize uz ekstremnije uvjete razgradnje, nastali su razgradni produkti **RP5**, **RP6** i **RP7**, dok su razgradni produkti pri kiselim uvjetima hidrolize **RP2** – jednak kao

pri razgradnji u oksidirajućim uvjetima, te **RP5** i **RP6** – jednaki kao pri razgradnji u bazičnim uvjetima razgradnje.

Uzorci pripremljeni za forsiranu razgradnju analizirani su instrumentom 2D-LC-MS. Iz dobivenih spektara masa očitane su mase fragmenata. Nastali fragmenti s određenim vrijednostima  $m/z$  dodatno su analizirani tandemnom spektrometrijom masa. Na izdvojene fragmente djelovano je energijama sudara jakosti 0, 10, 20, 30 i 40 eV. Jasna fragmentiranja uočena su korištenjem energije sudara jakosti 20 i 30 eV, dok su veće vrijednosti dovele do prevelikog raspada i porasta šuma instrumenta. Na osnovu spektara masa pretpostavljene su strukture razgradnih produkata te njihove moguće fragmentacije.



## § 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je identificirati razgradne produkte ceritiniba. Za odvajanje razgradnih produkata i certiniba najprije je korištena tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti. Za identifikaciju i strukturno određivanje razgradnih produkata korištena je tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa.

Za nastajanje razgradnih produkata ceritiniba, otopina uzorka podvrgnuta je utjecaju kiseline, lužine i oksidansa, uz različita vremena i temperature zagrijavanja. Analizom rezultata dobivenih tehnikom UHPLC uvidjelo se da do najveće razgradnje ceritiniba dolazi u prisutnosti peroksida, gdje je do razgradnje došlo pri blažim uvjetima od onih koji su korišteni za nastajanje razgradnih produkata u prisutnosti kiseline i lužine. Navedeno ukazuje na nestabilnost ceritiniba u oksidativnim uvjetima.

Uzorci za forsiranu razgradnju potom su analizirani sustavom 2D-LC-MS. Snimljeni su maseni spektri razgradnih produkata. Izdvojeni su pikovi s većim masama i njihova vremena zadržavanja te je provedena analiza tandemne spektrometrije masa, odnosno snimljeni su MS/MS spektri. Na osnovu fragmentacije i masa nastalih fragmenata pretpostavljene su strukture razgradnih produkata kao i način fragmentacije produkata.

Identificirano je 7 razgradnih produkata nastalih procesom forsirane razgradnje: **RP1**, **RP3** i **RP4** (nastali u oksidativnim uvjetima), **RP2** (nastao u oksidativnim i kiselim uvjetima), **RP5** i **RP6** (nastali u kiselim i bazičnim uvjetima hidrolize), te **RP7** (nastao u bazičnim uvjetima hidrolize).

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

OZNAKA	NAZIV
$\alpha$	Faktor razdvajanja
ACN	Acetonitril
ALK	Kinaza aplastičnog limfoma
BEH čestice	Hibridne čestice povezane etilenskim mostom (engl. <i>Bridged – Ethylene Hybrid Particles</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vodikov peroksid
HCl	Kloridna kiselina
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> )
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. <i>International Conference on Harmonisation</i> )
ESI	Ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>ElectroSpray Ionization</i> )
FDA	Organizacija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
$k$	Faktor zadržavanja
LC	Tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid Chromatography</i> )
LC-MS/MS	Tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa (engl. <i>Liquid</i>

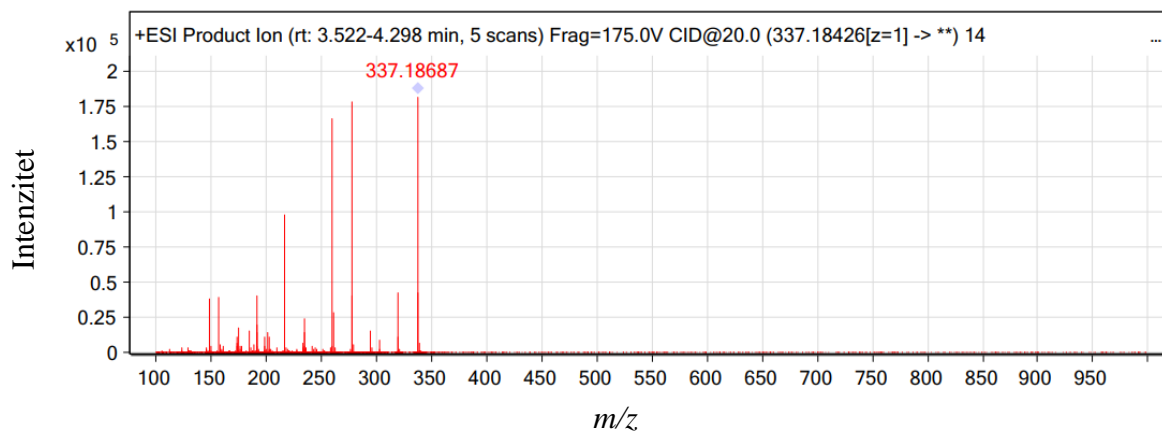
	<i>Chromatography tandem Mass Spectrometry)</i>
<b>MS detektor</b>	Spektrometar masa kao detektor (engl. <i>Mass – Spectrometry Detector</i> )
<i>m/z</i>	Omjer mase i naboja (engl. <i>Mass-Charge ratio</i> )
<i>N</i>	Broj teorijskih tavana
<b>NaOH</b>	Natrijev hidroksid
<b>NSCLC</b>	Rak pluća nemalih stanica (engl. <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> )
<b>Q</b>	Kvadrupolni analizator masa (engl. <i>Quadrupole</i> )
<b>RP</b>	Razgradni produkt
<i>r<sub>R</sub></i>	Relativno vrijeme zadržavanja
<i>R<sub>s</sub></i>	Razlučivanje
<b>SIM</b>	Metoda praćenja stabilnosti (engl. <i>Stability Indicating Method</i> )
<b>TOF</b>	Analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. <i>Time of Flight</i> )
<i>t<sub>R</sub></i>	Vrijeme zadržavanje
<b>UHPLC</b>	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. <i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>UV/VIS</b>	Ultraljubičasto-vidljiva spektroskopija
<i>w<sub>b</sub></i>	Širina osnovice kromatografske krivulje

## § 7. LITERATURNI IZVORI

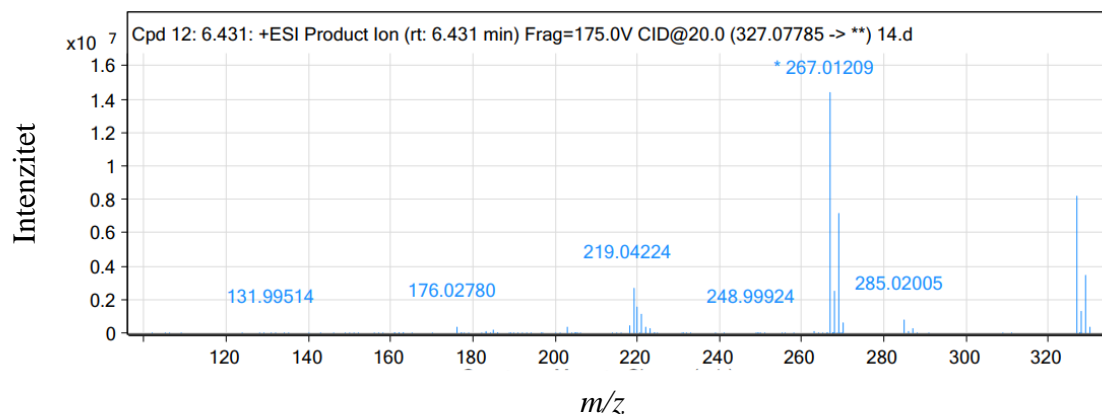
1. A. Arunachalam, M. Shankar, *Asian J. Pharm. Anal. Med. Chem.* **1** (2013) 184–195.
2. S. Narayan, C. Manupiya, *Int. J. Appl. Pharm. Biol. Res.* **2** (2017) 67–75.
3. I. Ursić, *Prednosti tekućinske kromatografije ultra visoke učinkovitosti u razvoju stabilitetno-indikativne metode za kontrolu kakvoće nepafenaka*, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 3-22.
4. T. Rawat, I. P. Pandey, *J. Pharm. Sci. Res.* **7** (2015) 238–241.
5. [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170726138214/anx\\_138214\\_hr.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170726138214/anx_138214_hr.pdf) (datum pristupa 23. lipnja 2018.)
6. S. Kapavarapu, N. Mopidevi, R. Chintala, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **8** (2015) 44–51.
7. M. Santarpia, M. G. Daffina, A. D'Aveni, G. Marabello, A. Liguori, E. Giovannetti, N. Karachaliou, M. G. Cao, R. Rosell, G. Altavilla, *Drug. Des., Dev. Ther.* **11** (2017) 2047–2063.
8. M. W. Burns, E. S. Kim, *Lung Cancer: Targets Ther.* **6** (2015) 35–42.
9. *FDA Expands Approval of ceritinib for ALK-positive non-small cell lung cancer*, 27. lipnja 2017., *Nacional Cancer Institute*, [www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/fda-ceritinib-nsclc](http://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2017/fda-ceritinib-nsclc) (datum pristupa 23. lipnja 2018.)
10. New Drugs, *Aust. Prescr.* **40** (2017) 82–83.
11. J. Jean Cui, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 6342–6363.
12. *Impurities in new drug products Q3B(R2)*, 02. lipnja 2006., *ICH Harmonised tripartite guideline*, [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3B\\_R2/Step4/Q3B\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf) (datum pristupa 28. lipnja 2018.)
13. A. R. Mladenović, *Proučavanje stabilnosti donepezil-hidroklorida različitim analitičkim metodama*, Doktorski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2015, str.22–52.
14. *Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*, 06. veljače 2003., *ICH harmonised tripartite guideline*,

- [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf) (datum pristupa 28. lipnja 2018.)
15. D. W. Reynolds, K. L. Facchine, J. F. Mullaney, *Pharm. Technol.* **26** (2002) 48–56.
  16. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, *J. Pharm. Anal.* **4** (2014) 159–165.
  17. M. Thammana, Res. Rev.: *J. Pharm. Anal.* **5** (2016) 22–28.
  18. O. Coskun, *North. Clin. Istanb.* **3** (2016) 156–160.
  19. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
  20. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina* **45** (2009) 218–232.
  21. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, *Školska knjiga*, Zagreb, (2003) 217–235.
  22. M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, *Mentor d.o.o.*, Zagreb, (2014) 97–99.
  23. [http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/glossary/df\\_rel.html](http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/glossary/df_rel.html) (datum pristupa 11. srpnja 2018.)
  24. M. Wada, S. M. Alkhalil, K. Nakashima, *Jordan J. Pharm. Sci.* **1** (2008) 1–27.
  25. K. G. Sheliya, K. V. Shah, *Pharma Sci. Monit.* **4** (2013) 78–99.
  26. T. H. Walter, R. W. Andrews, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **63** (2014) 14–20.
  27. A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Appl. Spectrosc. Rev.* **44** (2009) 210–230.
  28. N. Galić, *Spektrometrija masa*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
  29. E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass spectrometry: Principles and Applications, *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester, (2007)
  30. N. Galić, *Kem. Ind.* **53** (2004) 117–123.
  31. S. M. Baira, P. D. Kalariya, R. Nimbalkar, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **32** (2018) 212–220.
  32. <https://slideplayer.com/slide/14267584/> (datum pristupa 07. siječnja 2019.)

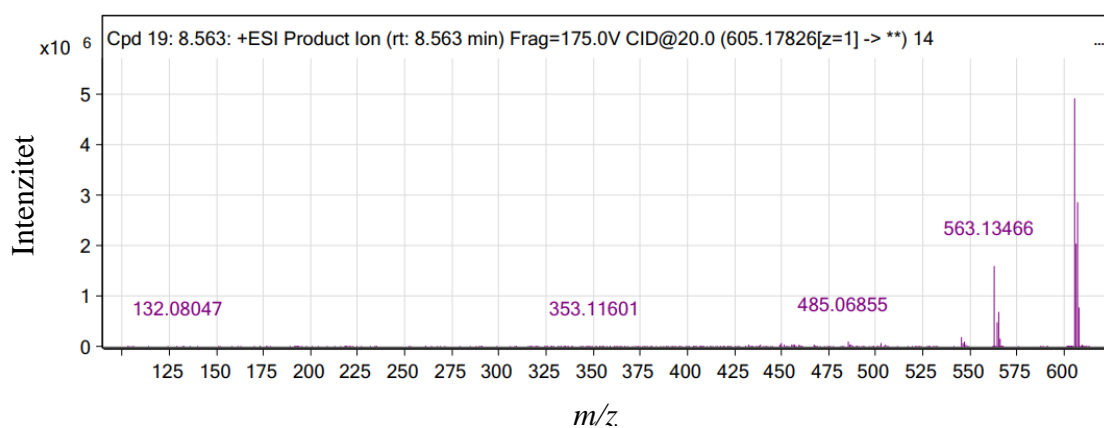
## § 8. DODATAK



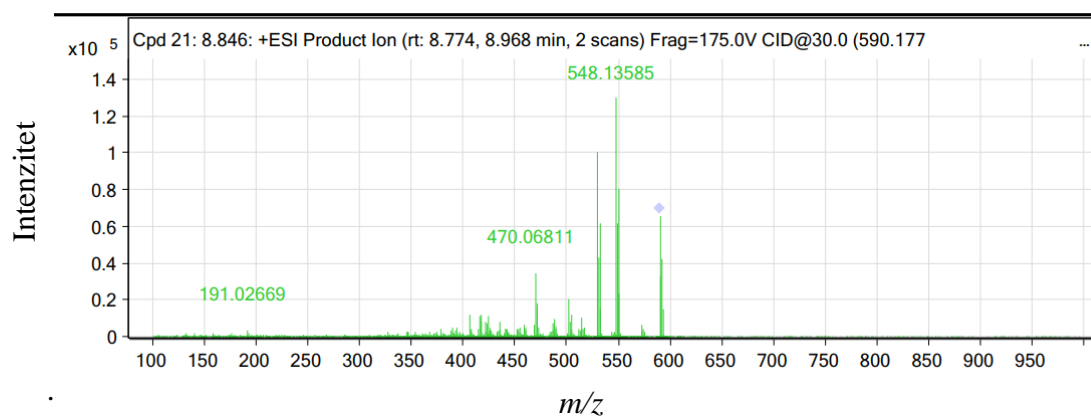
Slika D1. MS/MS spektar produkta **RP1** nastalog u oksidativnim uvjetima forsirane razgradnje ceritiniba pri energiji sudara jakosti 20 eV



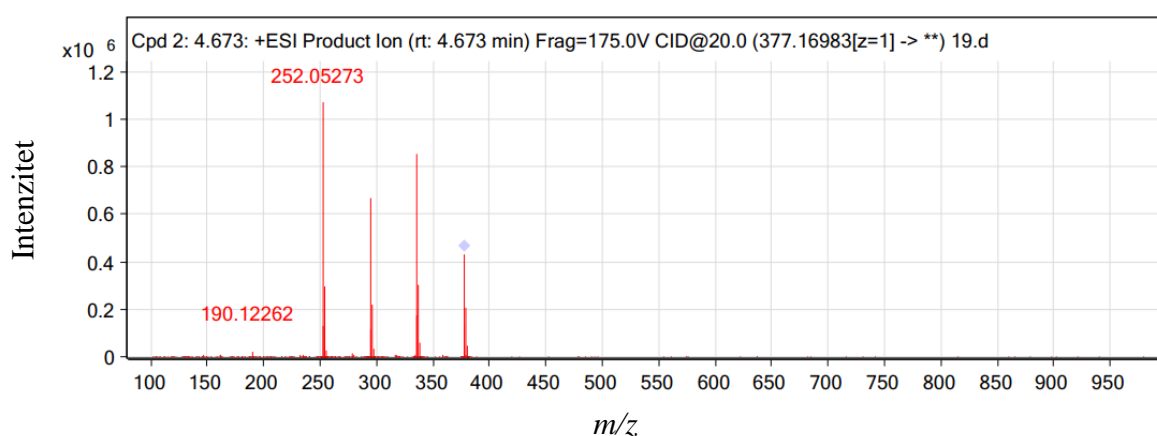
Slika D2. MS/MS spektar produkta **RP2** nastalog u oksidativnim uvjetima forsirane razgradnje ceritiniba pri energiji sudara jakosti 20 eV



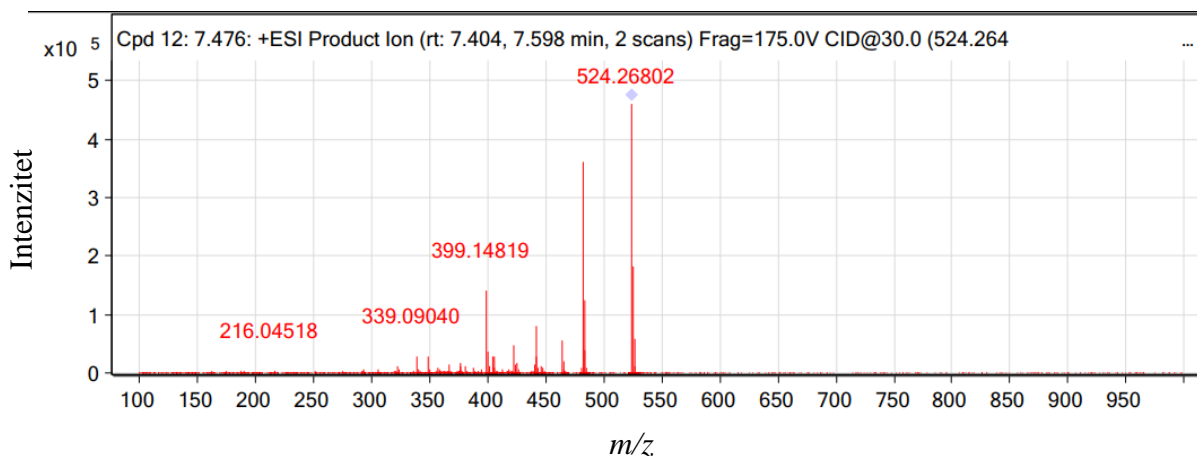
Slika D3. MS/MS spektar produkta **RP3** nastalog u oksidativnim uvjetima forsirane razgradnje ceritiniba pri energiji sudara jakosti 20 eV



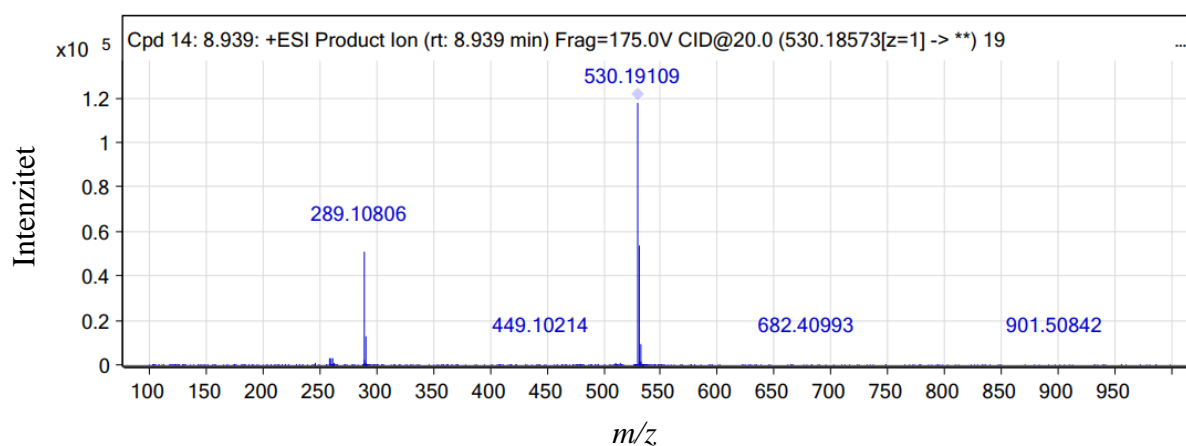
Slika D4. MS/MS spektar produkta **RP4** nastalog u oksidativnim uvjetima forsirane razgradnje ceritiniba pri energiji sudara jakosti 30 eV



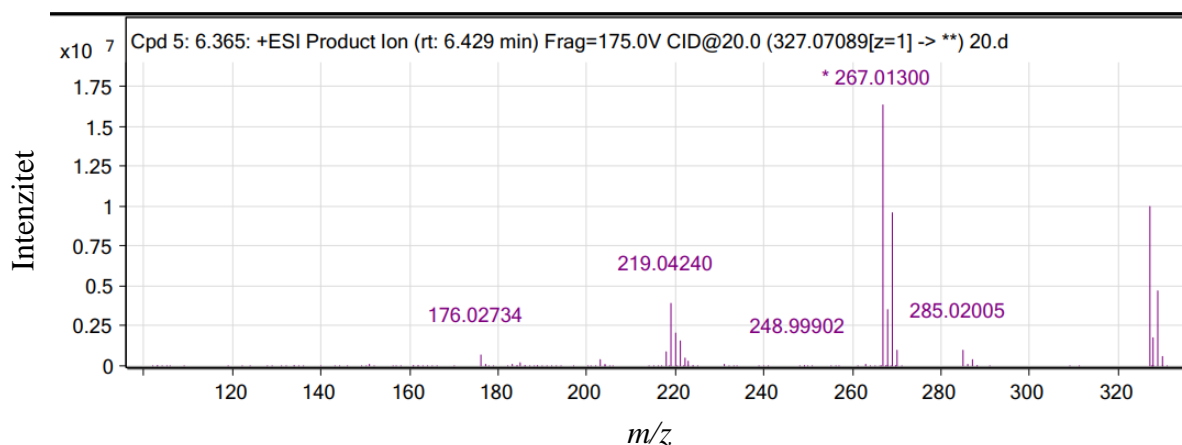
Slika D5. MS/MS spektar produkta **RP5** nastalog u bazičnim uvjetima forsirane razgradnje ceritiniba pri energiji sudara jakosti 20 eV



Slika D6. MS/MS spektar produkta **RP6** nastalog u bazičnim uvjetima forsirane razgradnje ceritiniba pri energiji sudara jakosti 30 eV

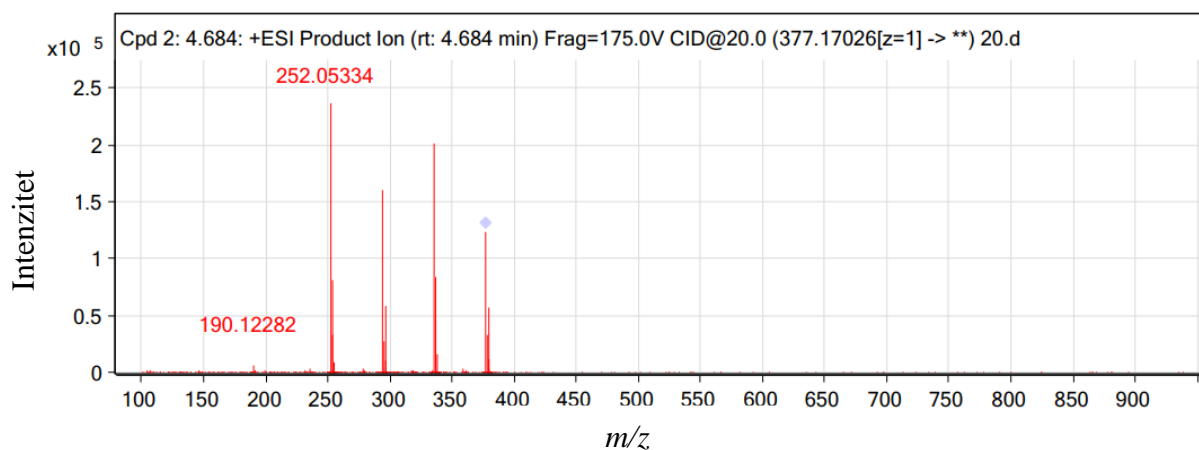


Slika D7. MS/MS spektar produkta **RP7** nastalog u bazičnim uvjetima forsirane razgradnje ceritiniba pri energiji sudara jakosti 20 eV

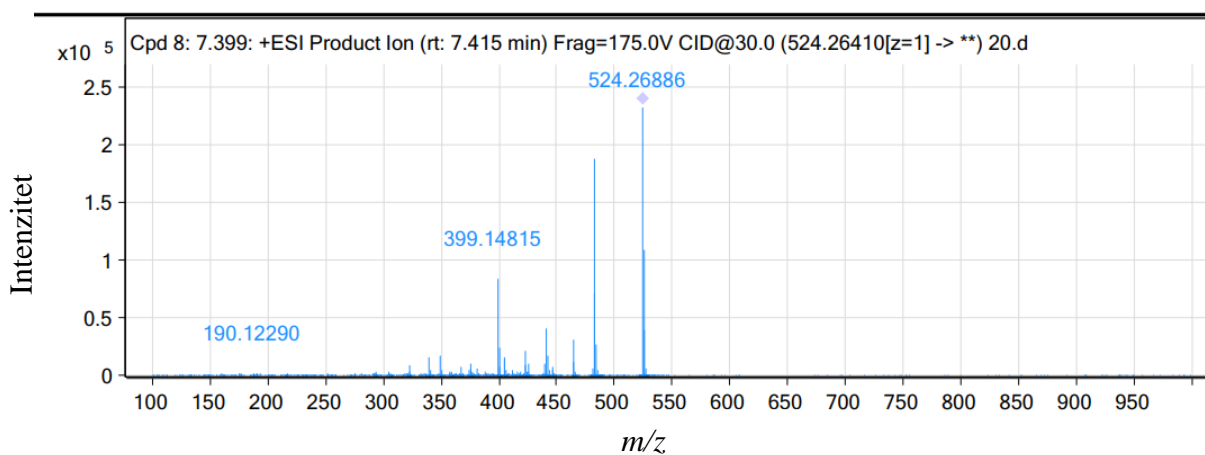


Slika D8. MS/MS spektar produkta **RP2** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u kiselim uvjetima hidrolize pri energiji sudara jakosti 20 eV





Slika D9. MS/MS spektar produkta **RP5** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u kiselim uvjetima hidrolize pri energiji sudara jakosti 20 eV



Slika D10. MS/MS spektar produkta **RP6** nastalog forsiranom razgradnjom ceritiniba u kiselim uvjetima hidrolize pri energiji sudara jakosti 30 eV

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Martina Kovačević

Datum rođenja: 03. srpnja 1992.

Mjesto rođenja: Beč (Austrija)

### Obrazovanje

- |           |   |
|-----------|---|
| 1999–2007 | Osnovna škola „Vladimir Nazor“, Odžak (Bosna i Hercegovina)   |
| 2007–2011 | Srednja škola „Pero Zečević“, Opća gimnazija, Odžak (Bosna i Hercegovina)   |
| 2011–2016 | Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb  |
| 2016–2019 | Diplomski sveučilišni studij kemije, Istraživački smjer, Analitička kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb |
| 2018      | Erasmus+ stručna praksa, Institut za medicinsku kemiju i patobiokemiju, Medicinsko sveučilište u Beču, Beč (Austrija)                                     |

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- |           |  |
|-----------|--|
| 2017–2018 | Otvoreni dan PMF-a, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb |
| 2017      | Smotra sveučilišta, Zagreb                                     |