

Određivanje onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba

Antolčić, Mia

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:748219>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-03**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mia Antolčić

ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA I RAZGRADNIH PRODUKATA CERITINIBA

DOKTORSKI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Mia Antolčić

DETERMINATION OF CERITINIB IMPURITIES AND DEGRADATION PRODUCTS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. Nives Galić, Professor

Zagreb, 2021

Predgovor

Velika hvala Mislavu na pruženoj podršci prilikom izrade eksperimenata, te na poticajima da čim prije probam odraditi najzahtjevnije dijelove cijelog procesa.

Posebna zahvala mentorici Nives Galić na prihvaćanju ove uloge te besprijekornom i nesebičnom vođenju kroz sve faze studija uz beskonačnu dostupnost za svako pitanje i nedoumicu.

Hvala mami, tati i Tei na podršci i poticajima tijekom studija, hvala što ste uvijek uz mene!

Hvala Igoru i Ani na predivnoj radnoj atmosferi i prijateljstvu koje mi je pomoglo da nakon radnog dana nalazim motivaciju za rad na doktoratu.

Najveća hvala Domagoju za svakodnevnu motivaciju i potporu bez kojih bih jako teško izdržala ovaj tempo do kraja studija.

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. Ceritinib i njegovo terapijsko djelovanje.....	4
2.1.1. <i>Ceritinib</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>ALK i mehanizam djelovanja ceritiniba.....</i>	<i>5</i>
2.2. Onečišćenja u aktivnim djelatnim tvarima.....	6
2.2.1. <i>Onečišćenja-definicija i podjela</i>	<i>6</i>
2.2.2. <i>Genotoksična onečišćenja.....</i>	<i>8</i>
2.2.3. <i>Kontrola genotoksičnih onečišćenja</i>	<i>8</i>
2.2.4. <i>Forsirana razgradnja.....</i>	<i>11</i>
2.2.5. <i>Uvjeti forsirane razgradnje.....</i>	<i>12</i>
2.2.6. <i>Forsirana razgradnja ceritiniba</i>	<i>13</i>
2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	13
2.3.1. <i>Parametri kromatografije</i>	<i>14</i>
2.3.2. <i>Dijelovi kromatografa HPLC.....</i>	<i>16</i>
2.3.3. <i>Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....</i>	<i>18</i>
2.4. Spektometrija masa	20
2.4.1. <i>Ionizacija elektroraspršenjem.....</i>	<i>21</i>
2.4.2. <i>Kvadrupolni analizator masa.....</i>	<i>22</i>
2.4.3. <i>Analizator vremena leta</i>	<i>23</i>
2.5. Validacija analitičkih metoda	25
2.5.1. <i>Parametri validacije analitičkih metoda.....</i>	<i>25</i>
2.6. Kvaliteta ugrađena u dizajn.....	27
2.6.1. <i>Solvofobna teorija.....</i>	<i>29</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	34
3.1. Polazni materijali	34
3.2. Oprema i instrumenti	37
3.3. Nepokretne faze korištene u razvoju metoda	39
3.3.1. <i>Nepokretne faze korištene prilikom razvoja metode za analizu genotoksičnih onečišćenja ceritiniba.....</i>	<i>39</i>

3.3.2. <i>Nepokretne faze korištene prilikom razvoja metode za analizu onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba</i>	40
3.4. Pokretne faze i otapala	41
3.4.1. <i>Pokretne faze i otapala korišteni prilikom razvoja metoda za analizu genotoksičnih onečišćenja ceritiniba</i>	41
3.4.2. <i>Pokretne faze i otapala korišteni prilikom razvoja metode za analizu onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba</i>	41
3.5. Priprema uzoraka i razvoj metode za analizu genotoksičnih onečišćenja	42
3.5.1. <i>Priprema otopina uzoraka za razvoj metode UHPLC</i>	42
3.5.2. <i>Priprema otopina za podešavanje parametara analize</i>	42
3.5.3. <i>Razvoj metode UHPLC-MS/MS</i>	42
3.5.4. <i>Priprema otopina za određivanje linearnosti te granica kvantifikacije i detekcije</i>	43
3.5.5. <i>Priprema otopina za određivanje točnosti</i>	44
3.5.6. <i>Određivanje ponovljivosti metode</i>	45
3.5.7. <i>Promjena parametara metode u svrhu određivanja robustnosti</i>	45
3.5.8. <i>Stabilnost otopina</i>	45
3.6. Priprema uzoraka i razvoj metode za analizu razgradnih produkata ceritiniba	46
3.6.1. <i>Priprema otopina uzoraka za razvoj metode</i>	46
3.6.2. <i>Razvoj metode UHPLC</i>	47
3.6.3. <i>Priprema reagensa za forsiranu razgradnju</i>	48
3.6.4. <i>Priprema otopina uzoraka za forsiranu razgradnju</i>	48
3.6.5. <i>Uvjeti mjerenja analize LC-MS/MS</i>	51
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	52
4.1. Klasifikacija potencijalno genotoksičnih onečišćenja	52
4.2. Razvoj metode UHPLC za analizu potencijalno genotoksičnih onečišćenja	53
4.3. Validacija metode za analizu potencijalno genotoksičnih onečišćenja	56
4.3.1. <i>Kriteriji prihvatljivosti validacije</i>	56
4.3.2. <i>Linearnost, granice kvantifikacije i detekcije</i>	56
4.3.3. <i>Ispitivanje točnosti metode</i>	61
4.3.4. <i>Ispitivanje ponovljivosti metode</i>	62
4.3.5. <i>Robusnost metode</i>	63
4.3.6. <i>Stabilnost otopina</i>	63
4.4. Razvoj metode UHPLC za analizu onečišćenja ceritiniba	64
4.4.1. <i>Analiza LC-MS</i>	70
4.5. Rezultati forsirane razgradnje	72
4.5.1. <i>Rezultati forsirane razgradnje u uvjetima povišene temperature</i>	72
4.5.2. <i>Rezultati forsirane razgradnje u oksidacijskim uvjetima</i>	73

4.5.3. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti kiseline	74
4.5.4. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti lužine.....	75
4.6. Rezultati analize LC-MS/MS i identifikacija razgradnih produkata ceritiniba	77
4.6.1. Identifikacija razgradnog produkta nastalog u uvjetima povišene temperature.....	77
4.6.2. Identifikacija razgradnih produkata nastalih u oksidacijskim uvjetima	79
4.6.3. Identifikacija razgradnih produkata nastalih u kiselim uvjetima	84
4.6.4. Identifikacija razgradnih produkata nastalih u bazičnim uvjetima	88
§ 5. ZAKLJUČAK	92
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	93
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	95
§ 8. DODATAK	100
§ 9. ŽIVOTOPIS	113



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ODREĐIVANJE ONEČIŠĆENJA I RAZGRADNIH PRODUKATA CERITINIBA

Mia Antolčić
Prilaz baruna Filipovića 25

Ceritinib je djelatna tvar lijeka za terapiju bolesnika s metastaziranim karcinomom pluća nemalih stanica pozitivnih na kinazu anaplastičnog limfoma. Upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s trostrukim kvadrupolnim analizatorom masa, razvijena je i validirana metoda za kvantitativno određivanje potencijalno genotoksičnih onečišćenja ceritiniba. Metoda je selektivna, specifična, linearna u rasponu od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (granica kvantifikacije) do $10 \mu\text{g L}^{-1}$, ponovljiva i robusna. Točnost metode potvrđena je određivanjem analitičkog povrata, čija je vrijednost bila u rasponu od 81,0 % do 107,3 %. Otopine uzoraka stabilne su minimalno 48 sati pri temperaturi od 4 °C. Također je razvijena metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za analizu organskih onečišćenja ceritinib djelatne tvari, te je ista korištena za analizu nastalih razgradnih produkata ceritiniba. Razgradnja ceritiniba postignuta je pri povišenoj temperaturi, te u oksidacijskim, kiselim, i bazičnim uvjetima uz zagrijavanje. Predložene su strukture i pripadajući fragmenti 7 nastalih razgradnih produkata (RP1-RP7) korištenjem spektrometra masa visokog razlučivanja, Q-TOF.

(99 stranica, 51 slika, 31 tablica, 91 literaturnih navoda, jezik izvornika:hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ceritinib/djelatna tvar/genotoksika/identifikacija/ lijek/onečišćenje/razgradnja

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić

Rad prihvaćen: 2. lipnja 2021.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. izv. prof. dr. sc. Šime Ukić
3. prof. dr. sc. Iva Juranović-Cindrić



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF CERITINIB IMPURITIES AND DEGRADATION PRODUCTS

Mia Antolčić
Prilaz baruna Filipovića 25

Ceritinib is an active pharmaceutical ingredient of a drug used for treatment of anaplastic lymphoma kinase-positive metastatic non-small cell lung cancer. A method for quantitation of potentially genotoxic contaminants in ceritinib was developed and validated using ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass detection with triple quadrupole analyzer. The developed method is selective, specific, linear from $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (quantification limit) to $10 \mu\text{g L}^{-1}$, with adequate repeatability and robustness. Accuracy was determined by percentage recovery method, with obtained values between 81,0 % - 107,3 %. Sample solutions are stable for at least 48 hours when stored at 4 °C. A method for organic impurities determination in ceritinib was developed using Ultra-high performance liquid chromatography. This method was also used for separation of degradation products that were obtained using stress conditions (high temperature, oxidative, acidic, and basic environment). Structures of fragments and 7 new degradation products (RP1-RP7) were proposed using high resolution mass detection, Q-TOF.

(99 pages, 51 figures, 31 tables, 91 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: active ingredient /ceritinib/degradation/drug/genotoxic/identification/impurity

Supervisor: Dr. Nives Galić, Professor

Thesis accepted: 2 June 2021

Reviewers:

Dr. Ines Primožič, Professor
Dr. Šime Ukić, Associate Professor
Dr. Iva Juranović-Cindrić, Professor

§ 1. UVOD

Ceritinib je aktivna farmaceutska komponenta lijeka komercijalnog naziva Zykadia®, 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).^{1,2}

Ceritinib djeluje kao visoko selektivan inhibitor ALK. ALK je onkogen koji se s pomoću enzima tirozin-kinaze eksprimira u protein. Ceritinib pripada organoheterocikličkim spojevima, točnije piperidinima, a molekulska masa mu je 558,138 g mol⁻¹.

NSCLC je najučestaliji tip raka pluća, pri čemu gotovo 8 % pacijenata oboljelih od karcinoma NSCLC imaju mutaciju upravo na genu ALK. Status karcinoma NSCLC pozitivnog na ALK utvrđuje se prije uvođenja terapije Zykadiom. Testiranje za NSCLC pozitivan na ALK mora se provoditi u laboratorijima s dokazanim stručnim znanjem o specifičnoj tehnologiji koja se za to koristi.^{2,3}

Mehanizam djelovanja ceritiniba je inhibicija autofosforilacije proteina ALK, fosforilacije silaznih signalnih proteina posredovane proteinom ALK i proliferacije stanica raka ovisnih o proteinu ALK *in vitro* i *in vivo*. Djelovanjem ceritiniba u konačnici dolazi do inhibicije proliferacije stanica *in vitro* i regresije tumora.^{3,4}

Onečišćenje se definira kao bilo koja komponenta nove ljekovite tvari koja nije kemijski definirana kao nova ljekovita tvar. Onečišćenja potječu iz različitih izvora, no najčešći potencijalni izvori onečišćenja su svi polazni materijali za sintezu, otapala, katalizatori, reagensi i dr. Izvor onečišćenja može biti proizvodna oprema ili pakiranje, a mogu nastati i nakon završetka proizvodnje kao razgradni produkti samog lijeka. Ponekad onečišćenja mogu biti mutagena, teratogena ili karcinogena. Trenutne zakonske regulative zahtijevaju proizvodnju djelatne tvari visoke čistoće kao i detaljno poznavanje prisutnih onečišćenja u djelatnoj tvari, pomoćnim tvarima i gotovom lijeku. Određivanje onečišćenja obuhvaća identifikaciju, strukturnu karakterizaciju i kvantitativno određivanje onečišćenja u aktivnoj tvari i gotovom lijeku. Iz tog razloga potrebno je razviti visoko osjetljive i selektivne analitičke metode koje omogućavaju određivanje djelatnih tvari i onečišćenja prisutnih u lijeku.⁵ U ovom radu razvijena je brza i selektivna kromatografska metoda za praćenje onečišćenja u ceritinib djelatnoj tvari.

Genotoksičnost obuhvaća sve vrste oštećenja DNA ili kromosoma uključujući lomove, preuređivanje adukata, mutacije, aberacije kromosoma i aneuploidiju. Pri tome se oštećuje genetski sklop, tj. DNA, te nastaju mutacije. Sustavi popravka DNA imaju važnu ulogu u održanju integriteta nasljednog materijala i podcrtavaju njegov značaj za preživljavanje stanice. Česta izloženost genotoksičnim agensima može nadvladati kapacitete popravka DNA i uzrokovati oštećenja. Genotoksični agensi su tvari koje nemaju terapijski značaj, ali mogu uzrokovati neželjene nuspojave.^{5,6} Stoga je vrlo važno provoditi analize koje mogu biti vrlo zahtjevne obzirom na niske koncentracije analita u uzorku, oko 1-5 ppm. Za takve potrebe koriste se vrlo osjetljivi analitički instrumenti sa iznimno visokom selektivnošću.⁷ S obzirom na nepostojanje podataka vezano za analizu genotoksičnih onečišćenja ceritiniba u trenutnoj literaturi, razvijena je i validirana osjetljiva i specifična metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnutom sa tandemnom spektrometrijom masa (engl. *Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry*, UHPLC–MS/MS) za kvantitativno određivanje četiriju potencijalno genotoksičnih onečišćenja ceritiniba.

Stabilnost farmaceutskog proizvoda definira se kao vremenski period tijekom kojeg lijek zadržava istovjetna svojstva i osobine koja je imao u vrijeme proizvodnje.⁸ Ispitivanje stabilnosti farmaceutskih molekula vrlo je važan proces budući da utječe na proizvodnju kvalitetnih, sigurnih i učinkovitih lijekova.⁹ Sigurnost lijekova određena je farmakološko-toksikološkim profilom same aktivne farmaceutske tvari, pri čemu se najviše pažnje daje nepoželjnim svojstvima uzrokovanim onečišćenjima. Onečišćenje je, prema smjernicama Međunarodne konferencije o usklađenosti (engl. *International Conference on Harmonisation*, ICH), svaki sastojak farmaceutskog proizvoda koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita ili pomoćna tvar.¹⁰ Stoga u svrhu osiguravanja kvalitete i sigurnosti proizvoda, Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and drug administration*, FDA) zahtijeva testiranja stabilnosti lijeka praćenjem promjene kvalitete aktivne tvari i lijeka u vremenu pod utjecajem različitih okolišnih faktora. Postoje različiti procesi ispitivanja stabilnosti: dugoročna, intermedijarna, ubrzana, te procesi forsirane razgradnje.^{9,11} Poznavanje stabilnosti molekule pomaže pri odabiru ispravnog pakiranja lijeka, prikladne formulacije, kao i pružanju odgovarajućih uvjeta skladištenja i predviđanju roka valjanosti.

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.¹¹ 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.¹¹ Forsirana razgradnja provodi se zbog dobivanja informacija o stabilnosti aktivne farmaceutske tvari i gotovog lijeka pri različitim uvjetima testiranja. Također omogućava identifikaciju razgradnih produktata nastalih iz aktivne farmaceutske tvari ili gotovog lijeka, određivanje njihovih struktura te otkrivanje mehanizma razgradnje kao što su hidroliza, oksidacija, termoliza ili fotoliza do kojih može doći prilikom razvojne faze, te razvijanje stabilnije formulacije.¹² U ovom radu ceritinib je podvrgnut procesu forsirane razgradnje utjecajem raznih stresnih uvjeta: kiselih, baznih, oksidativnih i temperaturnih. Nastajanje razgradnih produktata praćeno je metodom razvijenom za onečišćenja ceritiniba.

Informacije o onečišćenjima i mehanizmima razgradnje pružaju osnovu za razvoj i validaciju analitičke metode koja se koristi za kontrolu kvalitete i praćenje stabilnosti aktivne tvari i gotovog farmaceutika, odnosno, metode praćenja stabilnosti (engl. *Stability Indicating Method*, SIM). Cilj forsiranje razgradnje je generiranje svih potencijalnih onečišćenja koja mogu nastati nepravilnim skladištenjem proizvoda. Forsirana razgradnja omogućava sakupljanje osnovnih informacija o stabilnosti aktivne tvari i lijeka u vrlo kratkom razdoblju (do dva tjedna), te je stoga važan dio razvoja i validacije analitičke metode.^{12,13} Nakon razgradnje ceritiniba i praćenja novonastalih razgradnih produktata, metodom UHPLC-MS/MS, pomoću analizatora vremena leta (TOF), prikupljeni su podatci o masama, odnosno vrijednostima m/z nepoznatih onečišćenja, te su predložene njihove strukture i fragmentacije.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

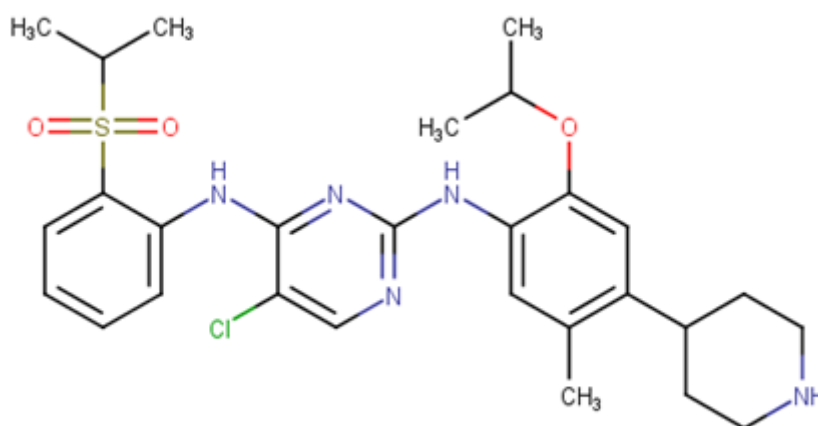
2.1. Ceritinib i njegovo terapijsko djelovanje

2.1.1. Ceritinib

Ceritinib, prema pravilima Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC), 5-kloro-2-*N*-[5-metil-4-(piperidin-4-il)-2-(propan-2-iloksi)fenil]-4-*N*-[2-(propan-2-il-sulfonil)fenil] pirimidin-2,4-diamin, je inhibitor kinaze anaplastičnog limfoma (ALK), a koristi se liječenju bolesnika s metastaziranim karcinomom nemalih stanica (NSCLC) pozitivnih na ALK. Ceritinib je poznat pod komercijalnim nazivom Zykadia®, a preporučena doza uzimanja je 750 mg, jednom dnevno, oralnim putem natašte.^{1,2}

Prva generacija standardne terapije za pacijente s ALK pozitivnim karcinomom NSCLC je crizotinib, no zbog stvaranja rezistencije na terapiju crizotinibom nakon približno 10 mjeseci korištenja, kod pacijenata su zabilježene brojne metastaze, najčešće na središnjem živčanom sustavu. Ceritinib je razvijen kao alternativa crizotinibu, pokazujući pritom dvadeset puta potentnije djelovanje u odnosu na crizotinib s aktivnošću protiv najučestalijih mutacija koje su dovodile do rezistencije na crizotinib.¹⁴

Molekulska formula ceritiniba je $C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$, a molekulska masa 558,138 g mol⁻¹. Topljivost ceritiniba u vodi iznosi 0,00222 g L⁻¹, a smanjuje se povećavanjem vrijednosti pH.¹⁰ Stoga tvari koje smanjuju kiselost (poput inhibitora protonske pumpe) mogu utjecati na topljivost ceritiniba i smanjiti njegovu bioraspoloživost.^{2,15} Kemijska struktura prikazana je na slici 1.



Slika 1. Kemijska struktura ceritiniba

Prije uvođenja terapije ceritinibom, odnosno lijekom Zykadia®, potrebno je specifičnim testom utvrditi status karcinoma NSCLC pozitivnog na ALK. Nakon provođenja testa odobrenog od strane Agencije za hranu i lijekove, te utvrđivanja statusa karcinoma, provodi se terapija.^{2,15}

2.1.2. ALK i mehanizam djelovanja ceritiniba

Kinaza anaplastičnog limfoma (ALK) je onkogen čijom ekspresijom nastaje enzim ALK receptorska tirozin-kinaza. Ovaj enzim pripada obitelji receptorskih tirozin-kinaza, čija je glavna funkcija prenošenje signala s površine stanice u samu stanicu. Sve receptorske tirozin-kinaze u svojoj strukturi sadrže domenu s veznim mjestom za ligand, hidrofobnu transmembransku α -zavojnica, te citosolnu domenu s regijom zaduženom za aktivnost enzima tirozin-kinaza. Proces započinje stimulacijom kinaze na površini stanice vezanjem liganda, čime se potiče njezino spajanje sa sličnom kinazom (dimerizacija). Nakon dimerizacije, protein-kinaza receptora svakog monomera fosforilira određene tirozinske ostatke u citosolnoj domeni dimera-partnera – aktivacija autofosforilacijom. Aktivirana kinaza potom aktivira sljedeći protein u stanici prenošenjem fosfatne skupine, te se proces nastavlja preko više proteina u obliku signalnog puta. Ovakvi signalni putevi izuzetno su bitni za mnoge stanične procese poput rasta i dijeljenja (proliferacija), te sazrijevanja (diferencijacija) stanica. Specifična funkcija enzima ALK receptor tirozin-kinaza zasad je nepoznata, no smatra se da djeluje u ranoj razvojnoj fazi stanica u svrhu regulacije proliferacije živčanih stanica.^{3,16,17,18}

Karcinom pluća je najsmrtonosnija vrsta karcinoma u svijetu, a dva glavna pod-tipa su karcinom pluća malih stanica (engl. *small cell lung cancer*) (SCLC), te karcinom pluća nemalih stanica (engl. *non-SCLC*) (NSCLC). Karcinom NSCLC je, sa preko 85 % svih slučajeva karcinoma pluća, najučestaliji oblik. NSCLC se dodatno dijeli na karcinom skvamoznih (pločastih) stanica, adenokarcinom, te karcinom velikih stanica. Ovisno o tipu i stadiju karcinoma, liječenje varira od operacije, preko radijacije i kemoterapije, do ciljane terapije. Razvojem genetike te testiranja pomoću biomarkera identificirane su pojedine specifične mutacije koje omogućavaju bolju ciljanu terapiju za pojedine pacijente.^{3,19,20}

Približno 7 % slučajeva karcinoma pluća sadrži mutaciju na genu ALK. Takve mutacije su učestale kod pacijenata mlađe životne dobi, te kod pacijenata s dijagnozom adenokarcinoma.²¹

Mehanizam djelovanja ceritiniba je inhibicija autofosforilacije proteina ALK, fosforilacije silaznih signalnih proteina posredovane proteinom ALK i proliferacije stanica raka ovisnih o proteinu ALK *in vitro* i *in vivo*. Translokacija proteina ALK određuje ekspresiju rezultirajućeg fuzijskog proteina i posljedičnu poremećenu signalizaciju proteina ALK kod karcinoma NSCLC. U većini slučajeva karcinoma NSCLC, EML4 je translokacijski partner za ALK, te se stvara fuzijski protein EML4–ALK. Ceritinib se pokazao djelotvornim protiv aktivnosti fuzijskog proteina u staničnoj liniji karcinoma, što rezultira inhibicijom proliferacije stanica *in vitro* i regresijom tumora. Antineoplastičnom aktivnošću (tvari koje inhibiraju ili sprječavaju proliferaciju neoplazme) dolazi do inhibicije rasta stanica u tumorskim stanicama u kojima je enzim ALK prekomjerno eksprimiran.^{3,4}

2.2. Onečišćenja u aktivnim djelatnim tvarima

2.2.1. Onečišćenja-definicija i podjela

Onečišćenje je, prema smjernicama Međunarodnog odbora za usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), definirano kao bilo koja komponenta nove ljekovite tvari koja nema definiran kemijski entitet kao aktivna djelatna tvar.¹⁰

Onečišćenja se prema smjernicama ICH dijele u tri kategorije⁵:

- Organska onečišćenja

- Anorganska onečišćenja
- Ostatna otapala

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom proizvodnog procesa i/ili tijekom skladištenja nove djelatne tvari. Mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapiva ili nehlapiva, a uključuju:

- a) polazne materijale
- b) nusprodukte reakcije
- c) intermedijere
- d) razgradne produkte
- e) reagense, ligande i katalizatore

Anorganska onečišćenja najčešće su produkt proizvodnog procesa. Uglavnom su poznata i identificirana, a uključuju:

- a) regense, ligande i katalizatore
- b) teške metale i ostale metale u tragovima
- c) anorganske soli
- d) ostale materijale (poput ostataka od filtracije, ugljena)⁵

Otapala su organske ili anorganske tekućine koje se koriste za pripremu otopina ili suspenzija prilikom sinteze nove djelatne tvari. Toksikološki profil otapala je uglavnom poznat, stoga ih je znatno lakše kontrolirati u skladu sa smjernicama ICH za ostatna otapala (ICH Guideline Q3C on Residual Solvents)²².

Kvalifikacija onečišćenja je proces prikupljanja i evaluacije podataka koji potvrđuju da je pojedino onečišćenje na određenoj koncentraciji biološki sigurno (neškodljivo). Za kvalifikaciju onečišćenja potrebno je stoga provesti sigurnosno ili kliničko ispitivanje kojim se dokazuje da je djelatna tvar u kojoj je prisutno to onečišćenje, ispod određene koncentracije, sigurna za ljudsku primjenu.⁵

S obzirom na maksimalnu dnevnu dozu lijeka, odnosno najveću dozu koja je dokazano sigurna za ljudsku primjenu, određene su granice kvantifikacije, identifikacije i kvalifikacije onečišćenja.⁵

Tablica 1. Propisane granice kvantifikacije, identifikacije i kvalifikacije onečišćenja. ⁵

Maksimalna dnevna doza	Granica kvantifikacije	Granica identifikacije	Granica kvalifikacije
$\leq 2 \text{ g dan}^{-1}$	0,05 %	0,10 % ili $1,0 \text{ mg dan}^{-1}$ (ovisno koja granica je niža)	0,15 % ili $1,0 \text{ mg dan}^{-1}$ (ovisno koja granica je niža)
$> 2 \text{ g dan}^{-1}$	0,03 %	0,05 %	0,05 %

2.2.2. Genotoksična onečišćenja

Onečišćenja ponekad mogu biti mutagena, teratogena ili karcinogena. Genotoksičnost označava proces u kojem pojedina tvar ima štetni utjecaj na DNA i ostale stanične tvari koje kontroliraju integritet genetičkog materijala.²³ Genotoksičnost stoga obuhvaća sve procese koji mijenjaju strukturu, informacijski sadržaj ili segregaciju DNA, koji nisu nužno povezani s mutagenošću. Testovi za genotoksičnost zato uključuju i one testove koji procjenjuju štetu prouzrokovanu na DNA bez direktnog dokaza da je došlo do mutacije. Sustavi za popravak DNA imaju važnu ulogu u očuvanju integriteta nasljednog materijala i preživljavanje stanice, no česta izloženost genotoksičnim agensima može nadvladati kapacitete popravka DNA i uzrokovati oštećenja.^{23,24} Genotoksični agensi su dakle tvari koje nemaju terapijski značaj, ali mogu uzrokovati neželjene nuspojave.²⁵

Prisutnost ljekovitih tvari i pripadajućih onečišćenja koja jesu, ili mogu biti DNA-reaktivne, predstavlja velike probleme farmaceutskoj industriji i regulacijskim agencijama unazad nekoliko desetljeća. Zabrinutost ponajprije proizlazi iz mogućnosti da izloženost takvim lijekovima (osobito ako se lijekovi troše dulji vremenski period) može izazvati gore navedena onečišćenja, stoga je nužno provoditi zahtjevne analize s vrlo visokom selektivnošću i osjetljivošću.^{6,24}

2.2.3. Kontrola genotoksičnih onečišćenja

U prosincu 2002., Radna skupina za sigurnost (engl. *Safety Working Party*, SWP) Europskog odbora za posjedničke lijekove (engl. *European Committee for Proprietary Medicinal Products*, CPMP), danas poznatog kao Odbor za lijekove za humanu upotrebu (engl. *Committee*

for Medicinal Products for Human Use, CHMP), objavila je članak vezan uz ograničavanje genotoksičnih onečišćenja. Glavni razlog tome je bio nadopunjavanje smjernica ICH koje se odnose na onečišćenja u lijekovima (ICH Q3A/B (R2)), posebno vezano uz „ona onečišćenja za koja se očekuje da bi mogla biti osobito potentna“, s naglaskom na onečišćenja koja nije bilo moguće detektirati metodama za „klasična“ onečišćenja (100-1000 ppm). Nakon izdavanja spomenutog članka, te ekstenzivnih konzultacija, napokon je 2006. godine izdan dokument sa smjericama EU za granice genotoksičnih onečišćenja (engl. *EU guideline on limits of genotoxic impurities*).^{6,26,27}

Prema ICH 7 smjericama, zbog nedovoljnog broja podataka potrebnih kako bi se primijenila jedna od metoda za procjenu rizika, poput podataka dobivenih dugoročnim studijama karcinogenosti ili podataka s dokazanim pragom genotoksičnosti, predložen je tzv. „prag toksikološke zabrinutosti“ (engl. *threshold of toxicological concern, TTC*). Unos 1,5 µg dan⁻¹ genotoksičnih onečišćenja predložena je TTC vrijednost, koja se smatra prihvatljivim rizikom za većinu farmaceutika. Iz ove vrijednosti moguće je izračunati dozvoljenu koncentraciju genotoksičnog onečišćenja u aktivnom sastojku s obzirom na maksimalnu dnevnu dozu lijeka.^{6,27} Veće koncentracije mogu biti opravdane u pojedinim slučajevima, poput kratkoročnog izlaganja.

Ove smjernice odnose se na onečišćenja za koja je moguće procijeniti potencijalnu genotoksičnost pomoću već postojećih podataka o genotoksičnosti. S obzirom na mogućnost procjene mehanizma djelovanja potencijalno genotoksičnog onečišćenja, te odnos doze i reakcije na dozu, genotoksična onečišćenja dijele se na:

- a) genotoksična onečišćenja s dovoljnim (eksperimentalnim) dokazom o mehanizmu djelovanja povezanim s pragom

Ukoliko je poznat prag genotoksičnosti, doze izloženosti s malim rizikom moguće je definirati u skladu sa smjericama za otapala klase 2 ostatnih otapala²⁸. Ovaj pristup računa “dozvoljenu dnevnu izloženost” (engl. *permitted daily exposure, PDE*), procijenjenu prema najnižoj razini pri kojoj je uočen efekt (engl. *lowest-observed effect level, LOEL*), s obzirom na najrelevantniju studiju (provedenu na životinjama).

- b) genotoksična onečišćenja s nedovoljnim (eksperimentalnim) dokazom o mehanizmu djelovanja povezanim s pragom

Ukoliko ne postoje potrebna istraživanja, potrebno je voditi se principom „najniže koliko je to razumno izvedivo“, tzv. princip ALARP (engl. *as low as reasonably practicable*), ukoliko nastanak onečišćenja nije moguće u potpunosti izbjeći.

U smjernicama je također navedeno kako je analizu ovakvih onečišćenja potrebno raditi najsvremenijim analitičkim instrumentima i metodama.

Zbog nemogućnosti definiranja razine sigurne izloženosti za genotoksične molekule bez zadanog praga, te činjenice da je potpuna eliminacija ovakvih onečišćenja prilikom sinteze djelatnih tvari često nemoguća, bilo je nužno prihvatiti koncept prihvatljive razine rizika, odnosno dnevne izloženosti čovjeka na razini na kojoj i ispod koje je rizik za ljudsko zdravlje zanemariv.⁶

Kako bi se definirala razina izloženosti pojedinoj nedovoljno istraženoj kemikaliji, koja nije značajno karcinogena ili toksična, definiran je TTC.^{6,29} Spomenuta razina od 1,5 µg dan⁻¹ (po osobi), originalno je određena od strane FDA prema istraživanju provedenom na 343 karcinogene molekule iz baze karcinogeno potentnih tvari, a potom potvrđena evaluacijom preko 700 karcinogenih tvari. Statistička procjena vjerojatnosti karcinogeno štetnog utjecaja genotoksičnih tvari iznosi 1 od 106 slučajeva cjeloživotnog rizika od karcinoma, s primjenom dnevne granice unošenja do 1,5 µg („gotovo sigurna doza“).^{29,30}

Razina izloženosti veća od 1,5 µg dan⁻¹ prihvatljiva je samo u određenim slučajevima, poput kratkoročnog izlaganja, liječenje po život opasnih stanja/bolesti, ukoliko je preostali očekivani životni vijek manji od 5 godina, te ukoliko je onečišćenje poznata tvar te će izloženost čovjeka biti mnogo veća utjecajem drugih čimbenika (poput hrane).^{6,29}

Koncentracija, odnosno udio genotoksičnog onečišćenja u djelatnoj tvari računa se prema formuli 1:

$$\text{udio (ppm)} = \frac{TTC (\mu\text{g dan}^{-1})}{\text{doza (g dan}^{-1})} \quad (1)$$

Bitno je napomenuti da se koncept TTC ne smije interpretirati na način da nema apsolutno nikakvog rizika, jer on uvijek postoji.

2.2.4. Forsirana razgradnja

Vremenski period u kojem lijek zadržava istovjetna svojstva i osobine koje je imao u vrijeme proizvodnje definira stabilnost farmaceutskog proizvoda. Stabilnost farmaceutskih molekula moguće je ispitivati na više načina; dugoročno, ubrzano, intermedijarno, ili procesom forsirane razgradnje. Sam proces je vrlo bitan, jer utječe na kvalitetu, sigurnost i učinkovitost lijeka. U svrhu osiguranja kvalitete i sigurnosti lijekova, FDA zahtijeva testiranje stabilnosti djelatnih tvari i gotovih oblika praćenjem promjena kvalitete i sastava u vremenu pod utjecajem raznih okolišnih faktora. Ovakva ispitivanja omogućuju odabir prikladne formulacije, pakiranja, skladištenja, te definiranje roka valjanosti.^{8,9,11}

Svrha ispitivanja provođenjem procesa forsirane razgradnje je dakle prikazati na koji način se mijenja kvaliteta djelatne tvari ili lijeka tijekom određenog vremenskog perioda promjenom raznih uvjeta, poput temperature, vlage i svjetlosti. Prilikom podvrgavanja djelatne tvari ili lijeka ekstremnim okolišnim uvjetima dolazi do razgradnje aktivne tvari. Prema smjericama ICH⁵ razgradni produkt je definiran kao onečišćenje nastalo kao posljedica kemijske promjene djelatne tvari ili lijeka nastale tijekom proizvodnje i skladištenja pod utjecajem topline, svjetlosti, u reakciji s vodom ili pomoćnom tvari lijeka, ili promjenom vrijednosti pH. Forsirana razgradnja dodatno omogućava identifikaciju mogućih razgradnih produkata određivanjem struktura, odnosno predviđanje puteva razgradnje, te razvoj stabilnije formulacije. Ovisno o pojedinoj djelatnoj tvari, odnosno molekuli koju je potrebno razgraditi, potrebno je prilagoditi uvjete za forsiranu razgradnju.

Razgradni produkti nastali prilikom forsirane razgradnje potencijalni su razgradni produkti koji se mogu ili ne moraju formirati u pojedinim uvjetima skladištenja, ali su svakako bitni za procjenu stabilnosti djelatne tvari ili lijeka. Informacije dobivene istraživanjem stabilnosti od velike su važnosti za proces proizvodnje i formulacije lijekova, te određivanje uvjeta skladištenja. Kako se pojedini uvjeti skladištenja ne mogu primijeniti na sve lijekove, isti nisu unaprijed određeni smjericama, već se utvrđuju ispitivanjem stabilnosti.⁸

2.2.5. Uvjeti forsirane razgradnje

Hidrolitički uvjeti

Hidroliza je jedna od najuobičajenijih razgradnih kemijskih reakcija, koja se temelji na razgradnji kemijskih komponenata u reakciji s vodom. Provodi se u širokom rasponu pH. Hidrolitička razgradnja se stoga odvija izlaganjem uzorka i kiselim i baznim uvjetima. Izbor vrste i koncentracije kiseline ili baze ovise o stabilnosti molekule podvrgnute razgradnji, te o željenoj jačini razgradnje – potrebno je generirati primarne razgradne produkte u određenoj količini u skladu sa smjericama ICH. Za kiselu hidrolizu moguće je koristiti klorovodičnu ili sumpornu kiselinu, dok se za baznu hidrolizu najčešće koriste natrijev hidroksid ili kalijev hidroksid. Ukoliko pri sobnoj temperaturi u prisustvu navedenih agensa ne dolazi do razgradnje, potrebno je primijeniti uvjete povišene temperature (50 –70 °C). Razgradnja ne bi trebala trajati dulje od 7 dana. U svrhu zaustavljanja reakcije razgradnje, prije analize uzorka, otopinu je potrebno neutralizirati prikladnom kiselinom ili bazom.^{12,31}

Oksidativni uvjeti

U svrhu oksidacije uzoraka djelatnih tvari ili lijekova prilikom ispitivanja razgradnje najčešće se koristi vodikov peroksid, no moguće je koristiti druge agense poput kisika, metalnih iona ili radikala. Izbor korištenog agensa ovisi o ispitivanoj molekuli. Smatra se da otopina vodikovog peroksida (0,1–3 %) pri neutralnoj vrijednosti pH i sobnoj temperaturi, u vremenu do 7 dana ili stupnju razgradnje do 20 %, daju relevantne razgradne produkte. Uzorci se mogu analizirati u različitim vremenskim intervalima.^{12,31}

Fotolitički uvjeti

Fotolitičku razgradnju potrebno je provesti kako bi se dokazalo da na stabilnost djelatne tvari ili lijeka izloženost svjetlosti nema značajan utjecaj. Ovakvo istraživanje provodi se na način da se razgradni produkti generiraju izlaganjem UV ili fluorescentnom zračenju. Minimalna jačina svjetlosti koja se primjenjuje prilikom ove vrste ispitivanja je 1,2 milijuna lux sati (200 Wh m⁻²). Fotokemijskim ispitivanjem u uzorcima najčešće dolazi do oksidacije mehanizmom slobodnih radikala.^{12,31,32}

Termički uvjeti

Termička razgradnja može se provoditi u rigoroznijim uvjetima od onih zadanih smjericama ICH, a provodi se izlaganjem krutog uzorka ili otopine povišenim temperaturama. Mehanizmi razgradnje koji se ubrzavaju pod utjecajem povišenih temperatura mogu se opisati kao termolitički putevi razgradnje. Dehidratacija, dekarboksilacija, izomerizacija i dimerizacija najčešće su reakcije koje se odvijaju prilikom ovakvih ispitivanja.^{12,31}

2.2.6. Forsirana razgradnja ceritiniba

2016. godine S. Kapavarapu i suradnici³³ su razvili i validirali učinkovitu stabilitetno-indikativnu metodu upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za određivanje ceritiniba prisutnog u gotovom farmaceutskom proizvodu. Metoda je dodatno primijenjena za ispitivanje stabilnosti ceritiniba primjenom različitih stresnih uvjeta metodom forsirane razgradnje. Stabilnost ceritiniba ispitana je izlaganjem ceritiniba neutralnim uvjetima (refluks u vodi 6 sati pri 60 °C), utjecaju svjetlosti (7 dana pri 200 W m⁻²), toplini (zagrijavanje pri 105 °C 6 sati), te u prisutnosti: 2 mol L⁻¹ otopine HCl, 2 mol L⁻¹ otopine NaOH, 20 % otopine H₂O₂ – uz 30 minuta zagrijavanja pri 60 °C. U prisutnosti vodikovog peroksida nastao je razgradni produkt s relativnim retencijskim vremenom 0,81. Kiselom hidrolizom generiran je razgradni produkt s relativnim retencijskim vremenom 1,16, dok je baznom hidrolizom došlo do generiranja razgradnog produkata s relativnim retencijskim vremenom 1,37. Produkti razgradnje nisu identificirani.³³

2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je fizikalno-kemijska tehnika odjeljivanja, pri čemu se odjeljivanje molekula temelji na suptilnim razlikama u određenim fizikalno-kemijskim svojstvima molekula u uzorku, poput topljivosti u vodi, topljivosti u određenim organskim otapalima, naboju, te veličini čestica. Sastojci smjese se pritom raspoređuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, te joj površinski sastav ovisi o vrsti odjeljivanja, a druga pokretna, te može biti tekućina ili plin.^{34,35}

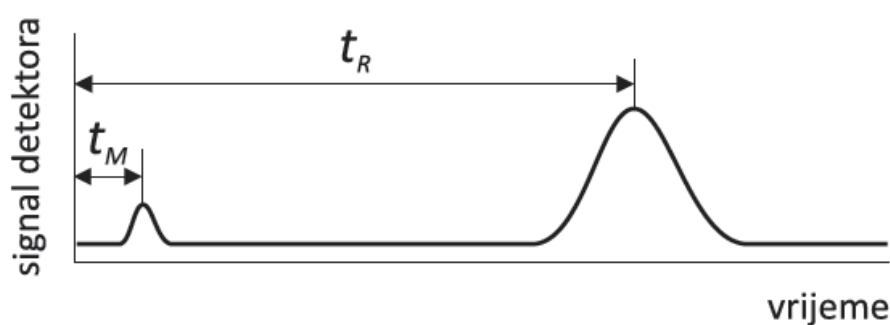
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je kromatografska tehnika koja se koristi za razdvajanje,

identifikaciju i kvantifikaciju sastojaka pojedine smjese. Mehanizam razdvajanja ovisi o raspodjeli organskih molekula između tekuće pokretne i stacionarne nepokretne faze, odnosno o vremenu provedenom u pojedinoj fazi. Kromatografija obrnutih faza koristi alkilne lance kovalentno vezane na čestice nepokretne faze – hidrofobna stacionarna faza koja s velikim afinitetom veže hidrofobne i nepolarne spojeve, dok je pokretna faza vodena. Hidrofobne molekule se stoga adsorbiraju na hidrofobnu nepokretnu fazu, dok hidrofilne molekule s pokretnom fazom prolaze kroz kolonu i eluiraju se prve. Hidrofobne molekule se potom eluiraju s kolone smanjenjem polarnosti pokretne faze upotrebom organskog (nepolarnog) otapala. Upotreba hidrofobne nepokretne faze suprotna je principu normalno–fazne kromatografije, jer su polarnosti pokretne i nepokretne faze obrnute, stoga se i upotrebljava naziv kromatografija obrnutih faza.³⁴⁻³⁶

2.3.1. Parametri kromatografije

Grafički prikaz odnosa koncentracije analizirane tvari u ovisnosti o vremenu eluiranja, odnosno prikaz odziva detektora krajnji je rezultat svake kromatografske analize. Dobiveni prikaz naziva se kromatogram. Vrijeme elucije određene molekule, koje je moguće iščitati iz položaja pripadajućeg pika na kromatogramu, pomaže pri identifikaciji, dok površina ispod pika odgovara količini eluiranog sastojka.^{37,38}

Svaki analit ima karakteristično vrijeme zadržavanja (t_R) a predstavlja vrijeme između trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva pojedine tvari. Sve molekule provode jednako vrijeme u pokretnoj fazi. To je tzv. vrijeme zadržavanja nezadržane tvari (t_M) koje je jednako vremenu koje prođe od injektiranja tvari koja se ne veže na nepokretnu fazu do trenutka njene detekcije.^{36,37} Odnos vremena zadržavanja i zadržanog vremena prikazan je na slici 2.



Slika 2. Odnos vremena zadržavanja analita, t_R , i vremena zadržavanja pokretne faze, t_M ³⁷

U praksi se češće koristi relativno vrijeme zadržavanja, koje predstavlja omjer vremena zadržavanja komponente uzorka od interesa u odnosu na vrijeme zadržavanja standarda-formula 2.^{38,39}

$$r_R = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (2)$$

Uz pripadajuće vrijeme zadržavanja (t_R), svaki pik na kromatogramu karakteriziran je i širinom kromatografske krivulje na polovini visine (w_h). Uspješnost kromatografske analize ovisi o efikasnosti odjeljivanja dvaju spojeva - razlučivanju (R_s) kromatografskih pikova, prema formuli 3.

$$R_s = \frac{2\Delta t}{(w_1 + w_2)} \quad (3)$$

Gdje je Δt razlika vremena zadržavanja između dvaju susjednih pikova, dok ($w_1 + w_2$) označava sumu njihovih širina pri osnovici. Što je vrijednost R_s veća, razlučivanje je bolje.

Razlučivanje ovisi o faktoru zadržavanja (k), faktoru razdvajanja (α) i broju teorijskih tavana (N).^{37,39}

Faktor zadržavanja (k) prikazuje vrijeme zadržavanja spoja na koloni ukoliko nema interakcije s nepokretnom fazom, a definiran je prema formuli 4.

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (4)$$

gdje t_R predstavlja vrijeme zadržavanja sastojka na koloni karakteristično za pojedinu tvar, a t_M vrijeme zadržavanja komponente koja ne stvara interakcije s nepokretnom fazom. Na faktor zadržavanja moguće je utjecati promjenom sastava pokretne faze.^{36,37}

Selektivnost kromatografskog sustava za dva različita analita definirana je faktorom razdvajanja, a ovisi o interakciji spoja s nepokretnom fazom. Definira se kao omjer faktora zadržavanja dvaju sastojaka uzorka, odnosno relativnog zadržavanja pojedinih sastojaka-formula 5.³⁶⁻³⁹

$$r_R = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2'}}{t_{R1'}} \quad (5)$$

gdje $t_{R1'}$ predstavlja razliku između vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja sastojka koji prolazi kroz kolonu bez zadržavanja. Faktor zadržavanja moguće je manipulirati upotrebom različitih tipova otapala, variranjem vrijednosti pH pokretne faze, te sastavom nepokretne faze.

Broj teoretskih tavana predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze, a sama vrijednost daje nam informaciju o djelotvornosti kromatografske kolone prema formuli 6.^{37,38}

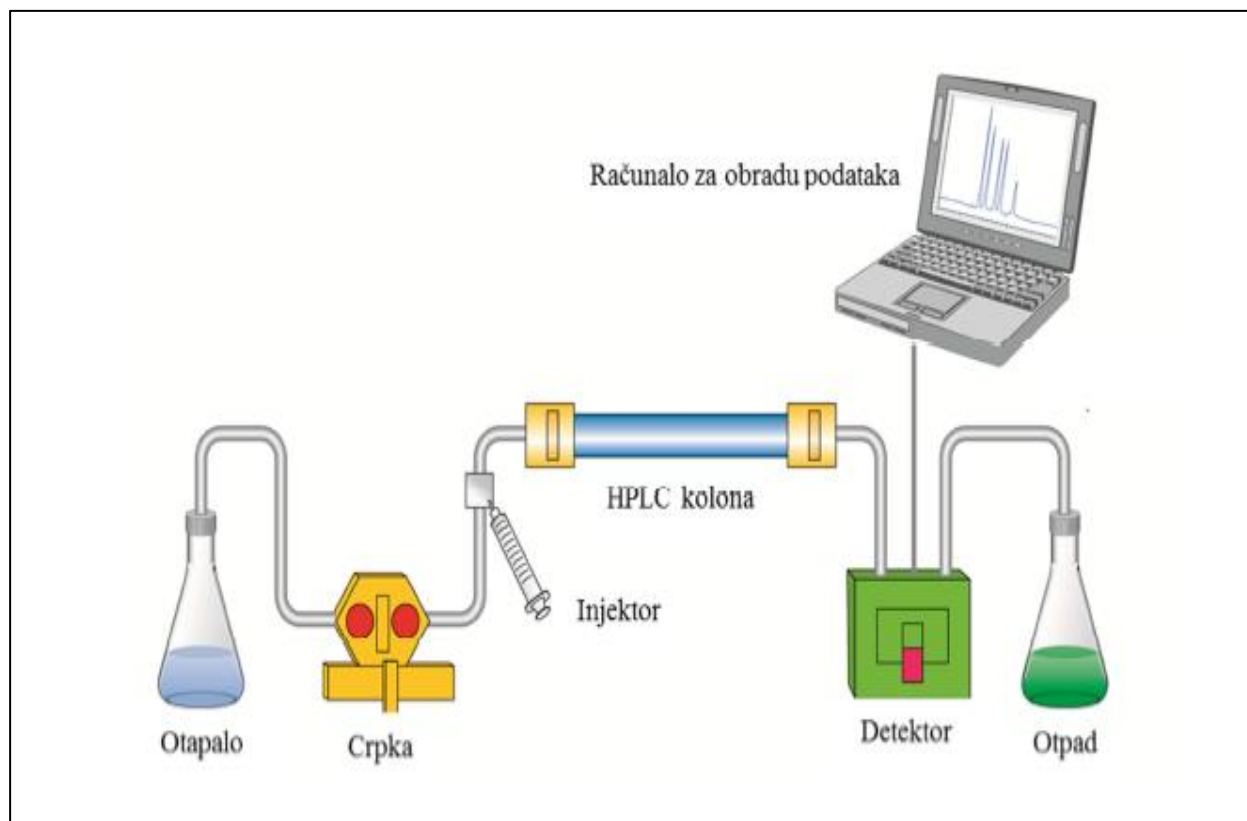
$$N = \frac{t_R^2}{w^2} \quad (6)$$

N predstavlja broj teorijskih tavana, t_R vrijeme zadržavanja analita, a w_b širinu pika pri osnovici kromatografske krivulje. Što je veći N to je veća djelotvornost kromatografske kolone.^{36,37}

Promjer čestica punila kolone znatno utječe na izgled pikova na kromatogramu. Difundiranjem molekula uzorka u pore kromatografskog punila dolazi do širenja vrpci, stoga se sa svrhom sprječavanja tog efekta koriste čestice punila manjeg promjera te kolone različitih dimenzija. Sukladno korištenju čestica malih promjera, nužno je koristiti veće tlakove.^{37,40}

2.3.2. Dijelovi kromatografa HPLC

Za postizanje visokog tlaka potrebna je složena oprema koja (za „klasičnu“ kromatografiju HPLC) mora omogućiti primjenu tlaka do 350 bara pri prolasku uzorka kroz kolonu. Instrument se sastoji od sustava za dovod pokretne faze, injektorskog sustava, kućišta za kolonu, detektora, sustava za obradu podataka, te sustava za odvod otapala zaostalog nakon analize (otpada).^{36,40} Dijelovi kromatografa HPLC prikazani su slikom 3.

Slika 3. Dijelovi kromatografa (U)HPLC.⁴¹

Sustav za dovod pokretne faze sastoji se od spremnika pokretne faze i crpki, međusobno povezanih cjevčicama. Spremnik se sastoji od 1-4 kanala te služi za skladištenje otapala iz kojeg crpka kontinuirano vuče određeni volumen pojedinog otapala, što osigurava konstantan protok pokretne faze u sustavu tijekom analize. Pokretnu fazu čine visokopročišćena otapala, bez prisutnosti otopljenih plinova, koja se dodatno otplinjavaju prije ulaska u kromatografski sustav. Sastav pokretne faze tijekom ispiranja može biti stalan, pa govorimo o izokratnom eluiranju, ili se može kontinuirano mijenjati, što je znatno češći slučaj - gradijentno eluiranje.^{36,37}

Uzorak se unosi u kromatograf pomoću injektorskog sustava, koji se sastoji od injektorskog ventila, automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*), injektorske igle, graduirane injekcije, te kapilare određenog volumena. Automatski uzorkivač omogućava automatizirano unošenje uzorka u pokretnu fazu, kojom će se uzorak prenijeti do kolone.^{36,37}

Kolone za tekućinsku kromatografiju glavni su dio svakog kromatografskog sustava. Odabir kolone ključan je za uspješnu separaciju sastojaka u uzorku. Kolone su uske čelične cijevi u kojima se nalazi nepokretna faza-punilo. Kao čestice punila najčešće se koristi silikagel

promjera od 3 μm do 10 μm . Dimenzije kolona također znatno variraju, duljine mogu biti od 50 mm do 3000 mm, a unutarnji promjer od 2 mm do 5 mm.^{36,40}

Automatski uzorkivač i kućište za kolonu najčešće su termostatirani s obzirom na to da temperatura ima važnu ulogu u razdvajanju komponenti uzorka. Stoga se tijekom ispitivanja temperatura kolone održava konstantnom.^{36,37}

Detekcija sastojaka razdvojenih na kromatografskoj koloni ostvaruje se bilježenjem promjena u apsorpciji prema Beer-Lambertovom zakonu. Korištenjem UV/VIS detektora (kod klasičnog sustava HPLC), očitava se apsorbanca pri određenoj valnoj duljini svjetlosti, koja odgovara koncentraciji pojedinog sastojka u uzorku prema formuli 7.⁴²

$$A = \epsilon bc \quad (7)$$

gdje je A apsorbanca pri danoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ molarni apsorpcijski koeficijent svojstven svakoj molekulskoj vrsti, b duljina puta svjetlosti kroz uzorak, a c koncentracija tvari u otopini.⁴²

Uz UV/VIS detektore, moguće je koristiti fluorimetar, elektrokemijski ili amperometrijski detektor, te spektrometar masa. Za strukturnu analizu onečišćenja najčešće se koristi spregnuti sustav HPLC sa spektrometrijom masa.⁴³

2.3.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UPLC) poboljšani je oblik tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Princip analize je isti, s razlikom u veličini čestica punila, koje su u ovom slučaju znatno manje ($< 2 \mu\text{m}$), što zahtijeva primjenu tlakova do 1000 bara.

Odnos visine teorijskog tavana (HETP, engl. *height equivalent of a theoretical plate*) prema različitim kinetičkim parametrima koji utječu na kromatografski proces opisan je Van Deemeterovom formulom (8):

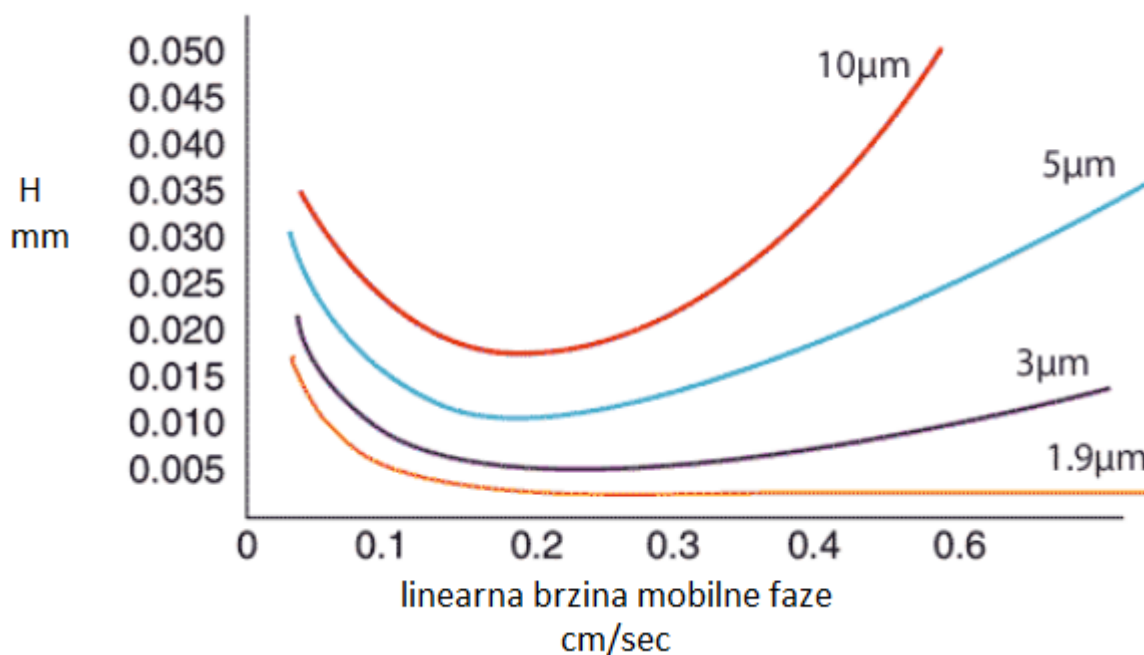
$$H = A + \frac{B}{v} + C \cdot v \quad (8)$$

gdje je:

- A – koeficijent vrtložne difuzije
- B – koeficijent longitudinalne difuzije
- C – koeficijent prijenosa mase
- v – linearna brzina mobilne faze

Van Deemterova jednadžba opisuje odnos između protoka pokretne faze, odnosno linearne brzine i visine tavana (HETP ili efikasnosti kolone). Veličina čestica je jedna od varijabli ove empirijske formule, a Van Deemterova krivulja prikazuje efikasnost kolone pri većim linearnim brzinama, što objašnjava potrebu za razvojem kolona s manjim promjerom čestica punila. Veće linearne brzine dovode do kraćeg vremena analiza i bolje separacije na koloni. Koeficijent vrtložne difuzije (A) predstavlja proces gibanja molekule iz sredine veće koncentracije u sredinu manje koncentracije. Najmanji je pri malom i uniformnom promjeru čestica u koloni, te ne ovisi o linearnoj brzini pokretne faze. Koeficijent longitudinalne difuzije (B) opisuje tendenciju molekule k prirodnoj difuziji. Smanjuje se pri visokim brzinama stoga je obrnuto proporcionalan linearnoj brzini. Koeficijent prijenosa mase (C) predstavlja kinetički otpor, koji je proporcionalan brzini jer s većim protokom više molekula zaostaje u pokretnoj fazi.⁴⁴⁻⁴⁷

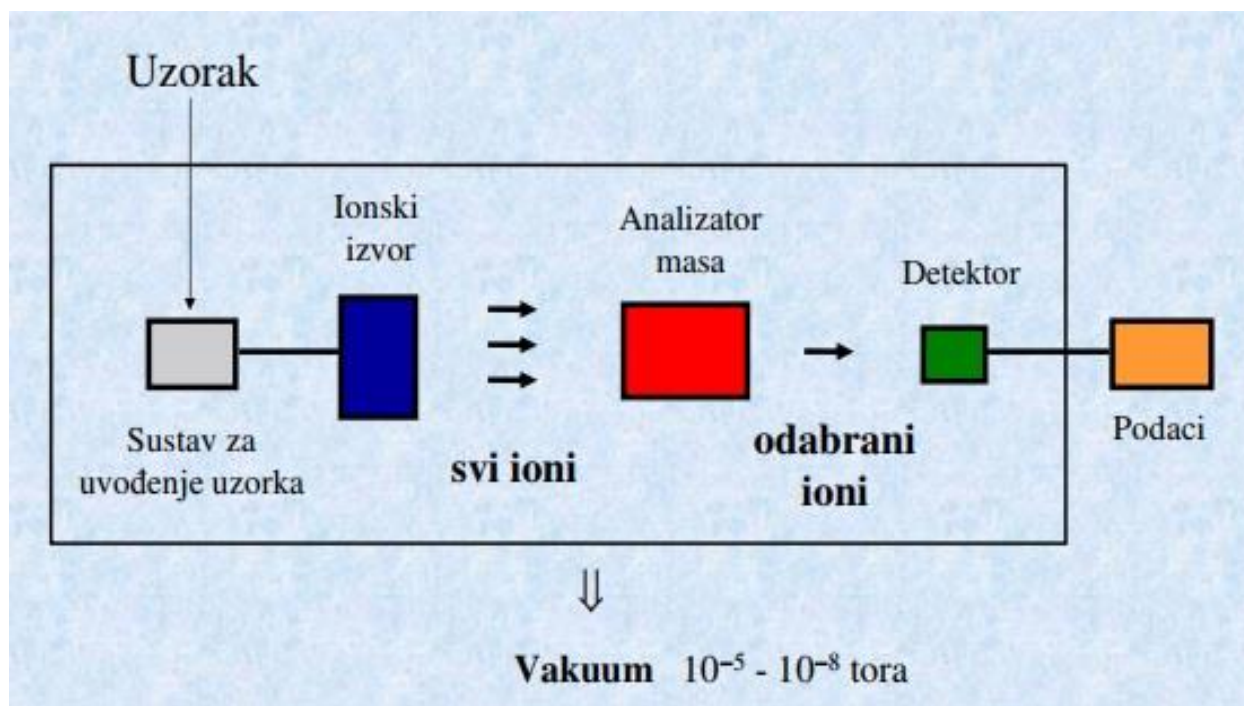
Idealna Van Deemterova krivulja neostvariva je uporabom kolona dostupnih za HPLC, stoga su razvijene kolone s promjerom čestica punila manjim od 2 μm . Kako korištenjem ovakvih nepokretnih faza dolazi do stvaranja visokog tlaka, razvijeni su uređaji UHPLC. U današnje vrijeme instrumenti UHPLC imaju crpke koje mogu raditi pri višim tlakovima, do 1200 bara, dok su uređaji HPLC bili ograničeni na rad do 400 bara. Također, korištenjem kratkih kolona dolazi do povećanja broja teorijskih tavana, čime dolazi do bolje separacije uz kraće vrijeme analize.⁴⁸⁻⁵⁰ Van Deemterova krivulja prikazana je slikom 4.

Slika 4. Van Deemterova krivulja.⁵¹

Ovaj napredak u instrumentaciji doveo je do skraćenog vremena analiza, bolje razlučivosti, povećane osjetljivosti, te smanjenja potrošnje reagensa. Nedostatak tehnike UHPLC je kraći vijek trajanja kolona zbog visokih tlakova pri analizama.^{50,52,53}

2.4. Spektometrija masa

Spektrometrija masa (MS) analitička je tehnika koja se temelji na ionizaciji kemijskih spojeva te omogućava razvrstavanje iona na temelju omjera njihove mase i naboja. Jednostavnije rečeno, spektar masa daje očitavanje mase unutar uzorka. Spektrometrija masa se koristi u mnogim različitim područjima i primjenjuje se na čiste uzorke kao i na složene smjese. Molekule uzorka se najprije ioniziraju u ionizatoru, potom se ubrzavaju u električnom polju i uvode u odabirač brzine u kojem djeluje električno i magnetno polje. Analiza iona na osnovi masene razlike pruža informacije o tipu i rasporedu iona analiziranog uzorka, a za pretragu je dovoljna vrlo mala količina uzorka, svega 10^{-12} g. Stoga se ova metoda koristi za kvantifikaciju atoma ili molekula i za dobivanje kemijske i strukturne informacije o analiziranim molekulama.^{37,54} Slikom 5 prikazana je shema spektrometra masa.



Slika 5. Shematski prikaz spektrometra masa.

2.4.1. Ionizacija elektroraspršenjem

Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization* - ESI) jedna je od najkorištenijih tehnika ionizacija, osobito u farmaceutskoj industriji. Ionizacijom elektroraspršenjem stvaraju se ioni direktno iz otopine, te je stoga povezana s uređajima za tekućinsku kromatografiju ili kapilarnu elektroforezu. Ionizacija može biti pozitivna i negativna (u ovisnosti o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi), a ionizacija i nebulizacija se događaju pri atmosferskom tlaku.

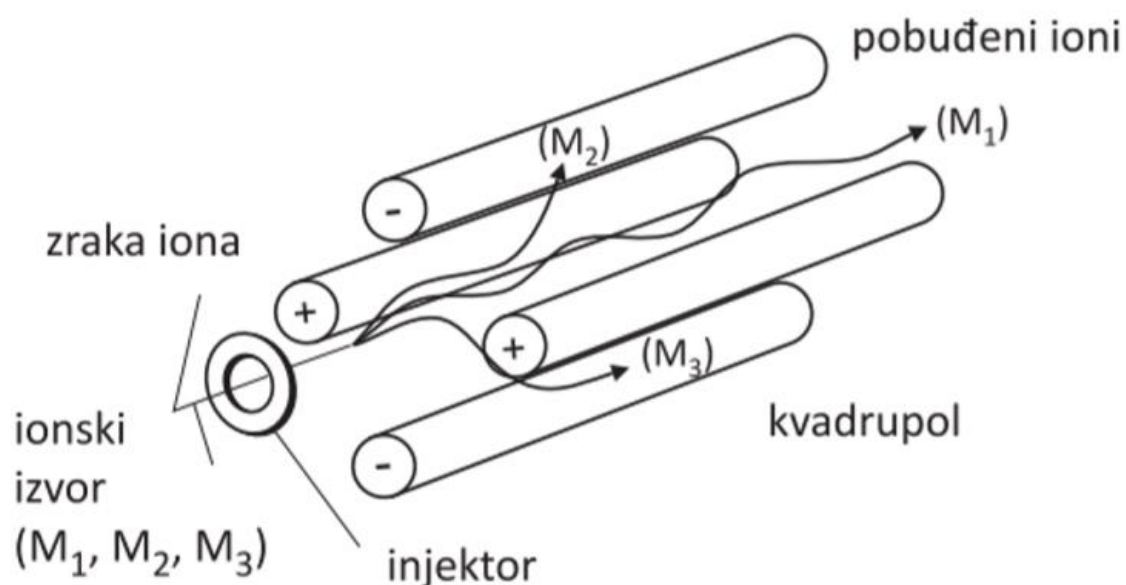
Uzorak se raspršuje u aerosol kojeg tvore nabijene kapljice u prisutnosti snažnog električnog polja, nakon čega se kapljice počinju smanjivati zbog isparavanja otapala pri čemu se višestruko nabijeni ioni otpuštaju s kapljica i odlaze u analizator.

Pokretna faza s uzorkom prolazi kroz metalnu kapilaru (elektrodu pod visokim naponom) na način da prilikom izlaska analita kroz vršak kapilare nastaje maglica sastavljena od kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Kolektorska elektroda privlači nabijene kapljice. Otparavanjem otapala u struji dušika, uz povišenu temperaturu pod utjecajem električnog potencijala, kapljice se smanjuju. Kada su kapljice toliko male da se svi ioni nalaze na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće od sile napetosti površine te dolazi do otparavanja kapljica ili razbijanja kapljica na manje kapljice. Analit zatim kristalizira ili prelazi

u plinsku fazu. Oko iona se formira sfera uparenog otapala, a analizator potom privlači tako nastale ione.^{37,54,55,56}

2.4.2. Kvadrupolni analizator masa

Analizatore masa razlikujemo prema načinu razdvajanja iona. Kvadrupol je jedan od najzastupljenijih analizatora, razdvajanje iona odvija se pomoću električnog polja i propusnog filtra, a zahtijeva kontinuirani izvor iona. Kvadrupol se sastoji od četiri cilindra (elektrode) koje su električki povezane dijagonalno pri čemu jedan par elektroda ima pozitivni, a drugi negativni polaritet (slika 6). Parovi elektroda su dodatno spojeni radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje koji je za 180 stupnjeva izvan faze. Ovisno o omjeru mase i naboja iona koji ulaze u analizator, pod utjecajem izmjenične struje, ioni prolaze kroz analizator ili skreću s putanje te se neutraliziraju u dodiru s elektrodama. U odsutnosti izmjeničnog potencijala svi pozitivni ioni bit će privučeni negativnim elektrodama. Ako je ion dovoljno lagan, na njega će djelovati izmjenični potencijal koji će ga držati u stabilnoj putanji podalje od elektroda. Djelovanjem određenog izmjeničnog napona nastat će rezonantni ioni tj. ioni iste mase postići će jednaku amplitudu gibanja te će tako jedino ti ioni doći do detektora, budući da će ioni s različitim masama imati nepravilno gibanje.^{54,57}



Slika 6. Shema kvadrupolnog analizatora masa.³⁷

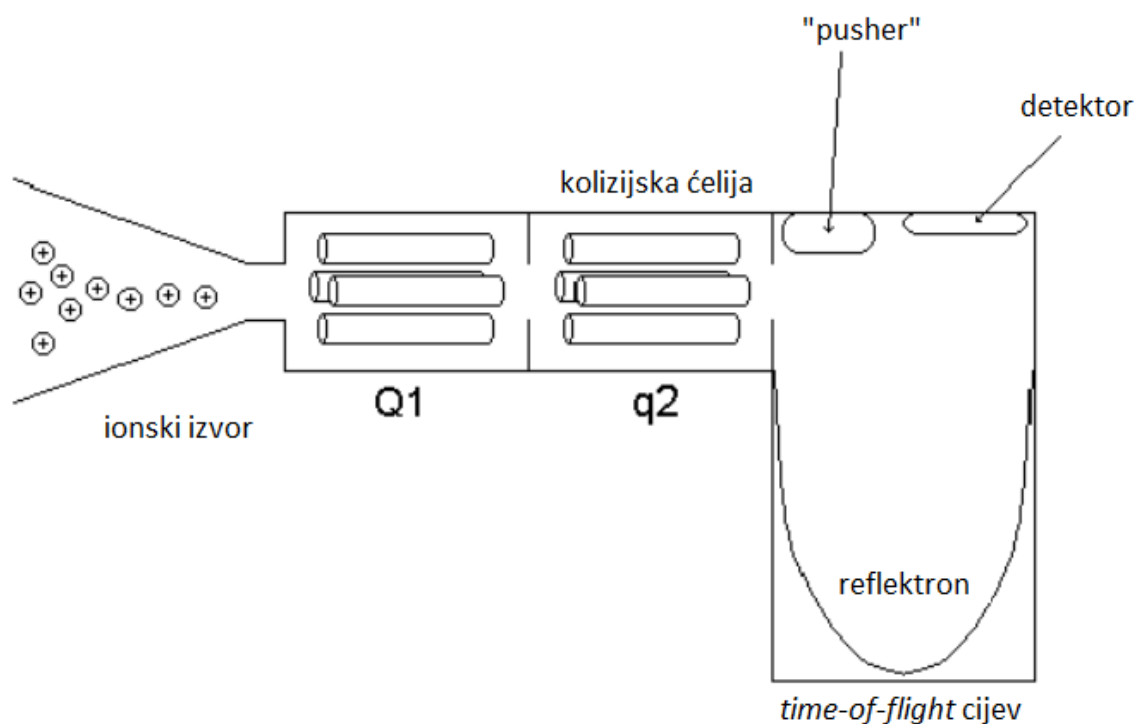
Trostruki kvadrupol funkcionira na sličnom principu kao i jednostruki kvadrupol. Filteri masa Q1 i Q3 sastoje se od četiri cilindrične elektrode te su pod utjecajem istosmjerne struje i radiofrekventnog potencijala, dok je q2 kolizijska ćelija na koju utječe samo RF potencijal. U q2 ulaze ioni filtrirani u prvom kvadrupolu, te se pod utjecajem RF potencijala u struji inertnog plina fragmentiraju. Novonastali fragmenti potom prolaze kroz Q3 gdje se filtriraju s obzirom na omjer m/z ili skeniraju u cijelosti. Ovakav analizator masa koristan je za strukturnu karakterizaciju molekula, jer je pomoću Q1 moguće „filtrirati“ molekulski ion poznate mase, fragmentirati u q2, a potom iz spektra dobivenog u Q3 iščitati intenzitete pripadajućih fragmenata. Na temelju dobivenih informacija moguće je zaključiti koja je struktura početnog molekuskog iona.^{54,58}

2.4.3. Analizator vremena leta

Analizator vremena leta (TOF) češće se koristi za kvalitativnu analizu nepoznatih molekula. Princip rada ovog analizatora temelji se na činjenici da postoji ovisnost između brzine i mase iona – manji ioni putuju brže, dok veći ioni putuju sporije pri istim uvjetima. Kako ioni koji dolaze do detektora putuju različitom brzinom, tako dolazi do njihove međusobne separacije ovisno o vremenu koje im treba da dođu do detektora. Ioni u analizator (*pusher*) mogu ući aksijalno ili ortogonalno, nakon određenog vremena on ih istovremeno otpušta prema detektoru. Od trenutka otpuštanja mjeri se vrijeme leta iona. Analizatori masa najčešće imaju ugrađen reflektrom koji omogućava da ioni istih masa s različitim E_k istovremeno dođu do detektora.^{54,59}

Hibridni TOF detektor s kvadrupolom (Q-TOF) omogućava tandemnu spektrometriju masa te je time dobio veliku primjenu kod analize peptida i proteina (slika 7). Komponente ovakvog detektora su kvadrupol, vodič iona koji može biti heksapol ili oktopol te TOF analizator s reflektrom. Oktopol omogućava prijenos iona s vrlo malim gubitkom signala. Oktopoli se mogu koristiti za prijenos iona i/ili redukciju tlaka. Heksapoli funkcioniraju na isti način kao oktopoli (ili kvadrupoli), samo što se tiče fokusiranja iona, imaju prednost nad oktopolima (kvadrupol>heksapol>oktopol), dok je za ionsku transmisiju s velikim rasponom mase, odnosno m/z , poredak obrnut (oktopol>heksapol>kvadrupol). S obzirom na navedene prednosti i nedostatke, često je heksapol optimalna opcija. Kolizijske ćelije su najčešće heksapoli – šest elektroda generira razliku potencijala duž cijele ćelije. Razlika potencijala je uvijek prisutna te osigurava da su ioni prekursori koji dolaze iz kvadrupola, te ionski fragmenti

nastali u kolizijskoj ćeliji, nošeni prema detektoru. U suprotnom bi se nekontrolirano i nasumično kretali kroz ćeliju. Ovakva konfiguracija također osigurava da pri trenutnoj analizi nema interferencija u obliku ostataka iona iz prethodne. U svrhu fragmentacije iona primjenjuje se napon kolizijske energije na postojeći linearni napon.^{54,59,60}



Slika 7. Shematski prikaz analizatora masa Q-TOF⁶¹

Oba opisana detektora mogu dati zadovoljavajuće rezultate i za kvantitativne i kvalitativne analize, međutim postoje prednosti i nedostaci zbog kojih je pogodno odabrati pravu tehniku za konkretan analitički problem.

Tekućinska kromatografija spregnuta s trostrukim kvadrupolom (LC-QqQ MS) neizostavna je aplikacija za detekciju raznovrsnih analita u tragovima. LC-QqQ tehnika koristi se primjerice za analizu pesticida, genotoksičnih onečišćenja u farmaceuticima, industrijskih kemikalija i ostataka farmaceutika u površinskim vodama, ostataka droga ili pesticida u biološkim uzorcima ili hrani.^{62,63}

LC-Q-TOF MS je nešto novija tehnika koja koristi tekućinsku kromatografiju spregnutu s masenim detektorom TOF (time-of-flight – „vijeme leta“) za brzu analizu tragova s točnim očitajima masa (0.1-2 mDa), što omogućava lakšu identifikaciju nepoznatih molekula u uzorku. Ova tehnika se rijetko koristi za kvantifikaciju, osobito molekula niske molarne mase (<500 Da) u malim količinama.^{59,60}

2.5. Validacija analitičkih metoda

Validacijom analitičkih metoda dokazuje se da je pojedina metoda prikladna za namijenjenu svrhu. Postupak validacije zahtijeva brojne procjene konstruirane na način da potvrđuju prikladnost analitičkog sustava za provođenje analize sa svrhom prikupljanja korisnih i legitimnih podataka. Validacijsko ispitivanje uključuje testiranje mnogih svojstava metode, koja su ključna za pružanje točnih i korisnih informacija tijekom rutinskih analiza. Validacije analitičkih metoda u farmaceutskoj industriji najčešće se provode prema smjernicama ICH – poglavlje Q2 "Validacija analitičkih procedura" i Organizacije za hranu i lijekove – "Analitičke procedure i validacija metoda lijekova". Potrebno je uvažiti i regulatorne zahtjeve koji su definirani preko principa poput Dobre laboratorijske prakse (DLP, 1976. FDA), Dobre analitičke prakse (DAP), Dobre proizvođačke prakse (DPP), te ISO norme po kojima je validacija metode postala obvezna.^{64,65}

2.5.1. Parametri validacije analitičkih metoda

Ovisno o tipu analitičkog postupka, provjeravaju se pojedini parametri validacije. Parametri koje je potrebno razmotriti prilikom validacije su: točnost (engl. *accuracy*), preciznost (engl. *precision*), selektivnost i specifičnost (engl. *selectivity/specificity*), granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD), granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ), linearnost (engl. *linearity*), raspon metode (engl. *range*), te robustnost (engl. *robustness*).^{64,65}

- Specifičnost

Specifičnost je svojstvo metode da omogućuje nedvosmisleno određivanje analita u prisustvu ostalih komponenata poput onečišćenja, razgradnih produkata, matrice uzorka i sl. Specifičnost metode se utvrđuje usporedbom kromatografskih pikova slijepe probe (najčešće otapala koje se koristi za pripremu uzorka) i samog uzorka.

- Točnost

Točnost analitičkog postupka prikazuje bliskost slaganja vrijednosti koja se konvencionalno definira točnom ili prihvaćene referentne vrijednosti s dobivenim rezultatom. Točnost se najčešće određuje na način da se uzorku dodaje određena količina otopine poznate koncentracije analita, a računa se kao postotak analitičkog povrata.

- Preciznost

Preciznost analitičkog postupka prikazuje bliskost slaganja serije mjerenja dobivenih višestrukom (istovjetnom) pripremom istog homogenog uzorka prema propisu metode. Preciznost se može raščlaniti na tri parametra: ponovljivost (engl. *repeatability*), intermedijarna preciznost i reproducibilnost (engl. *reproducibility*). Rezultat procjene preciznosti izražava se kao varijanca, standardna devijacija ili varijacija između serija mjerenja.

- Ponovljivost

Ponovljivost postupka predstavlja preciznost pod istim radnim uvjetima u kratkom vremenskom periodu.

- Intermedijarna preciznost

Intermedijarna preciznost odnosi se na usporedbu rezultata dobivenih na temelju varijacija unutar laboratorija, poput korištenja različite opreme, pripreme u različitim danima, priprema od strane dva ili više različitih analitičara itd.

- Reproducibilnost

Reproducibilnost predstavlja preciznost između dvaju različitih laboratorija. Ovaj postupak potrebno je provesti prilikom standardizacije analitičkog postupka, primjerice za uključivanje postupka u farmakopeje.

- Granica detekcije

Granica detekcije pojedinog analitičkog postupka odnosi se na najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. Postoji nekoliko postupaka za utvrđivanje granice detekcije, no najpouzdaniji postupak za metode kod kojih je prisutan šum bazne linije, kao što je slučaj kod HPLC metoda, je praćenje omjera signala kromatografskog pika i šuma bazne linije.

- Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije analitičkog postupka odnosi se na najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće kvantificirati uz prihvatljivu preciznost i točnost. Ovaj parametar se najčešće koristi prilikom utvrđivanja komponenata u uzorku koje su prisutne u niskim koncentracijama, poput onečišćenja i razgradnih produkata.

- Linearnost

Linearnost analitičkog postupka je sposobnost (unutar određenog raspona) dobavljanja rezultata koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Za utvrđivanje

linearnosti potrebno je barem 5 točaka, odnosno koncentracija uzoraka. Procjenjuje se grafički i matematički.

- Raspon metode

Raspon analitičke metode je interval između najviše i najniže koncentracije analita u uzorku, za koji je dokazana prikladna razina preciznosti, točnosti i linearnosti.

- Robustnost

Robustnost je mjera otpornosti analitičkog postupka na male, namjerne promjene radnih uvjeta, odnosno pojedinih parametara metode i daje dobru indicaciju pouzdanosti tijekom rutinskih analiza.

Ukoliko dođe do promjena u sintezi djelatne tvari lijeka, sastavu gotovog produkta ili u analitičkom postupku, potrebno je napraviti revalidaciju, koja će ovisiti o prirodi promjene.^{64,65,66}

2.6. Kvaliteta ugrađena u dizajn

Cilj istraživanja i razvoja u farmaceutskoj industriji je razviti kvalitetan proizvod s reproducibilnom željenom kvalitetom. Velika pažnja se pridaje razvoju analitičkih metoda, a zahtjevi za sustavnim pristupom razvoju metoda su sve veći. Tradicionalni pristup razvoju metode sastoji se od praćenja promjena u metodi uzrokovanih variranjem jednog po jednog faktora (uz držanje ostalih faktora konstantnima). Ovakav pristup zahtijeva velik broj eksperimenata, ne garantirajući pritom da neće biti potrebe za daljnjim razvojem, odnosno da će se postići optimalni rezultati. Unazad desetak godina, u razvoj farmaceutskih proizvoda integriran je pristup „kvaliteti osiguranoj dizajnom“ (engl. *quality by design*, QbD), koji smanjuje mogućnost nedostataka u procesu i samom proizvodu, odnosno smanjuje mogućnost pojavljivanja pogrešaka.^{67,68}

Pristup QbD uveden je od strane regulatornih agencija, točnije od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA), Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), japanske Agencije za lijekove i medicinsku opremu (engl. *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*, PMDA) i kanadskog vladinog Odjela za zdravlje (engl. *Health Canada*, HC). Prema priručniku ICH⁶⁹, ističe se važnost sustavnog pristupa razvoju, koji se sastoji od definiranja ciljeva, razumijevanja i kontrole procesa na temelju znanstvenih činjenica, te upravljanja rizicima. Prema smjernicama ICH kvaliteta je definirana kao prikladnost djelatne tvari ili proizvoda za namijenjenu primjenu, što uključuje attribute poput identiteta, jačine i

čistoće. Promjene u formulacijama i proizvodnji tijekom razvoja lijeka potrebno je prihvatiti kao prilike za dodatne informacije i saznanja. Implementiranje novih informacija dobivenih iz eksperimenata koji su dali neočekivane rezultate također može biti korisno. No u konačnici, dizajn razvojnog istraživanja treba biti usklađen s predviđenom znanstvenom svrhom, što će reći da je stečeno znanje, a ne količina podataka, osnova za uspješan farmaceutski proizvod.^{70,71}

Principi QbD mogu se primijeniti i na razvoj analitičkih metoda, pri čemu je cilj razvoj robustne metode, s pouzdanim mjernim rezultatima uz razumijevanje utjecaja pojedinih varijabli na kvalitetu. Primjena QbD pristupa u razvoju analitičkih metoda, konkretno metoda UHPLC, opisana je u nekoliko radova.^{67,68,72,73}

Razvoj metode sastoji se od opisanih koraka:

1. Definiranje ciljeva – razvoj brze, selektivne, precizne i točne metode za kvantitativnu analizu djelatne tvari i pripadnih onečišćenja
2. Izbor kritičnih odrednica kvalitete (engl. *critical quality attributes*, CQA) – mjerljivih veličina preko kojih je moguće odrediti kvalitetu razvijene analitičke metode

Za metode HPLC uobičajena odrednica kvalitete je svakako selektivnost metode izražena kao razlučivanje (R_s), te dodatno preciznost, granica kvantifikacije i vrijeme trajanja analize.

3. Definiranje kritičnih procesnih parametara (engl. *critical process parameters*, CPP) – procjena rizika, definiranje parametara čija promjena može utjecati na kritične odrednice kvalitete.

Velik broj parametara može utjecati na kvalitetu rezultata dobivenih kromatografskom analizom, stoga se u ovom koraku mogu koristiti alati kvalitete poput dijagrama tijeka analitičkog procesa.

4. Planiranje eksperimenata (engl. *design of experiments*, DoE) i razvoj matematičkog modela za opisivanje ovisnosti kritičnih odrednica kvalitete o kritičnim procesnim parametrima, na temelju koje je moguće odrediti višedimenzionalno područje unutar kojega varijacije kritičnih procesnih parametara ne uzrokuju značajne promjene kritičnih odrednica kvalitete.^{69,74,75}

Danas postoje mnogi računalni programi koji omogućuju razvoj prikladnog matematičkog modela za uspješan dizajn eksperimenata, odnosno ubrzavanje sistematičnog razvoja analitičkih metoda. Jedan od najznačajnijih računalnih programa koji se koristi u

spomenute svrhe je program DryLab® (Molnar Institute, Berlin, Njemačka). Pomoću programa DryLab® moguće je predvidjeti utjecaj nepokretne faze na raspored pikova na kromatogramu na način da se prethodno definiraju parametri poput vrijednosti pH, protoka pokretne faze, temperature, trajanja eluiranja i slično. Upotreba ovakvih programa prilikom razvoja metode znatno smanjuje broj potrebnih eksperimenata za optimizaciju uvjeta metode, a samim time se smanjuje potrošnja kemikalija koje bi se u suprotnom morale potrošiti za dodatan niz eksperimenata potrebnih za prikupljanje informacija o utjecaju promjena bitnih faktora poput temperature, vrijednosti pH i vremenskog gradijenta prilikom kromatografskih analiza.⁷⁶⁻⁷⁹

2.6.1. Solvofobna teorija

Program DryLab® temelji se na teoriji razvijenoj 1975. – 1977. godine na sveučilištu Yale, opisane u radu C. Horvátha, koja se bazira na jakim retencijskim svojstvima vode. Glavni koncept solvofobne teorije je da se retencija u reverznofaznoj kromatografiji potiče primjenom vode kao eluensa. Prema solvofobnoj teoriji, odnosno modelu preko kojeg je moguće opisati kromatografsko ponašanje spojeva principima klasične termodinamike, kromatografski proces je opisan kao reverzibilno vezanje molekula analita s ligandima ugljikovodika koji su sastavnica nepokretne faze. Interakcija je većinski određena pokretnom fazom, privlačne sile između analita i liganda imaju nešto manji utjecaj, a za samo vezanje je odgovorno smanjivanje nepolarne površine izložene pokretnoj fazi.⁸⁰⁻⁸²

Kromatografski proces je stoga prema solvofobnoj teoriji moguće promatrati kroz dva procesa: solvataciju i interakciju analita s nepokretnom fazom. Suma promjene standardne energije uslijed procesa solvatacije (ΔF_j°) i promjene standardne slobodne energije tijekom procesa adsorpcije analita na alkilnu grupu pokretne faze ($\Delta F_{vdw,assoc}^\circ$) čini retencijsku slobodnu energiju (ΔF_{assoc}°).

Proces solvatacije opisan je kroz tri procesa:

1. formiranje šupljina u pokretnoj fazi s ciljem „prihvatanja” molekula analita, $\Delta F_{c,j}$,
2. smanjenje slobodnog volumena i
3. interakcija molekula analita u šupljinama s molekulama iz njihove okoline ($\Delta F_{i,j}$)

Promjena slobodne energije retencijskog procesa izazvana opisanim interakcijama definirana je formulom (9)

$$\Delta F^0_{assoc} = \Delta F^0_{vdw, assoc} + (\Delta F_{c, SL} + \Delta F_{, SL}) - (\Delta F_{c, S} + \Delta F_{, S}) - (\Delta F_{c, L} + \Delta F_{, L}) - RT \ln \left(\frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (9)$$

Iz formule (9) izvedena je formula (10) za faktor kapaciteta, mjerljivi kromatografski parametar:

$$k = A + BD + C\Delta A + \frac{D(\kappa_e - 1)V_2}{3\gamma} + E + RT \ln \left(\frac{RT}{P_0 V} \right) \quad (10)$$

gdje su:

S – analit,

L – ligand,

SL – kompleks analita i liganda,

R – plinska konstanta, 8.314 J K⁻¹ mol⁻¹

T – temperatura (K),

p₀ – atmosferski tlak (Pa),

V – molarni volumen otapala, L mol⁻¹

k – faktor kapaciteta,

A i C – eksperimentalno određene konstante

BD – elektrostatički izraz (D ≈ 1),

ΔA – površina solvofobnog kontakta između analita (S) i liganda s površinom nepokretne faze (L), m²

γ – površinska napetost, N m⁻¹

κ_e – molekularni parametar analita⁷⁹

Jednadžba (10) opisuje utjecaj različitih faktora na faktor kapaciteta (k):

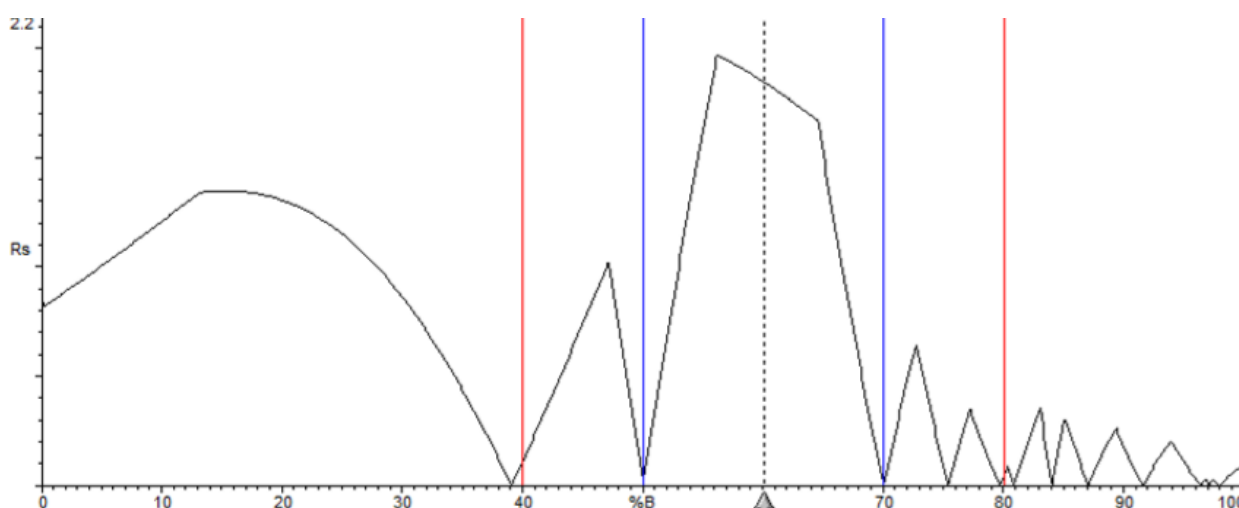
- utjecaj pokretne faze preko površinske napetosti (γ) koja ovisi o sastavu pokretne faze,
- utjecaj temperature,
- utjecaj strukture analita i njegovog dipolnog momenta,
- utjecaj vrste nepokretne faze
- utjecaj slobodnih energija i elektrostatskih svojstava^{80,81,83}

Kako se solvofobna teorija temelji na utjecaju pokretne faze na zadržavanje analita, uloga nepokretne faze pada u drugi plan, odnosno ne uzima se u obzir vrsta nepokretne faze koja se koristi prilikom eksperimenata.

Računalni program DryLab® većinski se temelji na solvofobnoj teoriji uz dodatnu primjenu egzo – termodinamičkih modela. Egzo – termodinamička ovisnost se odnosi na zadržavanje analita, a definira se kao slobodna energija vezivanja (engl. *linear free energy relationship*, LFER), koja se sastoji od linerane solvatacijske energije vezivanja (engl. *linear solvation energy relationship*, LSER) i kvantitativne strukturne aktivnosti (engl. *quantitative structure activity*, QSAR)⁸¹.

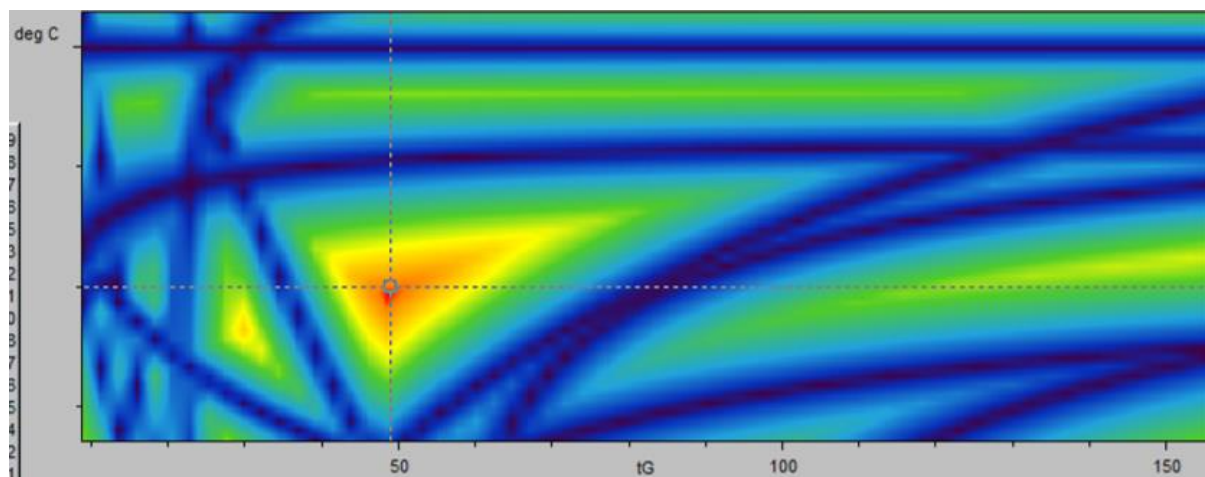
Prije optimizacije metode pomoću softvera DryLab® potrebno je provesti niz eksperimenata ovisno o planu variranja pojedinih parametara metode. Samim programom, koji je jednostavan za uporabu, prati se promjena vremena zadržavanja praćenih analita s obzirom na mijenjane parametre. Program na temelju unesenih podataka (dobivenih kromatograma upotrebom raznih kombinacija parametara) generira takozvanu kritičnu mapu razlučivanja (engl. *critical resolution map*, CRM), model koji definira najmanju vrijednost faktora razlučivanja (R_s) između dvaju analita čije je razlučivanje najlošije (kritični par).

Ovisno o broju praćenih parametara prilikom optimizacije kromatografske metode, program generira jedno ili više dimenzijsku mapu razlučivanja. Promjenom jednog parametra, kritična vrijednost faktora razlučivanja u 1D prikazu predstavljena je na ordinati (slika 8).



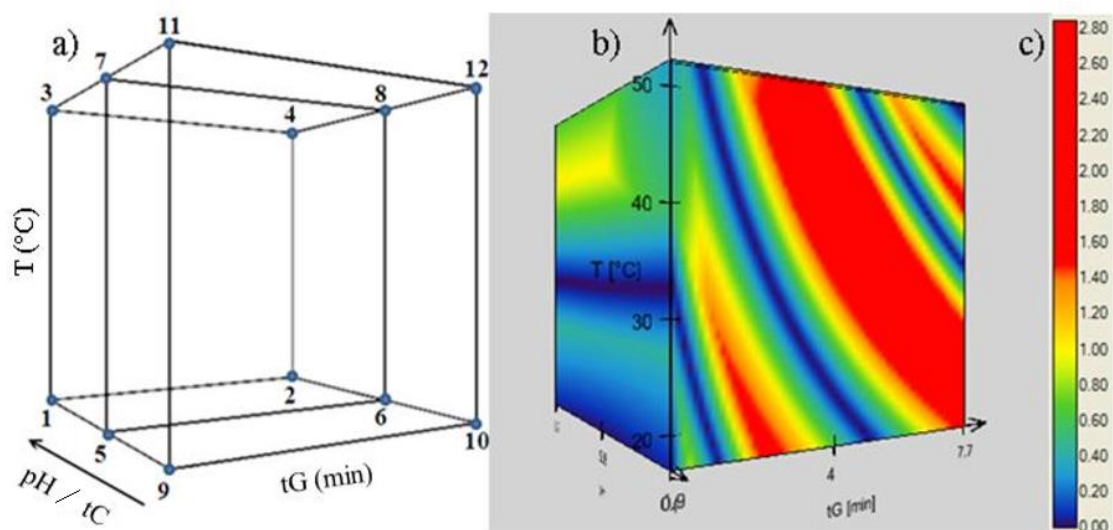
Slika 8. Primjer 1D mape razlučivanja⁸⁴

Dvodimenzionalna mapa razlučivanja uzima u obzir utjecaj dvaju parametara, a kritična vrijednost faktora razlučivanja predstavljena je površinama različitih boja. (slika 9)



Slika 9. Primjer 2D mape razlučivanja⁸⁴

Od 2009. godine, moguće je istovremeno pratiti utjecaj triju kritičnih parametara, te se u tom slučaju konstruira 3D mapa razlučivanja, a prikazana je kockom. Crvena boja predstavlja mjesta gdje je razlučivanje zadovoljavajuće, dok su plavom bojom označena mjesta gdje se pojavljuju problemi tijekom analize poput preklapanja pikova (slika 10).



Slika 10. Primjer 3D mape razlučivanja. a) Struktura modela kocke – točke predstavljaju kromatograme dobivene pojedinom kombinacijom parametara, b) boje predstavljaju postignuto razlučivanje⁸⁵

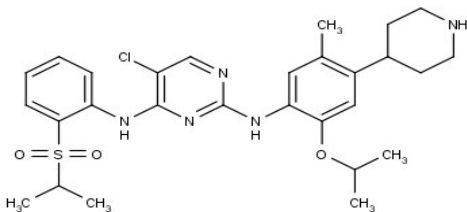
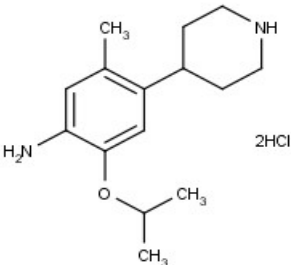
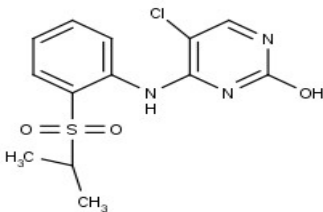
Primjenom programa DryLab® dobiva se dakle vizualni prikaz područja robusnosti metode, odnosno područja u kojem promjena parametara pozitivno ili negativno utječe na efikasnost metode, što uvelike olakšava optimizaciju metoda pristupom kvalitete ugrađene u dizajn. Također, korištenjem softvera moguće je unaprijediti prethodno razvijene metode koje su i dalje u upotrebi, a zahtijevaju jako puno vremena ili potrošnju velikih količina otapala za analizu.⁸⁶

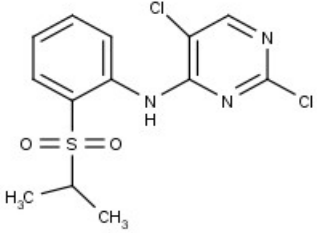
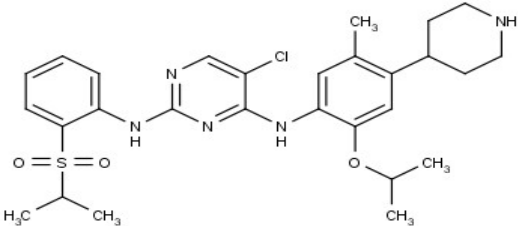
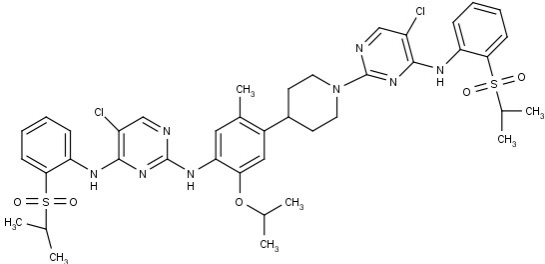
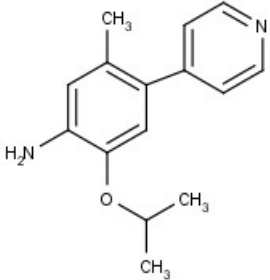
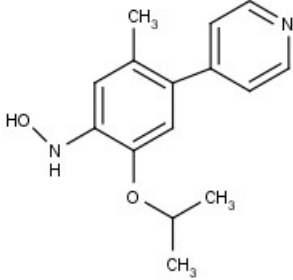
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

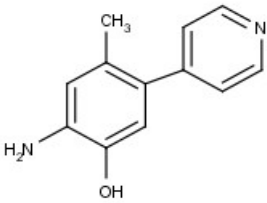
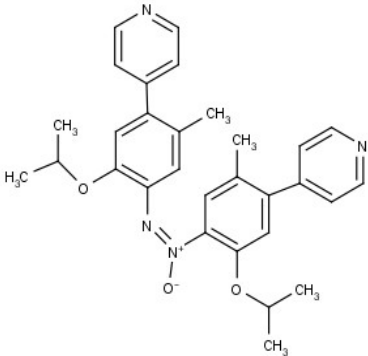
3.1. Polazni materijali

Kao polazni materijal korišten je uzorak ceritiniba, CRT-B-21, onečišćenja CRT – 1, CRT imp 1, CRT – 2, CRT imp 3, CRT imp 2, PGI 1 (TDM/3246/65-A1), PGI 2 (TDM/3246/76-C), PGI 3 (DŠ/12/20) i PGI 4 (TDM/3246/64-T4). Strukture djelatne tvari ceritinib i onečišćenja ceritiniba prikazane su tablicom 2.

Tablica 2. Oznake i strukture korištenih uzoraka.

Oznaka uzorka	Struktura	Proizvođač
CRT		TAPI PLIVA Hrvatska
CRT - 1		TAPI PLIVA Hrvatska
CRT imp 1		TAPI PLIVA Hrvatska

CRT- 2		TAPI PLIVA Hrvatska
CRT imp 3		TAPI PLIVA Hrvatska
CRT imp 2		TAPI PLIVA Hrvatska
PGI 1		TAPI PLIVA Hrvatska
PGI 2		TAPI PLIVA Hrvatska

PGI 3		TAPI PLIVA Hrvatska
PGI 4		TAPI PLIVA Hrvatska

- **Kemikalije**

- Acetonitril, CH₃CN, LC čistoće prema europskoj farmakopeji (J. T. Baker, Engleska)
- Amonijak, NH₃, vodena otopina, ≥25 % NH₃ u H₂O (Honeywell, Njemačka)
- Amonijev formijat, NH₄HCO₂, za HPLC, ≥99,0 % (Honeywell, Njemačka)
- Klorovodična kiselina, 37% (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
- Kalijev hidrogen fosfat, KH₂PO₄, za HPLC, ≥99,0 % (Honeywell, Njemačka)
- Metanol, CH₃OH, LC čistoće prema europskoj farmakopeji Ph Eur (J. T. Baker, Engleska)
- Mravlja kiselina, HCOOH, aditiv za LC-MS (Honeywell, Njemačka)
- Fosforna kiselina, H₃PO₄, (J. T. Baker, Engleska)
- Kalijev hidroksid, KOH (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid, NaOH (p.a.) (Kemika, Hrvatska)
- Visoko pročišćena voda
- Vodikov peroksid, 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 μm
- **Računalni program:** Waters®Empower™ softver

- **LC-MS/MS (QqQ) (slika 11)**
- **Kromatograf:** 1290 Infinity LC System (Agilent, SAD)
 - Binarna pumpa
 - Detektor: DAD
 - Automatski uzorkivač s kontrolom temperature
 - Injektorski sustav
- **Kromatografska kolona:** YMC-Triart C18, 100 mm · 2,0 mm, 1,9 μm
- **Detektor:** 6490 TripleQuad (Agilent, SAD)
 - ESI sustav za ionizaciju
 - Uređaj za samouzorkovanje
- **Računalni program:** Agilent MassHunter softver



Slika 11. Vezani sustav tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti–spektrometar masa s trostrukim kvadropolom, Agilent 6490

- **LC-MS (Q-TOF) (slika 12)**
- **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



Slika 12. Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-Q-TOF)

Ostala oprema:

- Uređaj za vodu Millipore Milli-Q
- Mikrovaga, model XP56 (Mettler-Toledo AG, Švicarska)
- pH metar, model PHM220 (Radiometer Analytical SAS, Francuska)
- Ultrazvučna kupelj, Sonorex digital 10P (Bandelin, Njemačka)
- Viale za instrument od 2,0 mL, PTFE čepovi sa silikonskom septom

3.3. Nepokretne faze korištene u razvoju metoda

3.3.1. Nepokretne faze korištene prilikom razvoja metode za analizu genotoksičnih onečišćenja ceritiniba

Za razvoj metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti za analizu genotoksičnih onečišćenja ispitane su dvije kromatografske kolone istih dimenzija 100 mm x 2,1 mm i promjera čestica punila 1,7 μm sa različitim nepokretnim fazama / Waters Acquity BEH C18 i Waters Acquity BEH Phenyl). Dodatno, ispitane su dvije kolone drugačijih

dimenzija, Waters Symmetry te YMC Triart. Dimenzije kolona i vrste punila navedenih kromatografskih kolona prikazane su tablicom 3.

Tablica 3. Dimenzije kolona i vrsta punila kromatografskih kolona korištenih u razvoju metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti

Naziv	Nepokrenta faza	Dimenzije
Waters Acquity BEH C18	C18	100 · 2,1 mm, 1,7 µm
Waters Symmetry	C18	50 · 2,1 mm, 3,5 µm
Waters Acquity BEH Phenyl	fenil	100 · 2,1 mm, 1,7 µm
YMC-Triart	C18	100 · 2,0 mm, 1,9 µm

3.3.2. *Nepokretne faze korištene prilikom razvoja metode za analizu onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba*

Za razvoj metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti za analizu onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba ispitane su dvije kolone istih dimenzija, ali različitih punila. Dimenzije kolona i vrsta punila ispitanih kromatografskih kolona prikazane su tablicom 4.

Tablica 4 Dimenzije kolona i vrsta punila kromatografskih kolona korištenih u razvoju metode za analizu onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba.

Naziv	Nepokretna faza	Dimenzije
Waters Acquity BEH C18	C18	100 · 2,1 mm, 1,7 µm
Waters Acquity BEH Phenyl	fenil	100 · 2,1 mm, 1,7 µm

3.4. Pokretne faze i otapala

3.4.1. Pokretne faze i otapala korišteni prilikom razvoja metoda za analizu genotoksičnih onečišćenja ceritiniba

Za pripremu vodene pokretne faze pipetirano je 1,0 mL mravlje kiseline (HCOOH) u 1000 mL vode uz miješanje na magnetskoj mješalici. Kao organska pokretna faza probno su korišteni metanol i acetornitril. Zbog slabe topljivosti ceritiniba i relativno visoke testne koncentracije (2 g L⁻¹), kao otapalo korišten je čisti metanol.

3.4.2. Pokretne faze i otapala korišteni prilikom razvoja metode za analizu onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba

U svrhu početne provjere područja pH u kojem je moguće dobiti optimalne uvjete za analizu, korištene su dvije vodene pokretne faze:

- 1,0 mL NH₃ (≥ 25 %) u 1000 mL vode
- 1,0 mL HCOOH u 1000 mL vode

Otopine su filtrirane preko filtera veličina pora 0,2 μm direktno u staklenu bocu od 1 L.

Uz provjeru pogodnog pH područja korištenjem vodenih otopina visoke, odnosno niske pH vrijednosti, kao organske pokretne faze isprobani su acetonitril i metanol s ciljem provjere utjecaja tih dvaju otapala na kromatografsku sliku (rezolucija, izgled pikova, jačina elucije).

Priprema pufera

S obzirom na rezultate dobivene početnom provjerom upotrebom gore navedenih vodenih pokretnih faza, pripravljena su četiri pufera koncentracija 10 mmol L⁻¹. Za DryLab analizu korišteni su fosfatni puferi vrijednosti pH 2,0, 4,0 i 6,0. Za daljnju provjeru softverski optimirane metode korišten je fosfatni pufer vrijednosti pH 4,3, dok je za analizu razgradnih produkata korišten acetatni pufer. Priprema pufera prikazana je tablicom 5.

Tablica 5. Priprema pufera za razvoj i validaciju metode za analizu onečišćenja i razgradnih produkata ceritiniba

Sol	Odvaga/g	V (H ₂ O) /mL	Prilagodba vrijednosti pH	Vrijednost pH
KH ₂ PO ₄	1,362	1000	H ₃ PO ₄ /KOH	2,0
KH ₂ PO ₄	1,361	1000	H ₃ PO ₄ /KOH	4,0
KH ₂ PO ₄	1,362	1000	H ₃ PO ₄ /KOH	6,0
KH ₂ PO ₄	1,363	1000	H ₃ PO ₄ /KOH	4,3
HCOONH ₄	0,62	1000	HCOOH/NH ₃	4,3

Isprobani su razni omjeri metanola i vode kao potencijalno otapalo, a u konačnici je korišten omjer 9:1 (MeOH : H₂O).

3.5. Priprema uzoraka i razvoj metode za analizu genotoksičnih onečišćenja

3.5.1. Priprema otopina uzoraka za razvoj metode UHPLC

Za pripravu otopina masene koncentracije 0,5 g L⁻¹ izvagano je po 10 mg uzorka svakog onečišćenja (PGI 1, PGI 2, PGI 3 I PGI 4) u tikvice od 20 mL. Nakon otapanja uzorka u manjoj količini metanola na ultrazvučnoj kupelji, tikvice su nadopunjene do oznake metanolom. U tikvicu od 5 mL odvagano je 10 mg uzorka ceritiniba, dodano po 1 mL svake otopine uzorka te je tikvica nadopunjena do oznake metanolom. Dobivena otopina korištena je za razvoj UHPLC metode.

3.5.2. Priprema otopina za podešavanje parametara analize

Za optimizaciju uvjeta LC-MS/MS metode korištena je otopina uzorka potencijalno genotoksičnih onečišćenja masene koncentracije 1 mg L⁻¹. Otopine početne masene koncentracije 0,5 g L⁻¹ razrijeđene su 500 puta na način da je prvotno pipetiran po 1 mL svake od četiriju otopina u tikvicu od 25 mL te je tikvica nadopunjena do oznake metanolom (0,02 g L⁻¹), a zatim je dobivena otopina razrijeđena 20 puta (1 mL / 20 mL).

3.5.3. Razvoj metode UHPLC-MS/MS

U svrhu razvoja kromatografske metode isprobane su četiri kolone navedene u poglavlju 3.3.. Kao pokretna faza korišteni su mravlja kiselina 0,1% (vodena pokretna faza) te metanol i

acetonitril (organska pokretna faza). Uzorci onečišćenja i djelatne tvari analizirani su linearnim gradijentom od 0%-90% organske pokretne faze u trajanju od 15 minuta. Na temelju kromatograma dobivenih različitim kombinacijama parametara, odabrana je kolona, pokretna faza, te je prilagođen gradijent.

Za razvoj snimanja MS/MS isproban je pozitivan i negativan mod. U svrhu definiranja najboljih uvjeta za fragmentaciju iona isprobane su četiri različite vrijednosti kolizijske energije: 0, 10, 20 i 40 V. Za optimizaciju i stabilnost signala MS variran je i protok plina za sušenje u skladu s protokom na kromatografskoj koloni.

3.5.4. Priprema otopina za određivanje linearnosti te granica kvantifikacije i detekcije

Iz otopine masene koncentracije 1 mg L^{-1} pripremljena za podešavanje parametara analize priređene su otopine za ispitivanje linearnosti kako je prikazano u tablici 6.

Tablica 6. Priprema otopina uzoraka potencijalno genotoksičnih onečišćenja ceritiniba za ispitivanje linearnosti te za ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije.

Oznaka	Konačna masena koncentracija / $\mu\text{g L}^{-1}$	ppm	Priprema*		
			V_0/mL	Iz otopine	$V_{\text{UK}} / \text{mL}$
LOD	0,5	0,25	1	L5	20
L1 (LOQ)	1,0	0,5	2	L5	20
L2	2,0	1,0	1	S1	20
L3	4,0	2,0	2	S1	20
L4	6,0	4,0	2	S2	20
L5	10	5,0	2	S3	20
S1	40	20	1	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	25
S2	60	30	3	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	50
S3	100	50	2	$1 \mu\text{g mL}^{-1}$	20

Otopine LOD i L1 (LOQ) priređene su iz otopine L5. Otopina L5 priređena je iz otopine S3. Otopine L2 i L3 priređene su iz otopine S1. Otopina L4 priređena je iz otopine S2. Otopine S1, S2 i S3 priređene su iz otopine masene koncentracije $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Otopine L1- L5 analizirane su razvijenom metodom. Rezultati su obrađeni na način da je iz nacrtanog baždarnog dijagrama određen nagib pravca, odsječak i koeficijent korelacije.

Prema uputi ICH za dozvoljene koncentracije genotoksičnih onečišćenja u uzorcima aktivne tvari, koncentracijska granica u ppm računa se prema formuli 11:

$$\text{Koncentracijska granica (ppm)} = \frac{TTC}{\text{doza}} \quad (11)$$

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

S obzirom na maksimalnu dnevnu dozu ceritinib aktivne tvari od 750 mg, te dozvoljenu razinu dnevne doze unosa genotoksičnih tvari $TTC = 1,5 \mu\text{g dan}^{-1}$, specifikacija za genotoksična onečišćenja u ceritinibu postavljena je na razini od 2 ppm, odnosno $4 \mu\text{g L}^{-1}$. Granica kvantifikacije određena je s obzirom na omjer signala kromatografskog pika i šuma bazne linije za svaki analit te iznosi $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,5 ppm radne koncentracije uzorka). Otopina masene koncentracije $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,25 ppm radne koncentracije uzorka) odabrana je kao granica detekcije s obzirom na omjer signala i šuma. Višestruko priređene otopine „LOD“ (3 pripreme) i „LOQ“ (6 priprema) analizirane su razvijenom metodom.

3.5.5. Priprema otopina za određivanje točnosti

U svaku od 12 odmjernih tikvica volumena 10 mL dodano je po 20 mg uzorka ceritiniba oznake CRT-B-21. Dodan je po 1 mL otopina onečišćenja poznatih koncentracija kako je prikazano tablicom 7 te su tikvice nadopunjene metanolom do oznake. Dodatno je pripremljen uzorak gotovog oblika Zykadia, na način da je tableta homogenizirana, a potom je također vagano oko 20 mg uzorka u tikvicu volumena 10 mL, dodano je po 1 mL otopina onečišćenja poznatih koncentracija (tablica 7). Tikvice su zatim nadopunjene metanolom do oznake.

Tablica 7. Priprema otopina za određivanje točnosti

γ / $\mu\text{g L}^{-1}$	$m(\text{CRT-b-21})$ / mg	$m(\text{Zykadia, prah})$ / mg	γ (početna otopina) / $\mu\text{g L}^{-1}$	V (početna otopina) / mL	V (metanol) / mL
1,0*	20,12	/	10	1	9
4,0*	20,31	/	40	1	9
10,0*	19,78	/	100	1	9
1,0		21,03	10	1	9
4,0		20,97	40	1	9
10,0		20,44	100	1	9

*Otopine su priređene u triplikatu u odmjernim tikvicama volumena 10 mL te su višestruko injektirane

3.5.6. *Određivanje ponovljivosti metode*

Ponovljivost metode ispitana je analizom otopina priređenih za određivanje granica kvantifikacije i detekcije, te otopina pripremljenih za studiju točnosti.

3.5.7. *Promjena parametara metode u svrhu određivanja robusnosti*

U svrhu ispitivanja robusnosti metode istražen je utjecaj malih promjena pojedinačnih parametara metode na kromatografsku analizu. Napravljene su analize pojedinih otopina pripremljenih za određivanje linearnosti na način da je protok izmijenjen za $\pm 0,05 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura kolone za $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, te je korištena istovjetna kolona drugog serijskog broja.

3.5.8. *Stabilnost otopina*

Stabilnost pripremljenih otopina ispitana je na način da su otopine pripremljene za analizu analitičkog povrata čuvane u hladnjaku 48 sati te ponovno analizirane razvijenom metodom.

3.6. Priprema uzoraka i razvoj metode za analizu razgradnih produkata ceritiniba

3.6.1. Priprema otopina uzoraka za razvoj metode

Pripremljena je otopina masene koncentracije $0,25 \text{ g L}^{-1}$ otapanjem po 5 mg svakog onečišćenja u tikvicu od 20 mL. Dodano je $\sim 7 \text{ mL}$ otapala te je tikvica ostavljena na ultrazvučnoj kupelji 2 minute, a potom nadopunjena otapalom do oznake. U tablici 8 prikazane su točne odvage svakog onečišćenja.

Tablica 8. Odvage uzoraka onečišćenja

Ime uzorka	<i>m/mg</i>
CRT - 1	4,988
CRT imp 1	5,014
CRT - 2	5,029
CRT imp 3	4,991
CRT imp 2	5,043

U tikvicu od 10 mL otpipetiran je 1 mL pripremljene otopine masene koncentracije $0,25 \text{ g L}^{-1}$ te je tikvica do oznake nadopunjena otapalom, čime je dobivena otopina masene koncentracije $0,025 \text{ g L}^{-1}$. Otopina masene koncentracije $0,01 \text{ g L}^{-1}$ priređena je na način da je otpipetirano 4 mL otopine masene koncentracije $0,025 \text{ g L}^{-1}$ u tikvicu od 10 mL te je tikvica nadopunjena otapalom do oznake. Iz otopine masene koncentracije $0,01 \text{ g L}^{-1}$ priređena je otopina granice kvantifikacije koncentracije $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ razrjeđenjem 1 mL u 20 mL. Dobivena otopina onečišćenja za potvrđivanje granice kvantifikacije čini 0,05 % testne masene koncentracije uzorka ceritiniba za određivanje onečišćenja (1 mg/mL).

U tri tikvice od 5 mL odvagano je po 5 mg djelatne tvari (uzorka ceritiniba) oznake CRT-B-21. Sadržaj prve tikvice otopljen je u otopini onečišćenja masene koncentracije $0,01 \text{ g L}^{-1}$, druge u otopini onečišćenja masene koncentracije $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, a sadržaj treće tikvice otopljen je u čistom otapalu.

3.6.2. *Razvoj metode UHPLC*

Snimljeni su spektri UV/VIS svakog onečišćenja i ceritinib djelatne tvari kako bi se mogla odabrati najpovoljnija valna duljina snimanja. Tijekom razvoja kromatogrami su snimani pri trima vrijednostima valnih duljina (210 nm, 240 nm, 270 nm). Od promjenjivih parametara korištene su dvije različite kolone, te različite pokretne faze (otopina amonijaka i otopina mravlje kiseline kao vodene pokretne faze, te metanol i acetonitril kao organske pokretne faze). Konstantni parametri tijekom početnog dijela razvoja su bili gradijent, protok i temperatura kromatografske kolone. Primjer jednog od eksperimenata za razvoj metode prikazan je tablicom 9.

Tablica 9. Parametri četvrtog eksperimenta za razvoj metode UHPLC

Kolona	WATERS Acquity BEH C18; 100 · 2,1 mm; 1,7 µm		
Pokretna faza A	Otopina HCOOH (0,1%)		
Pokretna faza B	ACN		
Gradijent	<i>t</i> / min	pokretna faza A / %	pokretna faza B / %
	0,00	95	5
	10,00	10	90
	12,00	10	90
	12,01	95	5
	14,00	95	5
Otapalo	MeOH : MiliQ voda (8: 2)		
Volumen injektiranja / µL	1		
Protok / mL min⁻¹	0,35		
valna duljina / nm	210, 240, 270		
Temperatura kolone / °C	30		

Po završetku početnih eksperimenata odabrani su područje pH, kolona i pokretne faze. Za daljnji razvoj i optimizaciju uvjeta korišten je program DryLab. Varirani parametri prikazani su tablicom 10.

Tablica 10. Parametri eksperimenata za razvoj i optimizaciju metode pomoću programa Drylab.

Kolona	WATERS Acquity BEH Phenyl 100 · 2,1 mm, 1,7 µm		
Pokretna faza A	KH ₂ PO ₄		
Pokretna faza B	CH ₃ CN		
Pokretna faza B / %	5-90		
Valna duljina / nm	210		
Trajanje gradijenta / min	13		25
Temperatura / °C	30		60
Vrijednosti pH	2,0	4,0	6,0

3.6.3. Priprema reagensa za forsiranu razgradnju

Za studiju forsirane razgradnje ceritiniba u oksidativnim, kiselim i lužnatim uvjetima pripremljene su otopine različitih koncentracija klorovodične kiseline, natrijevog hidroksida i vodikovog peroksida kako je prikazano u tablici 11.

Tablica 11. Priprema reagensa odgovarajućih koncentracija za forsiranu razgradnju

Reagens	Količina (reagens)	V (ukupno)	Koncentracija/volumni udio
HCl (37% p.a.)	3,33 mL	20,00 mL	2,0 mol L ⁻¹
HCl (37% p.a.)	8,32 mL	20,00 mL	5,0 mol L ⁻¹
NaOH (p.a.)	1,62 g	20,00 mL	2,0 mol L ⁻¹
NaOH (p.a.)	4,03 g	20,00 mL	5,0 mol L ⁻¹
H ₂ O ₂ (30% p.a.)	11,85 mL	20,00 mL	20%
H ₂ O ₂ (30% p.a.)	20,00 mL	20,00 mL	30%

3.6.4. Priprema otopina uzoraka za forsiranu razgradnju

Temeljna standardna otopina (engl. *stock solution*) certiniba pripremljena je otapanjem 100,24 mg uzorka u 50 mL otapala ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$).

Priređena je otopina ceritiniba masene koncentracije 1 g L^{-1} (ishodna otopina / otapalo=1/1) bez dodatka reagensa koja je poslužila kao kontrolna otopina za provjeru razgradnje do koje dolazi dodatkom pojedinih reagensa.

Otopine za reakcije forsirane razgradnje pripremljene su u tikvicama od 5 mL. U prvu tikvicu dodano je 2 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L^{-1} te 2 mL otopine HCl koncentracije 2 mol L^{-1} . Tikvica s tako pripremljenom otopinom ostavljena je u pećnici 30

minuta na 60 °C. Nakon što se sadržaj tikvice ohladio otopina je neutralizirana dodatkom 2 mL NaOH koncentracije 2 mol L⁻¹ u svrhu zaustavljanja reakcije razgradnje. U drugu tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL otopini ceritiniba masene koncentracije 2 g L⁻¹ te 2 mL otopine HCl koncentracije 5 mol L⁻¹. Sadržaj je također zagrijan 30 minuta na 60 °C, a potom neutraliziran dodatkom 2 mL otopine NaOH koncentracije 5 mol L⁻¹.

U treću tikvicu dodano je 2 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L⁻¹ te 2 mL otopine NaOH koncentracije 2 mol L⁻¹. Pripremljena otopina je ostavljena u pećnici 30 minuta na 60 °C te je nakon kratkog hlađenja neutralizirana dodatkom 2 mL otopine HCl koncentracije 2 mol L⁻¹. U četvrtu tikvicu dodano je 2 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L⁻¹ te 2 mL otopine NaOH koncentracije 5 mol L⁻¹. Nakon zagrijavanja 30 minuta na 60 °C, otopina je neutralizirana dodatkom 2 mL otopine HCl koncentracije 5 mol L⁻¹.

U petu tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L⁻¹ te 2 mL 20 % H₂O₂. Tikvica je stavljena na zagrijavanje 30 minuta pri temperaturi od 60 °C. U šestu tikvicu od 5 mL dodano je 2 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L⁻¹ te 2 mL otopine 30% H₂O₂. Tikvica je zagrijavana 30 minuta na 60 °C.

Prvi rezultati dobiveni analizom pomoću instrumenta UHPLC pokazali su da su potrebne veće koncentracije kiseline/baze ili ekstremniji uvjeti u kojima se odvija reakcija kako bi došlo do razgradnje ceritiniba. Pri opisanim uvjetima do raspada ceritiniba došlo je samo pod utjecajem 20 % H₂O₂ i 30 % H₂O₂.

Za razgradnju pri nešto ekstremnijim uvjetima najprije su priređene otopine na način da je u tikvice od 5 mL dodano po 2 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L⁻¹. U prvu tikvicu uz otopinu ceritiniba dodano je 2 mL otopine HCl koncentracije 5 mol L⁻¹, u drugu 2 mL NaOH koncentracije 5 mol L⁻¹. Sadržaj tikvica je zagrijavan 60 minuta na 80 °C, te je nakon zagrijavanja neutraliziran odgovarajućom kiselinom (HCl), odnosno, bazom (NaOH) koncentracije 5 mol L⁻¹.

Također su priređeni uzorci koji su zagrijavani dulji vremenski period s ciljem odvijanja reakcije razgradnje. U tikvice od 5 mL dodano je po 2 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L⁻¹. U prvu tikvicu dodano je 2 mL otopine HCl koncentracije 5 mol L⁻¹, u drugu 2 mL otopine NaOH koncentracije 5 mol L⁻¹, u treću 2 mL otopine NaOH koncentracije 2 mol L⁻¹. Otopine uzorka su zagrijavanje 2 dana pri temperaturi od 70 °C. Nakon zagrijavanja tikvice su prvo nadopunjene otapalom do ukupnog volumena od približno 4 mL zbog isparavanja otapala tijekom 2 dana, a potom je sadržaj tikvica neutraliziran kiselinom, odnosno

bazom odgovarajuće koncentracije. Isti eksperiment ponovljen je uz zagrijavanje 6 dana pri 70 °C.

Dodatno je provjeren utjecaj samog zagrijavanja na otopinu ceritiniba te na neotopljeni, praškasti uzorak ceritiniba. U tikvicu od 5 mL dodano je 4 mL otopine ceritiniba masene koncentracije 2 g L^{-1} , a u petrijevu posudu izvagano je oko 500 mg uzorka CRT-B-21. Uzorci su zagrijavani 10 dana pri 70 °C. Uzorci su razrijeđeni, odnosno otopljeni na način da su otopine za analizu iznosile $\sim 1 \text{ g L}^{-1}$.

Za analizu su također priređene slijepa probe s korištenim reagensima i otapalima kako bi se iz kromatograma mogli izuzeti pikovi koji nisu posljedica razgradnje ceritiniba.

U tablici 12 prikazani su uvjeti svih provedenih eksperimenata razgradnje ceritiniba.

Tablica 12. Uvjeti provedenih eksperimenata forsirane razgradnje.

	Uzorak	Reagens	Temperatura / °C	Vrijeme
1	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	20 % H ₂ O ₂	60	30 min
2	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	30 % H ₂ O ₂	60	30 min
3	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	2 mol L ⁻¹ HCl	60	30 min
4	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	5 mol L ⁻¹ HCl	60	30 min
5	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	5 mol L ⁻¹ HCl	80	60 min
6	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	5 mol L ⁻¹ HCl	70	2 dana
7	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	5 mol L ⁻¹ HCl	70	6 dana
8	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	2 mol L ⁻¹ NaOH	60	30 min
9	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	5 mol L ⁻¹ NaOH	60	30 min
10	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	5 mol L ⁻¹ NaOH	80	60 min
11	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	2 mol L ⁻¹ NaOH	70	2 dana
12	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	5 mol L ⁻¹ NaOH	70	2 dana
13	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	2 mol L ⁻¹ NaOH	70	6 dana
14	Otopina CRT-B-21 ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$)	/	120	7 dana
15	CRT-B-21 (prašak)	/	120	7 dana

3.6.5. Uvjeti mjerenja analize LC-MS/MS

Uspješnost razgradnje ceritiniba postignute provedenim eksperimentima provjeravana je metodom UHPLC razvijenom za analizu onečišćenja ceritiniba. Za nepoznate pikove uzoraka kod kojih je došlo do razgradnje snimljeni su MS spektri, uspoređeni sa spektrima slijepe probe, te zabilježeni za daljnju analizu. Na ionima s odabranim omjerom m/z provedeni su eksperimenti MS/MS pri različitim kolizijskim energijama (0, 10, 20, 30, 40 V).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Klasifikacija potencijalno genotoksičnih onečišćenja

Onečišćenja PGI 1-4 proglašena su potencijalno genotoksičnima u skladu s literaturnim podacima iz literature Müller et al.⁸⁷ te predikcijom pomoću softvera DEREK⁸⁸. Prema Mülleru, onečišćenja je moguće kategorizirati unutar 5 kategorija. Potvrđeno genotoksična onečišćenja svrstavaju se u kategorije 1 i 2, dok se onečišćenja čija struktura upućuje na potencijalnu genotoksičnost klasificiraju kao onečišćenja kategorije 3. Kako sama djelatna tvar ceritnib pripada kategoriji 4 prema Mülleru, onečišćenja svrstana u tu kategoriju nisu relevantna za određivanje pomoću ove analize, dok onečišćenja kategorije 5 ne posjeduju skupine koje bi mogle izazvati genotoksična oštećenja kod ljudi.⁸⁷

Računalnom analizom pomoću softvera DEREK Nexus (verzija 4.1.0) postavljena su predviđanja u skladu sa stručnim predikcijama temeljenim na određenim pravilima, dok je za statistička predviđanja korišten program Sarah Nexus (verzija 1.2.0).

DEREK analizom onečišćenja kategorija 1, 2 i 3, ista su klasificirana prema DEREK pojmovniku;

„**Certain**“ – postoji dokaz da je propozicija točna

„**Probable**“ – postoji barem jedan jaki argument da je propozicija točna, a nema argumenata protiv.

„**Equivocal**“ – Postoje podjednako jaki argumenti za i protiv propozicije.

„**Doubted**“ – Argumenti nisu na strani propozicije.

„**Improbable**“ – Postoji barem jedan jaki argument da je propozicija netočna, bez ijednog argumenta da je točna.

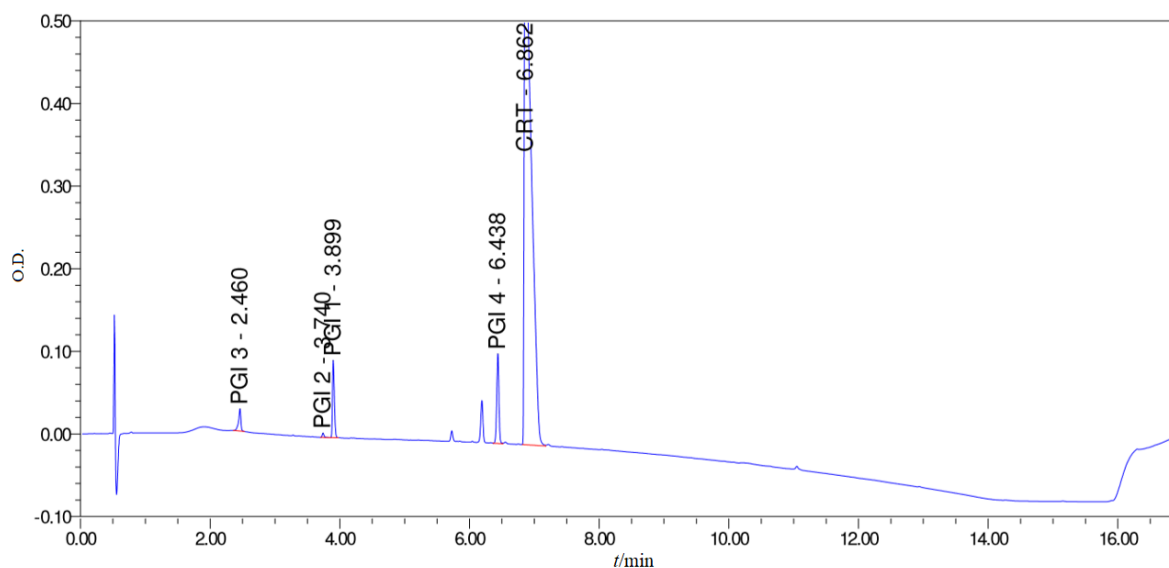
„**Open**“ – Ne postoje dokazi koji podržavaju ili pobijaju propoziciju.

„**Contradicted**“ – Postoje dokazi da je propozicija i točna i netočna.

Prema softverskoj analizi odrađenoj u TEVI, sva četiri onečišćenja (PGI 1-4) klasificirana su oznakom „Equivocal“, stoga su za razvoj metode tretirana kao potencijalno genotoksična onečišćenja.

4.2. Razvoj metode UHPLC za analizu potencijalno genotoksičnih onečišćenja

U svrhu razvoja kromatografske metode isprobane su četiri kolone navedene u poglavlju 3.3.1. Upotrebom kolone Waters Acquity BEH Phenyl uočeno je da se ceritinib eluira prije onečišćenja PGI 4, a zbog analize MS zaključeno je da bi bilo praktičnije i sigurnije da se ceritinib eluira posljednji. Tijekom provođenja kromatografskih analiza uvijek postoji mogućnost malih promjena u retencijskim vremenima, stoga je ovaj redoslijed elucije najpovoljniji jer se odmah po eluciji pikova onečišćenja može zaustaviti prolazak uzorka prema detektoru MS, čime se detektor štiti od kontaminacije (osobito kada se radi o velikim količinama uzorka kao što je slučaj s provjerom parametra analitičkog povrata). Upotrebom kolone YMC Triart C18 primijećeno je bolje odvajanje pikova onečišćenja PGI 1 i PGI 2 u odnosu na kolonu Waters Acquity BEH C18. Kolona Waters Symmetry C18 isključena je zbog razvlačenja pikova, odnosno lošijeg izgleda pikova. Kao organska pokretna faza odabran je acetonitril zbog lošije elucijske efikasnosti metanola. Konačni kromatogram prikazan je slikom 13, dok su uvjeti snimanja prikazani tablicom 13.



Slika 13. Kromatogram dobiven konačnom verzijom metode za analizu genotoksičnih onečišćenja ceritiniba, čiji su uvjeti navedeni tablicom 13.

Tablica 13. Uvjeti kromatografske analize genotoksičnih onečišćenja.

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

Za uvjete snimanja MS/MS odabran je pozitivan mod zbog znatno većeg intenziteta pikova u odnosu na negativan mod snimanja. Isprobane su 4 različite vrijednosti kolizijske energije (0 V, 10 V, 20 V i 40 V) za odabir najpogodnije fragmentacije sva četiri onečišćenja. Fragmentacija molekula onečišćenja pri četiri vrijednosti kolizijskih energija prikazana je u Dodatku (slike D1-D4). Za onečišćenje PGI 1 snimani su spektri pri 0 V i 20 V, te su u konačnici odabrani oni snimljeni pri 20 V. Onečišćenje PGI 2 snimano je pri 10 V i 20 V, također je

odabrana energija od 20 V („MRM“, engl. *Multiple Reaction Monitoring*). Za onečišćenja PGI 3 i PGI 4 snimanje je provedeno pri 0 V i 20 V, te je za validaciju, odnosno konačnu verziju metode odabrano 0 V, takozvani „SIR“ mod snimanja (engl. *Selected Ion Recording*). Protok plina za sušenje podešen je na 15 L min⁻¹, dok je protok plina nosioca iznosio 3 L min⁻¹. Uvjeti snimanja prikazani su tablicom 14, a parametri fragmentacije iona onečišćenja tablicom 15.

Tablica 14. Uvjeti snimanja MS/MS

Parametar	Vrijednost (+)	Vrijednost (-)
Temperatura plina (°C)	100	100
Protok plina (L min⁻¹)	15	15
Raspršivač (psi)	15	15
Grijač plina nosioca (°C)	125	125
Protok plina nosioca (L min⁻¹)	3	3
Napon na kapilari (V)	3000	3000

Tablica 15. Parametri fragmentacije QqQ MS/MS uz pozitivnu ionizaciju

Onečišćenje	Ion prekursor	Ion produkt	Fragmentacija / V	Kolizijska energija / V	Napon / V
PGI 1	243,0	201,0	380	20	4
PGI 2	259,1	227,0	380	20	5
PGI 3	201,1	201,1	380	0	5
PGI 4	497,1	497,1	380	0	4

4.3. Validacija metode za analizu potencijalno genotoksičnih onečišćenja

4.3.1. Kriteriji prihvatljivosti validacije

Prilikom validacije analitičkih metoda potrebno je odrediti kriterije prihvatljivosti pomoću kojih je potom moguće procijeniti uspješnost validacije metode. S obzirom na to da postoji velik broj raznih instrumentalnih analitičkih metoda, priručnici za validacije ne daju konkretan kriterij prihvatljivosti za pojedinu vrstu analize, već je granice potrebno postaviti uzimajući u obzir metodu koju je potrebno analizirati (uz općenite upute priručnika). Postoje međutim općenite smjernice za validaciju koje definiraju pojedine zahtjeve pri validacijskom postupku. Ono što je tim pravilnikom određeno jest broj priprema uzoraka pojedinih koncentracija za provjeru konkretnih parametara validacije.^{64,89-91}

Postavljeni kriteriji prihvatljivosti za validaciju razvijene metode za analizu potencijalno genotoksičnih onečišćenja u certinibu prikazani su tablicom 16.

Tablica 16. Kriteriji prihvatljivosti validacije

Parametar	Kriterij prihvatljivosti
S/N (LOD)	3/1
S/N (LOQ)	10/1
koeficijent korelacije	> 0,9900
ponovljivost RSD/%	20
točnost (analitički povrat)/%	80-120

4.3.2. Linearnost, granice kvantifikacije i detekcije

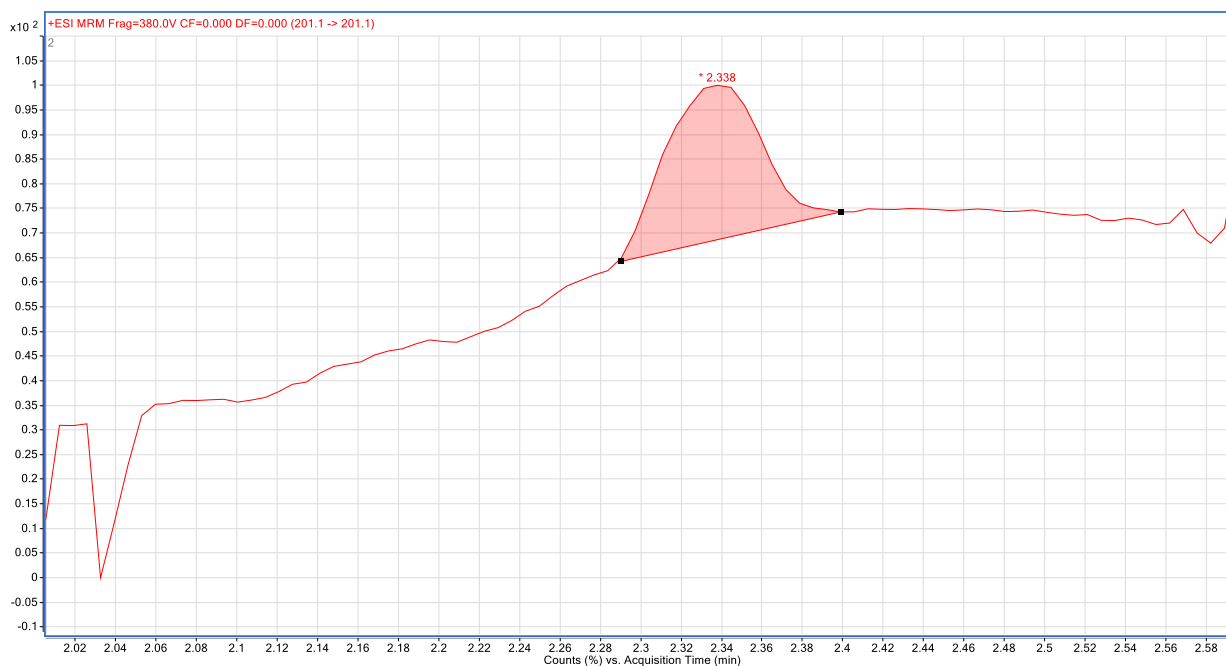
Ispitivanje linearnosti provedeno je za sva četiri onečišćenja pri istom rasponu koncentracija. Iako su pikovi pojedinih onečišćenja imali veći intenzitet (PGI 1 i PGI 3), zbog jednostavnosti, odnosno primjenjivosti metode pri rutinskim analizama, parametri metode su validirani za sva onečišćenja pri istim koncentracijama u odnosu na testnu koncentraciju djelatne tvari.

Granica specifikacije izračunata je prema formuli (1) u skladu s pravilnikom ICH za ograničenje genotoksičnih onečišćenja.⁶

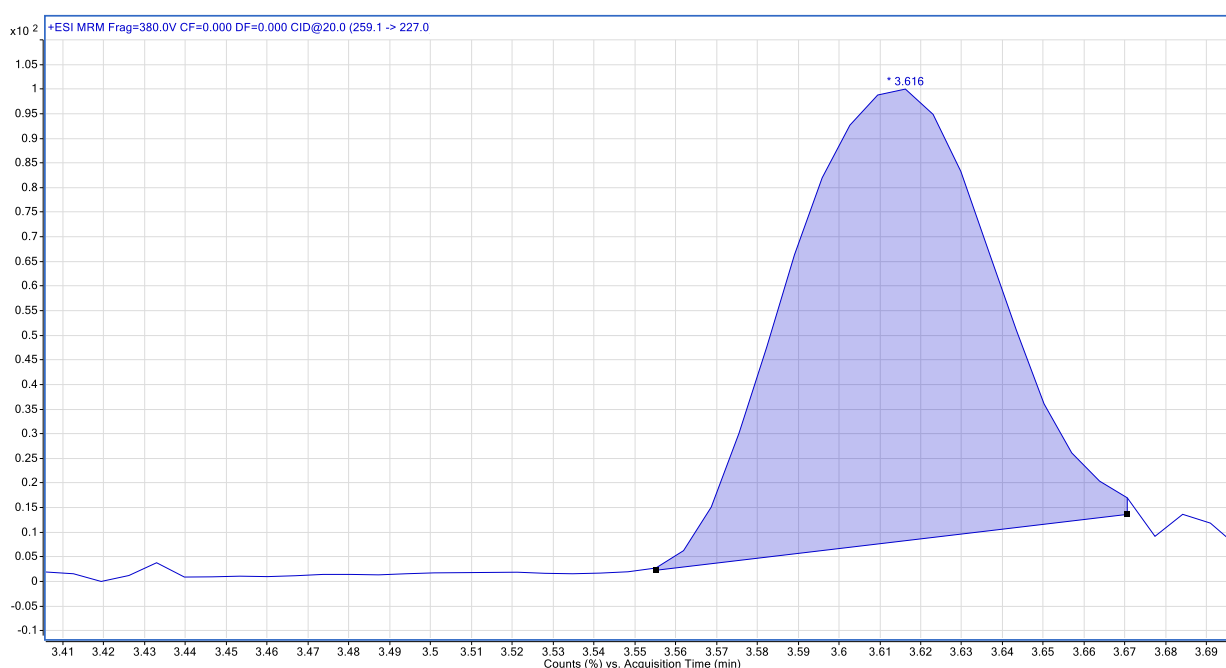
$$udio (ppm) = \frac{TTC (\mu\text{g/dan})}{doza (g/dan)} \quad (1)$$

Kako je predložena TTC vrijednost kojom se ograničava dnevni unos genotoksičnih onečišćenja $1,5 \mu\text{g dan}^{-1}$, a maksimalna dnevna doza uzimanja certiniba 750 mg, vrijednost

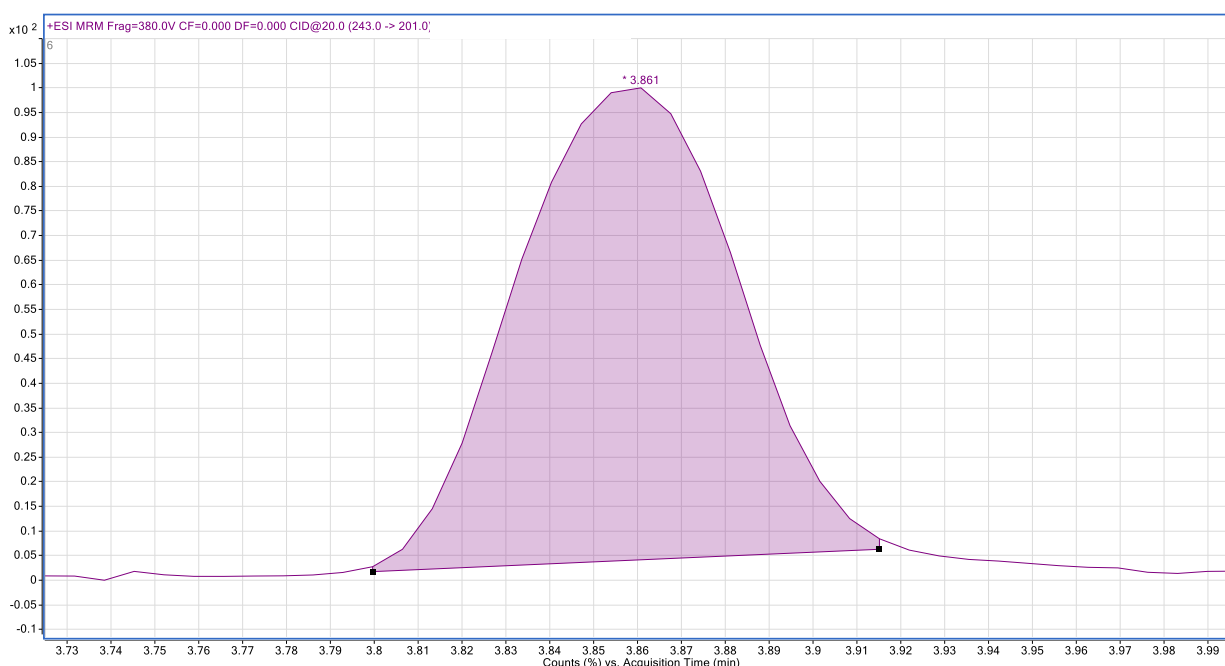
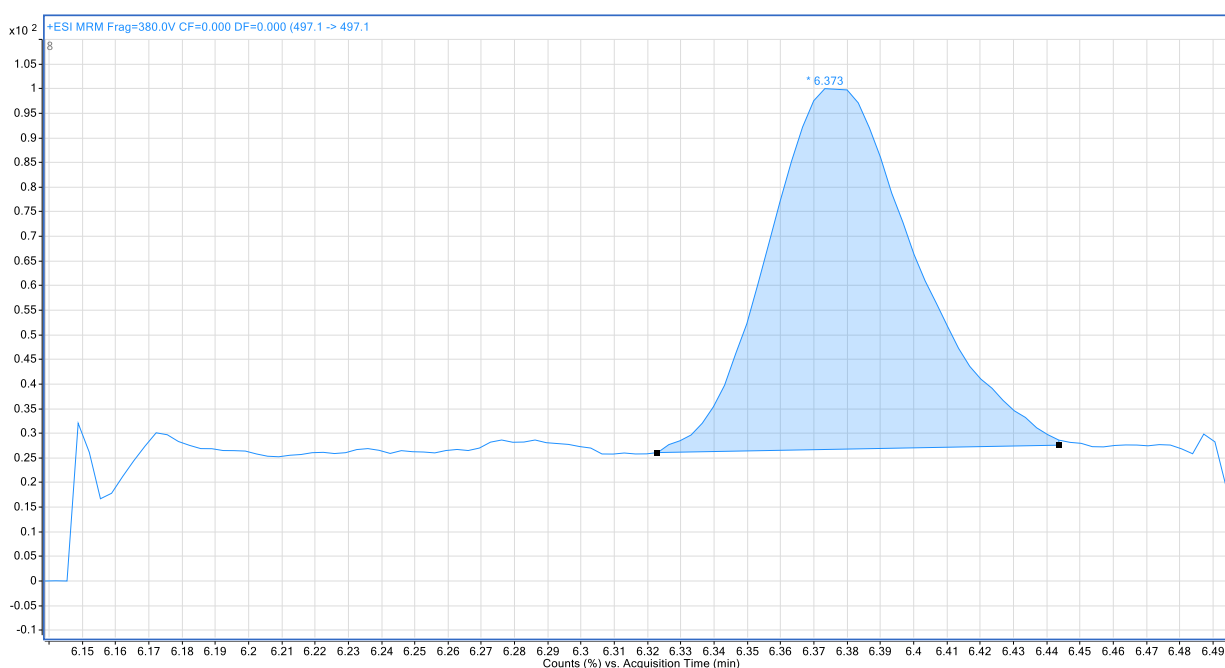
granice specifikacije iznosi 2 ppm, odnosno $4 \mu\text{g L}^{-1}$ s obzirom na testnu koncentraciju ceritiniba od $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Odabrana koncentracija granice kvantifikacije s obzirom na omjer signala kromatografskog pika i šuma bazne linije iznosi $1 \mu\text{g L}^{-1}$, dok je masena koncentracija granice detekcije duplo niža, $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Kromatogrami pikova onečišćenja pri koncentraciji $1 \mu\text{g L}^{-1}$ prikazani su slikama 14-17.



Slika 14. Kromatogram onečišćenja PGI 3 pri koncentraciji od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ)



Slika 15. Kromatogram onečišćenja PGI 2 pri koncentraciji od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ)

Slika 16. Kromatogram onečišćenja PGI 1 pri koncentraciji od 1 µg L⁻¹ (LOQ)Slika 17. Kromatogram onečišćenja PGI 4 pri koncentraciji od 1 µg L⁻¹ (LOQ)

Kromatogrami četiriju onečišćenja pri koncentraciji koja odgovara razini specifikacije (4 µg L⁻¹) prikazani su u Dodatku (slike D5-D8).

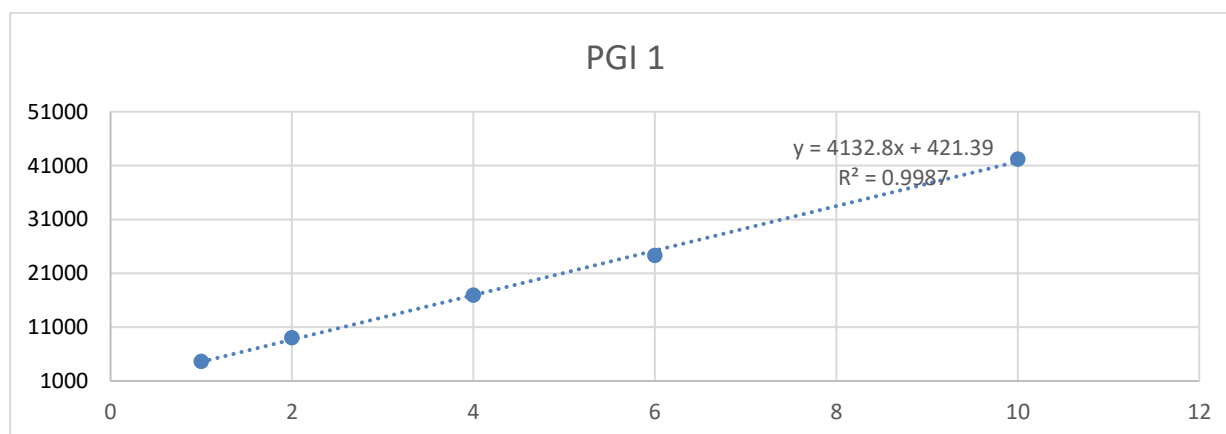
Kriterij prihvatljivosti za određivanje granice kvantifikacije je omjer signala i šuma S/N ≥ 10, dok za granicu detekcije iznosi S/N ≥ 3. Prosječna vrijednost omjera signala i šuma za 6 injektiranja pri koncentracijama 1 µg L⁻¹, odnosno 0,5 µg L⁻¹ prikazana je tablicom 17.

Tablica 17. Omjer S/N za onečišćenja PGI 1-4 pri koncentracijama $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ) i $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOD).

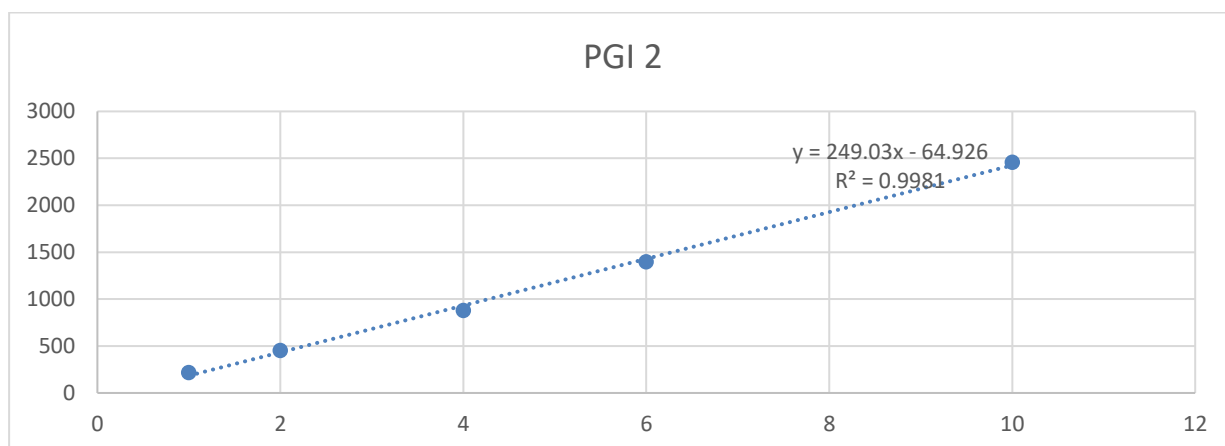
UZORAK	Prosjek S/N (6 injektiranja) $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOQ)	Prosjek S/N (6 injektiranja) $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOD)
PGI 1	229	102
PGI 2	11	9
PGI 3	25	11
PGI 4	12	9

Dobivene vrijednosti prikazane tablicom 17 u skladu su sa zadanim kriterijima prihvatljivosti validacije.

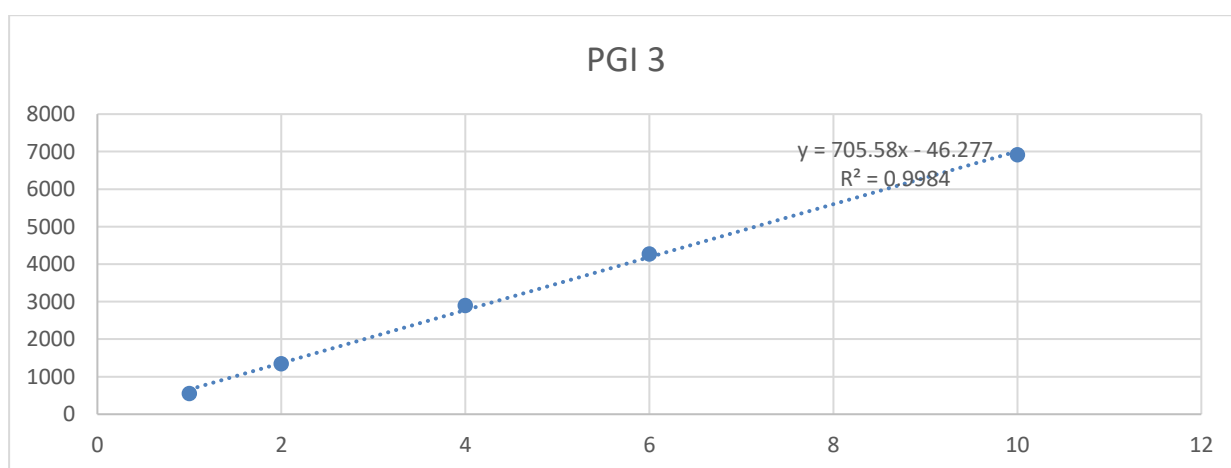
Za ispitivanje linearnosti korištene su otopine pet različitih koncentracija, od masene koncentracije na razini granice kvantifikacije ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) do $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Određene su površine pikova pojedinih onečišćenja te je grafički prikazana ovisnost površine kromatografskog pika o koncentraciji onečišćenja. Iz dobivenih pravaca određene su jednadžbe pravaca i koeficijenti regresije. Linearnost za svako onečišćenje u rasponu od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ do $10 \mu\text{g L}^{-1}$ prikazana je slikama 18-21.



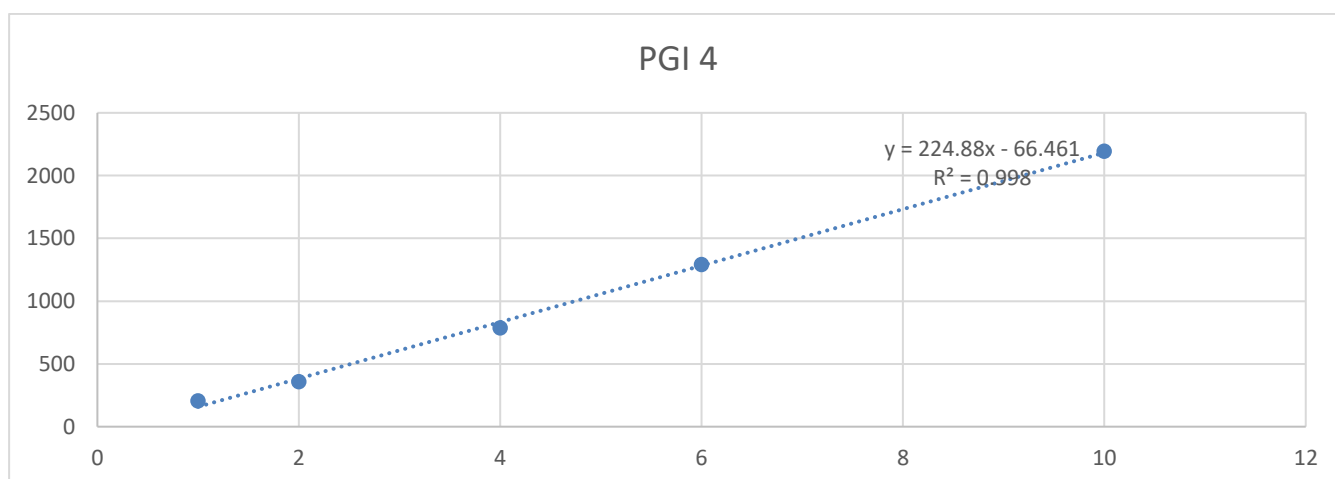
Slika 18. Određivanje linearnosti metode za onečišćenje PGI 1.



Slika 19. Određivanje linearnosti metode za onečišćenje PGI 2.



Slika 20. Određivanje linearnosti metode za onečišćenje PGI 3.



Slika 21. Određivanje linearnosti metode za onečišćenje PGI 4.

Tablicom 18 prikazane su jednadžbe dobivenih pravaca, te koeficijenti korelacije.

Tablica 18. Jednadžbe pravca za PGI 1-4 te pripadajući koeficijenti korelacije.

onečišćenje	jednadžba pravca	koeficijent korelacije (R^2)
PGI 1	$y = 4132,8x + 421,39$	0,9987
PGI 2	$y = 249,03x - 64,926$	0,9981
PGI 3	$y = 705,58x - 46,277$	0,9984
PGI 4	$y = 224,88x - 66,461$	0,9980

Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da je rezultat ispitivanja linearnosti u skladu s postavljenim kriterijem prihvatljivosti ($R^2 > 0,9900$).

4.3.3. Ispitivanje točnosti metode

Ispitivanje točnosti metode provedeno je dodatkom poznate koncentracije onečišćenja (engl. „spike“) uzorcima ceritiniba te uzorcima gotovog oblika (tablete Zykadia). U uzorcima ceritiniba i tableta bez dodanih onečišćenja, količina PGI 1-4 bila je ispod razine granice detekcije ($< 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Iz dobivenih kromatograma uzoraka kojima je dodana poznata količina onečišćenja na način da konačna masena koncentracija odgovara koncentracijama razine kvantifikacije, $1 \mu\text{g L}^{-1}$, razine specifikacije, $4 \mu\text{g L}^{-1}$ te najviše točke linearnog raspona metode, $10 \mu\text{g L}^{-1}$, izračunat je analitički povrat. Rezultati ispitivanja točnosti metode prikazani su tablicom 19.

Tablica 19. Ispitivanje točnosti metode - analitički povrat za PGI 1-4 pri koncentracijama od 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0,5 ppm), 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2 ppm), te 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5 ppm).

onečišćenje	koncentracija / $\mu\text{g L}^{-1}$	analitički povrat u čistom uzorku / % ^a	analitički povrat u tableti / % ^a
PGI 1	1	100,1 ± 1,1	107,3 ± 2,5
	4	107,2 ± 5,1	105,1 ± 0,5
	10	100,6 ± 0,3	98,5 ± 1,0
PGI 2	1	92,4 ± 5,1	94,9 ± 5,4
	4	97,0 ± 3,3	95,2 ± 2,7
	10	95,4 ± 0,9	97,7 ± 1,1
PGI 3	1	81,0 ± 0,9	83,7 ± 2,3
	4	91,9 ± 1,7	106,7 ± 1,6
	10	101,2 ± 0,5	102,5 ± 0,2
PGI 4	1	98,4 ± 4,3	96,1 ± 3,8
	4	103,4 ± 2,5	102,8 ± 0,7
	10	103,4 ± 1,1	99,3 ± 0,9

^aSrednja vrijednost ± RSD % za 3 dobivene vrijednosti

S obzirom na vrlo jak signal onečišćenja PGI 1 pri svim trima koncentracijama u odnosu na signale ostalih triju onečišćenja, analitički povrat u uzorku čiste djelatne tvari je očekivano najbliže vrijednosti od 100 %. Dobivene vrijednosti analitičkog povrata za sva četiri onečišćenja pri svim ispitivanim koncentracijama u skladu su s postavljenim kriterijima prihvatljivosti validacije, 80 % -120 %.

4.3.4. Ispitivanje ponovljivosti metode

Ponovljivost metode ispitana je provjerom višestruko pripremljenih otopina za ispitivanje granica kvantifikacije i detekcije, te za ispitivanje točnosti. Rezultati ispitivanja ponovljivosti metode prikazani su tablicom 20.

Tablica 20. Ponovljivost metode za PGI 1-4

Onečišćenje	koncentracija / $\mu\text{g L}^{-1}$	RSD / %
PGI 1	1	1,5
	4	6,5
	10	0,3
PGI 2	1	5,4
	4	6,3
	10	0,9
PGI 3	1	4,3
	4	1,7
	10	0,5
PGI 4	1	6,8
	4	2,5
	10	1,1

4.3.5. Robusnost metode

Robusnost metode ispitana je namjernom promjenom pojedinih parametara kako je prikazano tablicom 21.

Tablica 21. Vrijednosti pojedinih mijenjanih parametara metode u svrhu ispitivanja robusnosti.

Kromatografska kolona	Protok / mL min^{-1}	Temperatura kolone/ $^{\circ}\text{C}$
YMC Triart C18 100 · 2.0 mm, 1,9 μm	0,45	33
YMC Triart C18 100 · 2.0 mm, 1,9 μm	0,55	27

Promjenom jednog po jednog parametra nije primijećena razlika u dobivenim kromatogramima u odnosu na originalnu metodu. Korištene su dvije kromatografske kolone istog sastava i dimenzija, ali drugog serijskog broja. Također nije primijećena razlika u dobivenim rezultatima.

4.3.6. Stabilnost otopina

Stabilnost otopina ispitana je usporedbom dobivenih vrijednosti, odnosno kromatograma, za svježe pripremljene otopine za analizu analitičkog povrata četiriju onečišćenja (0,5 ppm u odnosu na testnu koncentraciju ceritiniba, $\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$ te 5 ppm u odnosu na testnu koncentraciju

ceritiniba, $\gamma = 2 \mu\text{g L}^{-1}$) i za ponovljenu analizu istih otopina nakon čuvanja u hladnjaku 48 sati. Nije primijećena značajna promjena u dobivenim vrijednostima te je moguće zaključiti da su otopine uzoraka stabilne u hladnjaku minimalno 48 sati.

4.4. Razvoj metode UHPLC za analizu onečišćenja ceritiniba

U svrhu odabira najpovoljnije valne duljine pri kojoj će se pratiti onečišćenja ceritiniba, najprije su snimljeni spektri UV/VIS ceritinib djelatne tvari te pet pripadajućih onečišćenja. Spektri UV/VIS prikazani su u Dodatku (slike D9-D14). Na temelju dobivenih spektara, tijekom početnog razvoja metode, kromatogrami su snimani pri tri različite valne duljine (210 nm, 240 nm, 270 nm). Prilikom razvoja metode, isprobane su razne kombinacije pokretnih faza na dvije kolone istih dimenzija, a različitog sastava punila. Tablicom 22. prikazane su sve kombinacije pokretnih faza i kolona isprobane u prvoj fazi razvoja metode.

Tablica 22. Kombinacije pokretnih faza i kolona isprobanih u prvoj fazi razvoja UHPLC metode:

eksperiment	Kromatografska kolona		Pokretna faza A		Pokretna faza B	
	WATERS Acquity BEH C18	WATERS Acquity BEH Phenyl	otopina HCOOH	Otopina NH ₃	Metanol	Acetonitril
1	X		X		X	
2	X			X	X	
3	X			X		X
4	X		X			X
5		X	X		X	
6		X	X			X

Isprobane su 4 kombinacije pokretnih faza s kolonom WATERS Acquity BEH C18. Na temelju dobivenih kromatograma prikazanih u Dodatku (slike D15-D20) odbačena je mogućnost korištenja otopine NH₃, odnosno visoke vrijednosti pH, za daljnji razvoj metode. Naime, pri visokom pH primijećena je znatno lošija elucija sastojaka smjese, osobito glavnog sastojka (ceritiniba).

Usporedbom kromatograma dobivenih dvjema kolonama u kiselom području (0,1 % HCOOH kao pokretna faza A), primijećeno je da kolona BEH Phenyl doprinosi boljem zadržavanju onečišćenja.

Upotrebom kolone BEH C18 onečišćenje CRT-1 izlazi gotovo u mrtvom volumenu uz acetonitril kao organsku pokretnu fazu, dok CRT imp 2 izlazi u završnoj fazi gradijenta. Upotrebom metonola kao organske pokretne faze prvi i zadnji pik su također jako međusobno udaljeni, dok pikovi onečišćenja CRT imp 2 i CRT-2 imaju jako bliska retencijska vremena.

Kolona BEH Phenyl ne djeluje kao najbolji izbor u eksperimentu gdje je korišten metanol kao organska pokretna faza, jer se pik jednog od onečišćenja (CRT imp 2) uopće ne vidi na kromatogramu zbog slabe elucijske snage metanola u odnosu na acetonitril.

Također, na prvi pogled kolona BEH Phenyl ne djeluje kao najbolji izbor u eksperimentu s acetonitriplom kao organskom pokretnom fazom, međutim jedini veći nedostatak vidljiv na kromatogramu je izgled pika ceritiniba, što se može regulirati ionskom jakošću, odnosno korištenjem pufera kao vodene pokretne faze.

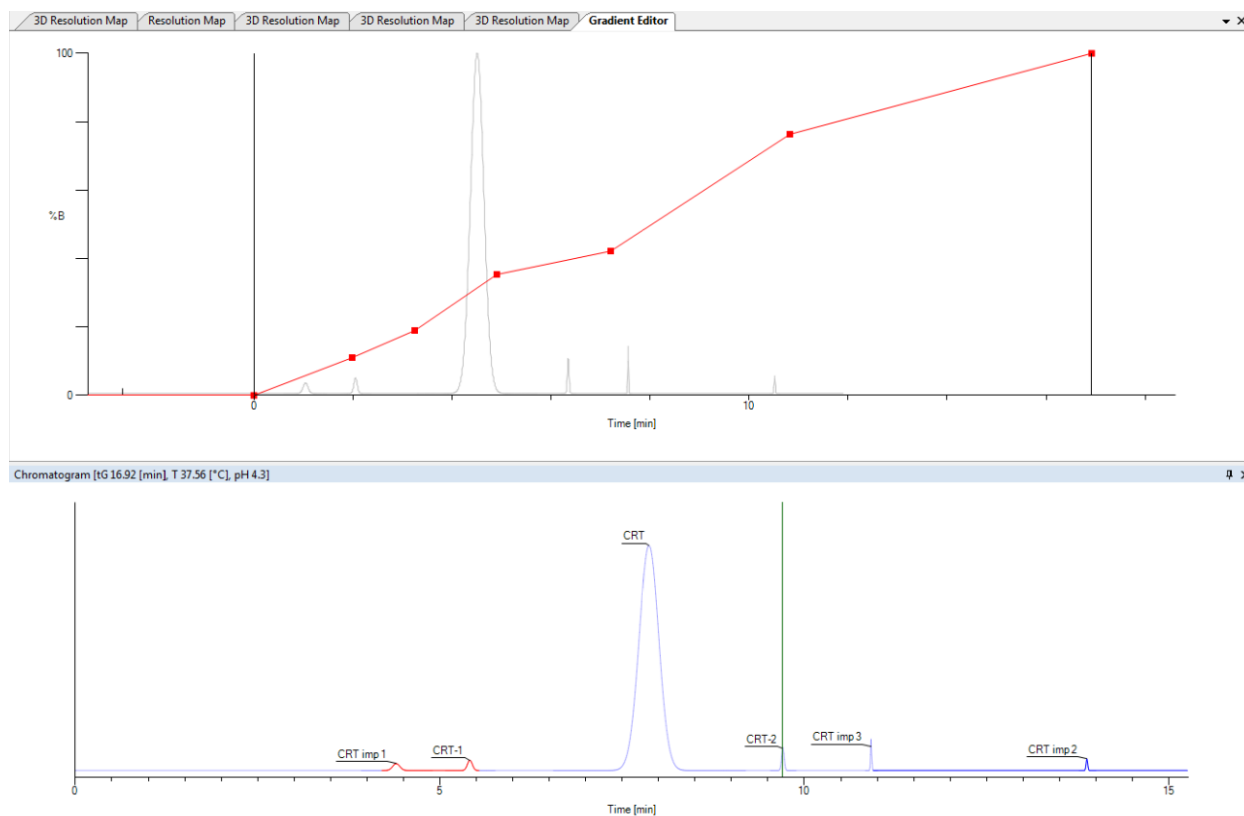
Za daljnje eksperimente koji su se koristili za optimizaciju metode pomoću softvera Drylab odabrana je kombinacija broj 6 (tablica 22).

S obzirom na željeno područje pH ($\text{pH} < 7$), priređen je pufer KH_2PO_4 kako je navedeno u poglavlju 3.4.

Softver Drylab omogućava odabiranje optimalnih parametara za konačnu metodu na temelju ubačenih podataka (kromatograma) dobivenih raznim kombinacijama parametara na istoj nepokretnoj fazi. Moguće je varirati jedan, dva ili tri parametra, a s obzirom na broj variranih parametara, program generira jedno-, dvo- ili trodimenzijski prikaz kritičnih rezolucija između pikova. Pri razvoju metode za određivanje onečišćenja ceritiniba varirane su vrijednosti temperature, pH, te trajanje gradijenta. Parametri po kojima su snimljeni kromatogrami pomoću kojih je softverom Drylab optimirana metoda prikazani su tablicom 10.

Snimanjem kombinacija navedenih parametara dobiveno je 12 kromatograma, koji su potom uneseni u program Drylab.

Slikom 22. prikazan je kromatogram dobiven optimizacijom pomoću softvera Drylab.



Slika 22. Prikaz kromatograma dobivenog pomoću softvera Drylab.

Konačni parametri metode prikazani su tablicom 23.

Tablica 23. Parametri metode za određivanje onečišćenja certiniba.

Kolona	BEH Phenyl, 2,1mm · 100 mm, 1,7 µm		
Pokretna faza A	Pufer (KH ₂ PO ₄) ; pH=4.3		
Pokretna faza B	Acetonitril		
Gradijent	Vrijeme / min	% A	% B
	0,00	90	10
	2,00	81	19
	3,50	65	35
	6,00	58	42
	9,00	40	60
	12,00	10	90
	14,00	10	90
	15,00	90	10
	17,00	90	10
Otapalo	MeOH : MiliQ voda (9:1)		
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Valna duljina	210 nm		
Temperatura kolone	55 °C		

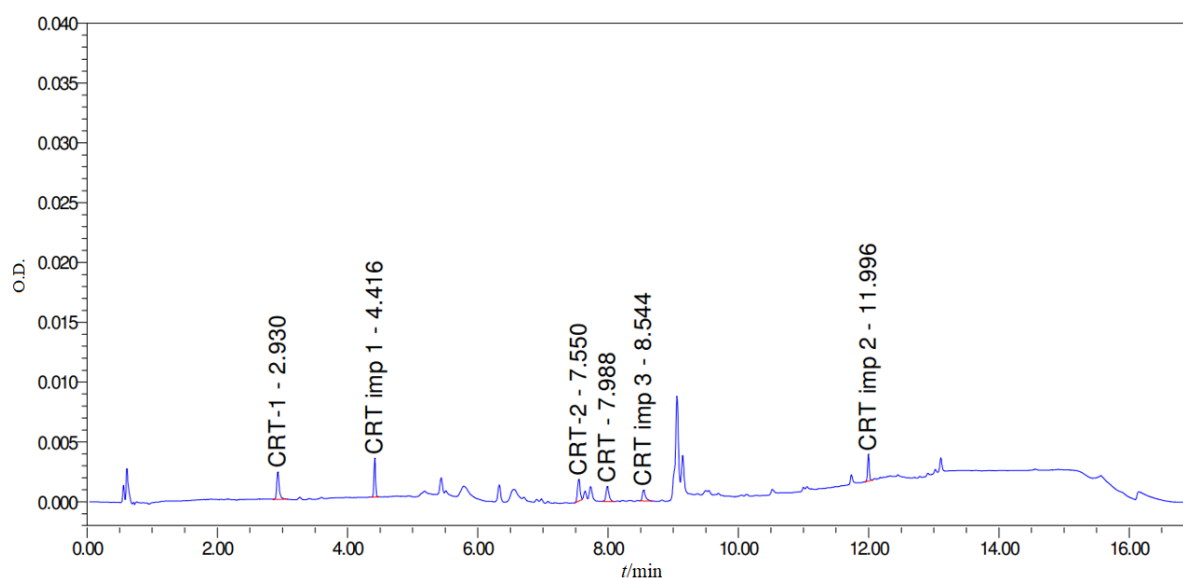
Otopinama pripremljenim kako je opisano u poglavlju 3.6., provjeren je omjer signala kromatografskog pika i šuma bazne linije pri koncentraciji 0,5 mg L⁻¹ za sva onečišćenja certiniba, linearnost metode u rasponu od 0,0005 do 0,025 g L⁻¹, te analitički povrat pri 0,01 g L⁻¹ i 0,5 mg L⁻¹.

U tablici 24 navedeni su omjeri signala i šuma za pik certiniba i pikove pet onečišćenja certiniba pri koncentraciji 0,5 mg L⁻¹ (LOQ). Slikom 23 prikazan je kromatogram certiniba i onečišćenja pri istoj koncentraciji.

Tablica 24. Omjeri signala i šuma za pikove ceritiniba i onečišćenja ceritiniba

Onečišćenje*	Prosjek S/N ($\gamma = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$)
CRT	21
CRT - 1	32
CRT - 2	26
CRT imp 1	48
CRT imp 2	36
CRT imp 3	14

*Prosječna vrijednost 3 injektiranja svakog onečišćenja i ceritinib aktivne tvari

Slika 23. Kromatogram otopine ceritiniba i onečišćenja koncentracije $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Vrijednost omjera S/N za sve analizirane pikove onečišćenja iznosi > 10 , što metodu čini zadovoljavajućom za praćenje onečišćenja ceritiniba od granice kvantifikacije koncentracije $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Studija linearnosti provedena je prvenstveno radi određivanja relativnog faktora odgovora (engl. *Relative Response factor - RRF*) za pikove onečišćenja ceritiniba, te za provjeru linearnosti metode rasponu praćenja onečišćenja ($0,05\text{-}2,5 \%$ s obzirom na masenu koncentraciju ceritiniba od 1 g L^{-1}). Tablicom 25 prikazani su rezultati ispitivanja linearnosti za ceritinib i pripadajuća onečišćenja.

Tablica 25. Koeficijenti korelacije pravca dobivenih ispitivanjem linearnosti, te vrijednosti RRF za svako onečišćenje u odnosu na RRF (CRT) = 1,0

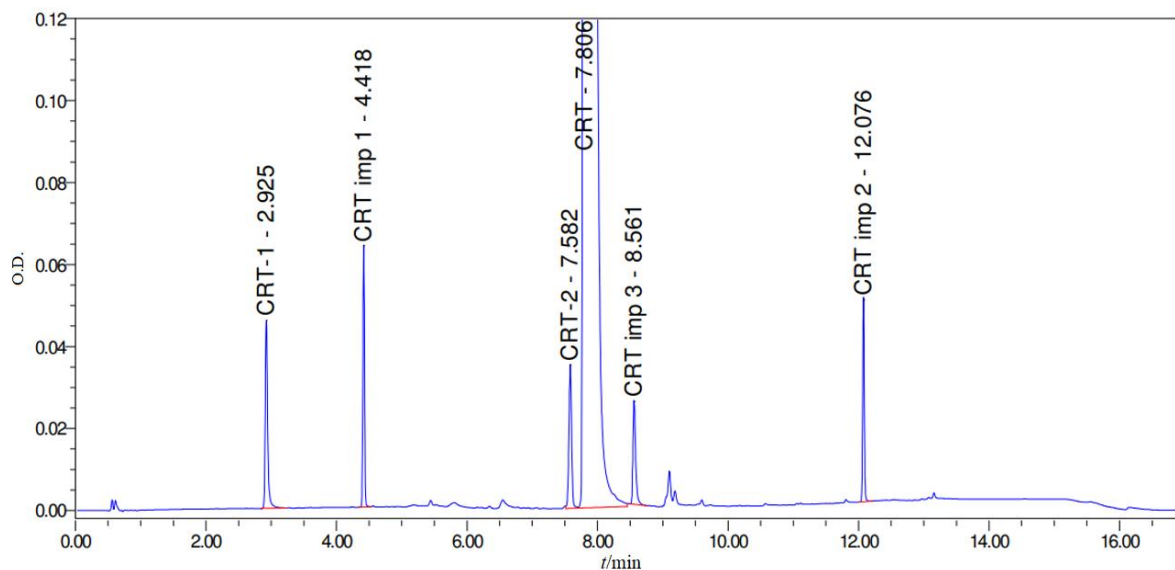
Uzorak	koeficijent korelacije (R^2)	nagib pravca	RRF
CRT	0,9999	7812576	1,0
CRT-1	0,9999	11584432	1,5
CRT-2	0,9997	9667841	1,2
CRT imp 1	0,9998	10540480	1,4
CRT imp 2	0,9969	6926561	0,9
CRT imp 3	0,9999	7214971	0,9

Provedeno je ispitivanje dodatkom otopina onečišćenja poznatih koncentracija otopini ceritiniba u svrhu provjere analitičkog povrata. Dodana su onečišćenja u koncentracijama od 0,01 g L⁻¹ te 0,5 mg L⁻¹. Rezultati su prikazani tablicom 26.

Tablica 26. Vrijednosti analitičkog povrata (%) za onečišćenja ceritiniba pri masenim koncentracijama 0,01 g L⁻¹ i 0,5 mg L⁻¹.

Uzorak	analitički povrat (%) $\gamma = 0,01 \text{ g L}^{-1}$	analitički povrat (%) $\gamma = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$
CRT-1	95,6	93,9
CRT-2	102,0	101,6
CRT imp 1	98,6	114,3
CRT imp 2	101,1	107,1
CRT imp 3	95,6	91,7

Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti da je metoda prikladna za određivanje onečišćenja ceritiniba u rasponu od 0,05% -2,5 % s obzirom na testnu koncentraciju uzoraka ceritiniba od 1 g L⁻¹. U zadanom rasponu metoda je točna i linearna. Slikom 24 prikazan je kromatogram ceritiniba ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$) i onečišćenja ($\gamma = 0,01 \text{ g L}^{-1}$).

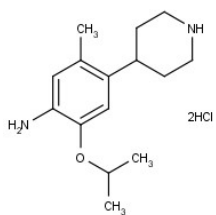
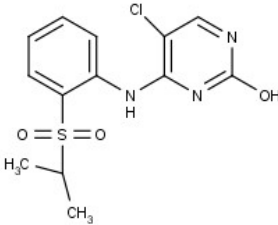
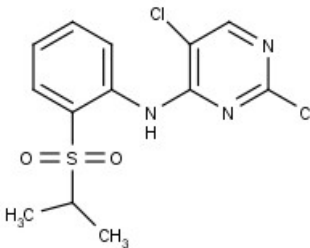
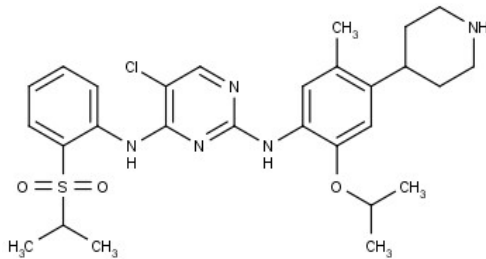
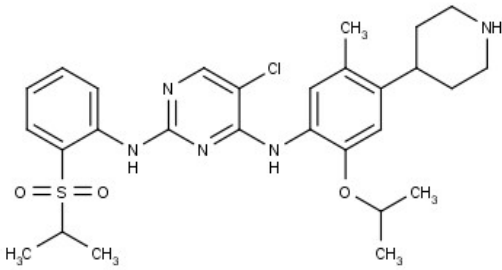


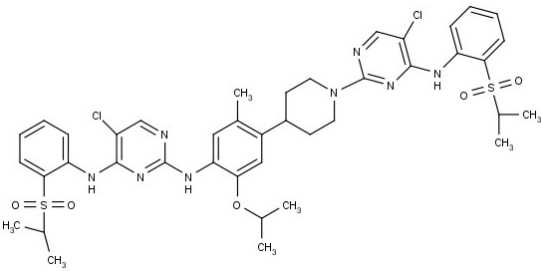
Slika 24. Kromatogram ceritiniba i pripadajućih onečišćenja (0,1 % s obzirom na γ (CRT) = 1 g L^{-1}).

4.4.1. Analiza LC-MS

Metoda UHPLC razvijena za analizu onečišćenja ceritiniba prilagođena je za analizu LC-MS kako bi se mogla analizirati onečišćenja nastala forsiranom razgradnjom. Za analizu LC-MS korišten je pufer HCOONH_4 ($c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$) vrijednosti pH 4,3 kao vodena pokretna faza, dok su parametri metode ostali nepromijenjeni. U Dodatku (slike D21-D26) su prikazani spektri dobiveni analizom LC-MS poznatih onečišćenja, a dobivene mase svakog onečišćenja i ceritinib djelatne tvari prikazane su tablicom 27.

Tablica 27. Rezultati analize LC-MS za ceritinib i poznata onečišćenja.

Uzorak	Struktura molekule	M + 1	Točna masa
CRT - 1		249,2	248,1889
CRT imp 1		328,1	327,0444
CRT - 2		346 348 (M+2)	345,0105
CRT		558,2	557,2227
CRT imp 3		558,2	557,2227

CRT imp 2		867,4 869,4 (M+2)	866,2566
------------------	---	----------------------	----------

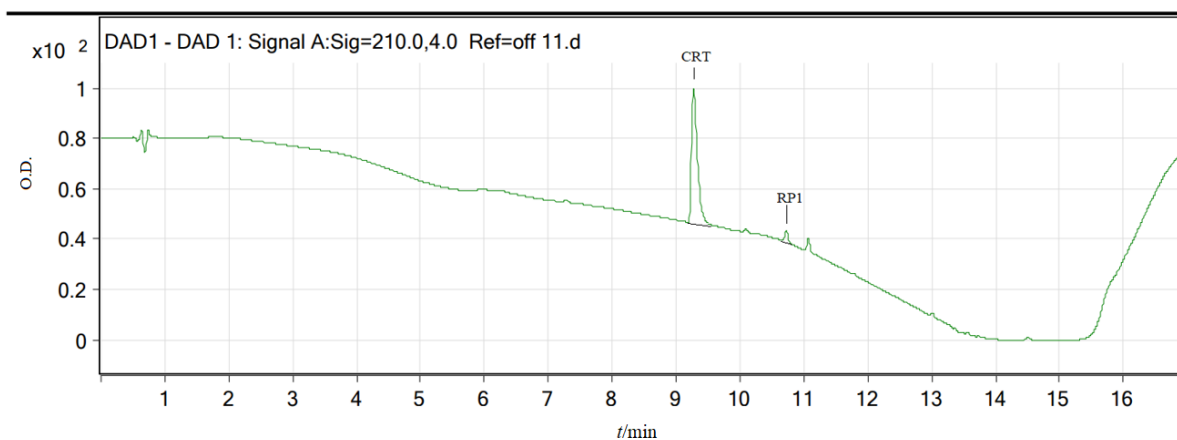
4.5. Rezultati forsirane razgradnje

Stabilnost aktivne farmaceutске tvari ili gotovog lijeka redovito se provjerava ispitivanjem forsirane razgradnje. Ovaj način ispitivanja daje informacije koje su ključne za određene korake u proizvodnom procesu te skladištenje i pakiranje lijeka ili aktivne tvari. Ispitivanjem forsirane razgradnje dobiva se uvid u razgradne puteve i potencijalne razgradne produkte koji nastaju pri određenim stresnim uvjetima. Identifikacija razgradnih produkata osobito je bitna za utvrđivanje sigurnosti lijeka. S. Kapavarapu i suradnici³³ razvili su metodu za određivanje razgradnih produkata ceritiniba gdje su utvrdili da do razgradnje dolazi uz prisutnost oksidansa, kiseline i lužine, međutim do razgradnje nije došlo pri uvjetima povišene temperature i fotostabilitetnim ispitivanjima. Također, u spomenutom radu razgradni produkti nisu identificirani, stoga je u ovom istraživanju naglasak bio na identifikaciji i predviđanju puteva razgradnje novonastalih razgradnih produkata u stresnim uvjetima. Provedena je forsirana razgradnja potpomognuta otopinama različite koncentracije oksidansa (H₂O₂), kiseline (HCl) i lužine (NaOH), te pri uvjetima povišene temperature za otopinu ceritiniba i sam prašak kako je navedeno u 3.6. Uzorci su najprije analizirani metodom UHPLC kako bi se provjerilo je li došlo do razgradnje, odnosno jesu li uočeni novi pikovi na kromatogramu. Ukoliko do razgradnje nije došlo, uzorci su podvrgnuti ekstremnijim uvjetima, a ukoliko je uočena razgradnja, daljnje analize rađene su metodom UHPLC-MS/MS u svrhu identifikacije, odnosno predlaganja mogućih struktura novonastalih molekula.

4.5.1. Rezultati forsirane razgradnje u uvjetima povišene temperature

Otopina ceritiniba ($\gamma = 2 \text{ g L}^{-1}$) te praškasti uzorak podvrgnuti su uvjetima povišene temperature (120 °C) u vremenskom periodu od 10 dana. Kromatogrami uzoraka snimljeni su metodom

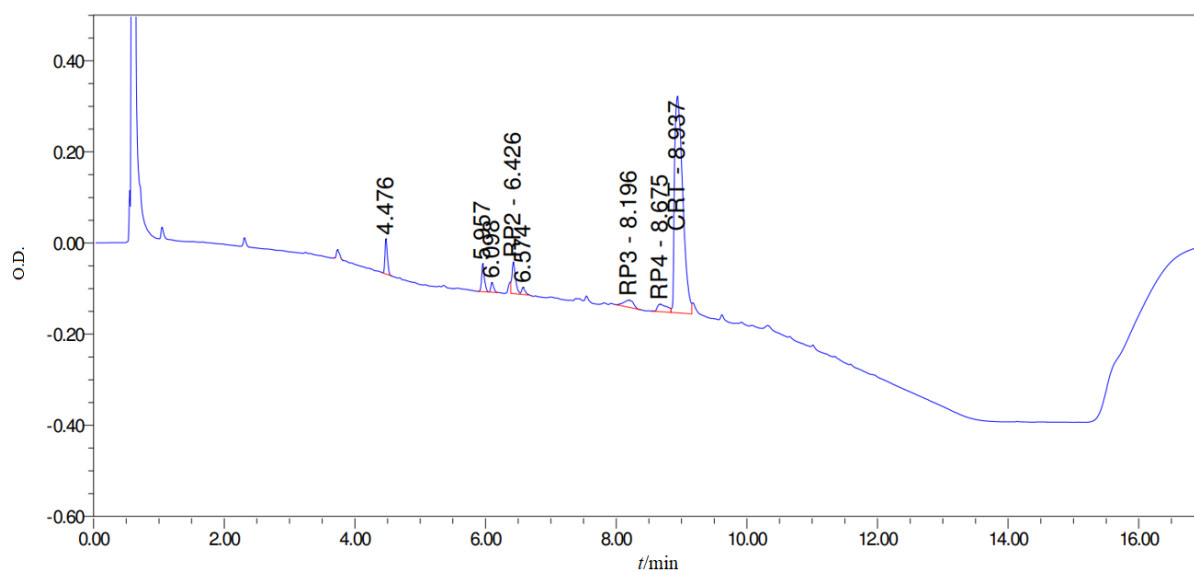
UHPLC kako bi se provjerilo je li došlo do razgradnje, te je uočeno nastajanje jednog razgradnog produkta u zagrijavanoj otopini ceritiniba, RP 1.



Slika 25. Kromatogram dobiven forsiranom razgradnjom otopine ceritiniba uz zagrijavanje 7 dana pri 120 °C.

4.5.2. Rezultati forsirane razgradnje u oksidacijskim uvjetima

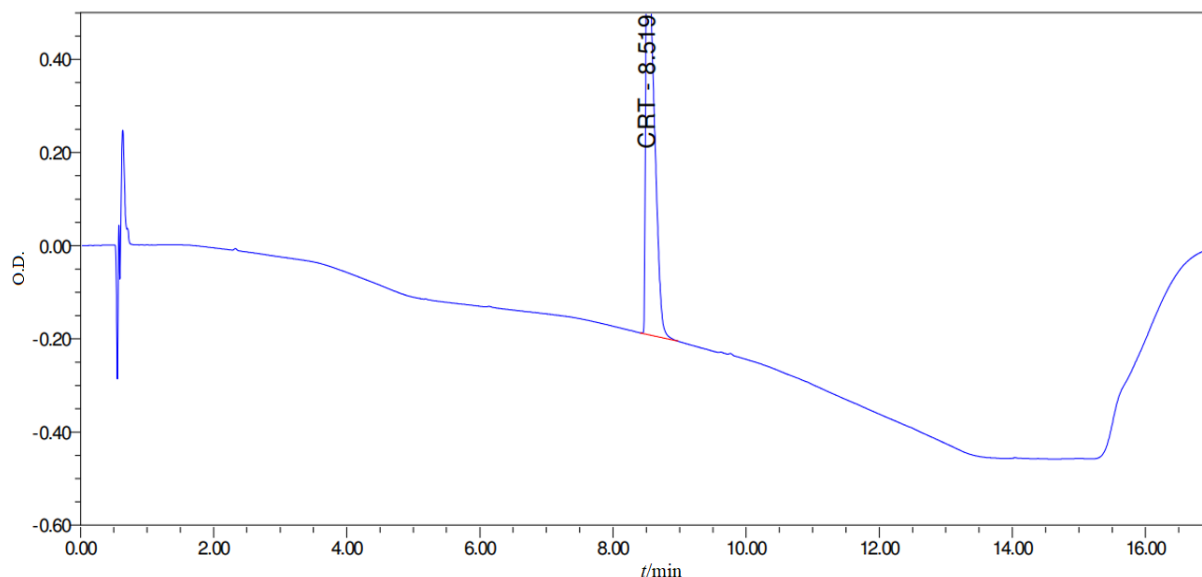
Prvotno su slijeđeni uvjeti opisani u radu³³ gdje su uzorci ceritiniba zagrijavani 30 minuta pri 60 °C uz korištenje 20 % i 30 % H₂O₂. Pri navedenim uvjetima uočena je pojava razgradnih produkata analizom metodom UHPLC. Razgradni produkti (RP) nastali u oksidacijskim uvjetima označeni su kao RP 2, RP 3 i RP 4. Pikovi koji su uočeni u slijepoj probi (otapalo s dodatkom 30 % H₂O₂) nisu uzimani u obzir za daljnju analizu, odnosno identifikaciju.



Slika 26. Kromatogram dobiven forsiranom razgradnjom ceritiniba u prisutnosti 20 % H₂O₂ uz zagrijavanje 30 minuta pri 60 °C.

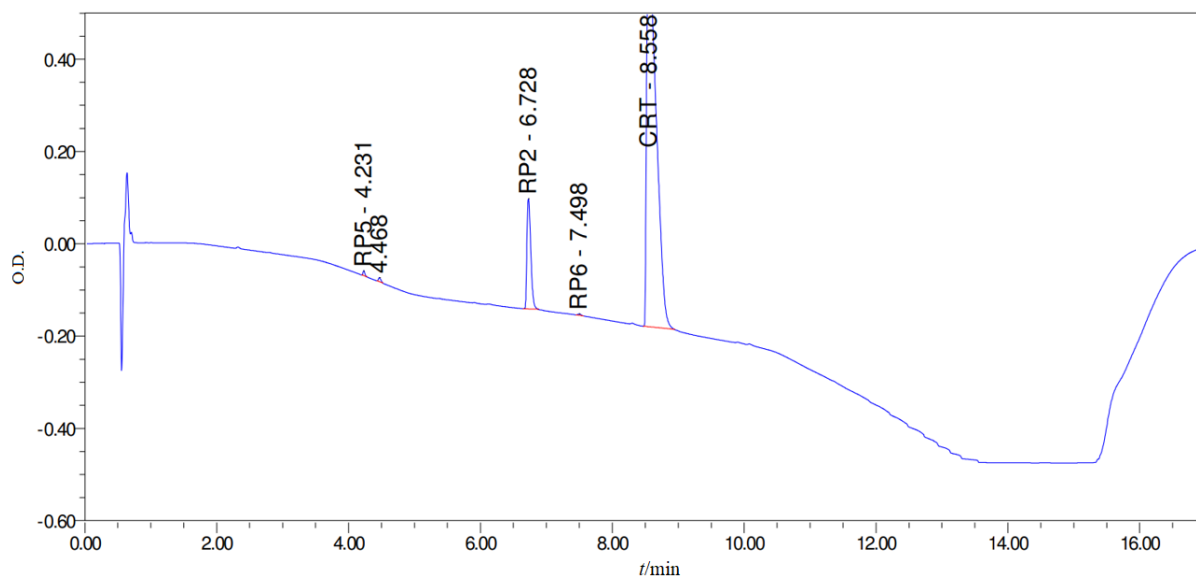
4.5.3. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti kiseline

Uzorci ceritiniba podvrgnuti su zagrijavanju u prisutnosti otopine HCl ($c=2 \text{ mol L}^{-1}$ i $c=5 \text{ mol L}^{-1}$) 30 minuta pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Rezultat analize UHPLC nije bio u skladu s rezultatima opisanima u radu S. Kapavarapu i suradnika³³.



Slika 27. Kromatogram dobiven analizom UHPLC nakon razgradnje ceritiniba u prisutnosti otopine 5 mol L^{-1} HCl uz zagrijavanje 30 minuta pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Moguće je da je razlika u rezultatima prouzrokovana neutralizacijom nakon zagrijavanja koju S. Kapavarapu i suradnici³³ nisu provodili. Uzorci su stoga podvrgnuti ekstremnijim uvjetima zagrijavanja. Do razgradnje nije došlo niti zagrijavanjem 60 minuta pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$, međutim zagrijavanjem uzoraka u trajanju od 2 dana pri $70 \text{ }^\circ\text{C}$ došlo je do generiranja razgradnih produkata RP 2, RP 5 i RP 6.

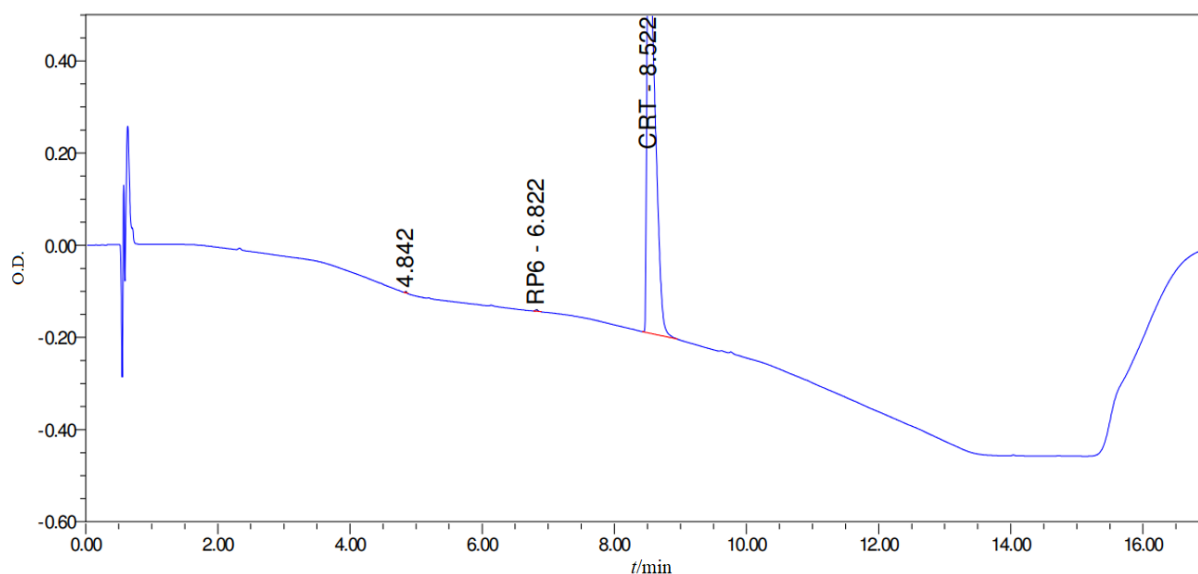


Slika 28. Kromatogram dobiven forsiranom razgradnjom ceritiniba u prisutnosti otopine 5 mol L⁻¹ HCl uz zagrijavanje 2 dana pri 70 °C

Dodatno je proveden eksperiment pri kojemu je uzorak ceritiniba zagrijavan 6 dana pri 70 °C pri čemu je gotovo sav ceritinib prešao u razgradni produkt RP 2. Za daljnju analizu LC-MS je stoga korištena razgradnja u prisutnosti otopine 5 mol L⁻¹ HCl uz zagrijavanje 2 dana pri 70 °C zbog jednostavnosti izvedbe, odnosno smanjenja mogućnosti zagušenja detektora povećanom koncentracijom produkta RP 2.

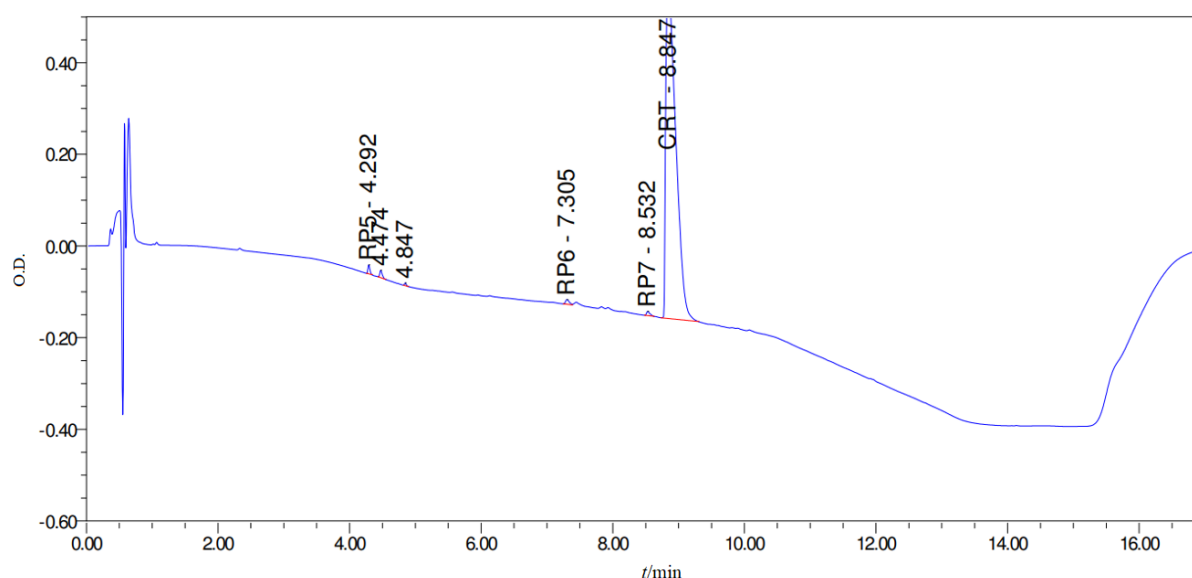
4.5.4. Rezultati forsirane razgradnje u prisutnosti lužine

Pod uvjetima razgradnje ceritiniba 30 minuta pri 60 °C u otopini NaOH ($c=2$ mol L⁻¹) nije došlo do očekivane razgradnje kakva je zabilježena u radu S. Kapavarapu i suradnika³³. Razlog tome bi mogla biti razlika prilikom provođenja eksperimenta bez neutralizacije nakon zagrijavanja³³ pri čemu nije navedeno kada su uzorci analizirani. U ovom radu razgradnja je prekinuta neutralizacijom dodatkom HCl iste koncentracije. Analizom UHPLC uočena je pojava male količine razgradnog produkta RP 6.



Slika 29. Kromatogram dobiven forsiranom razgradnjom ceritiniba u prisutnosti 5 mol L^{-1} NaOH uz zagrijavanje 30 minuta pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

U svrhu generiranja značajnije količine razgradnog produkta, uzorak ceritiniba podvrgnut je ekstremnijim uvjetima; zagrijavani su 60 minuta pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$ uz prisustvo NaOH ($c = 5 \text{ mol L}^{-1}$), te 2 dana pri $70 \text{ }^\circ\text{C}$ u otopinama 2 mol L^{-1} i 5 mol L^{-1} NaOH, nakon čega su neutralizirani kiselinom odgovarajuće koncentracije i snimani pomoću UHPLC. Zagrijavanjem uzorka ceritiniba 2 dana pri $70 \text{ }^\circ\text{C}$ u prisustvu NaOH došlo je do generiranja većeg broja razgradnih produkata, RP 5, RP 6 i RP 7.



Slika 30. Kromatogram dobiven forsiranom razgradnjom ceritiniba u prisutnosti otopine 5 mol L^{-1} NaOH uz zagrijavanje 2 dana pri $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dodatno, otopina ceritiniba podvrgnuta je razgradnji zagrijavanjem 6 dana pri 70 °C u otopini 2 mol L⁻¹ NaOH čime je došlo do precipitacije, stoga uzorak nije korišten za daljnju analizu.

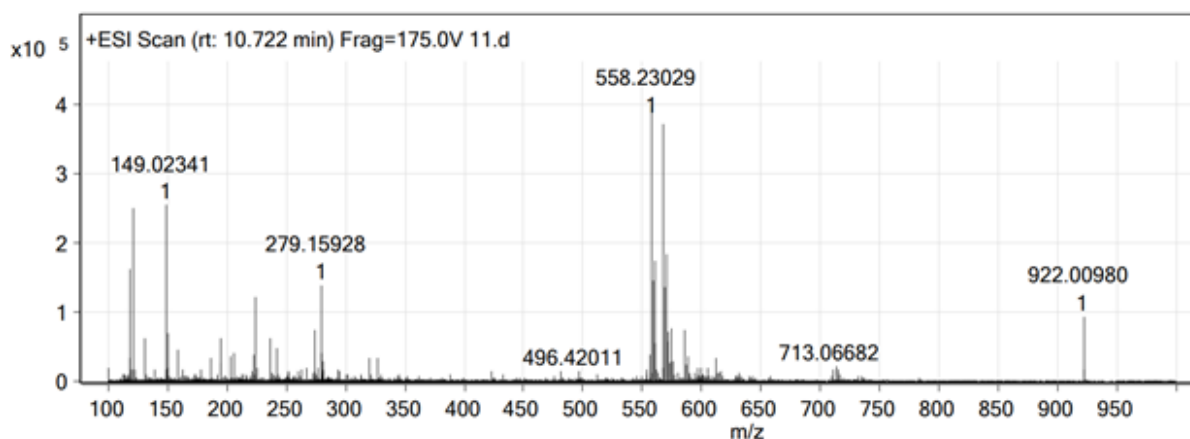
Iz navedenih eksperimenata osmišljenih u svrhu provjere stabilnosti otopine ceritiniba i praškastog uzorka ceritiniba vidljivo je da do nastajanja razgradnih produkata dolazi u izuzetno ekstremnim uvjetima te da je ceritinib stabilna molekula.

4.6. Rezultati analize LC-MS/MS i identifikacija razgradnih produkata ceritiniba

Uzorci kod kojih je uočen nastanak razgradnih produkata (RP 1 - RP 7) podvrgnuti su daljnjoj analizi pomoću UHPLC-MS te UHPLC-MS/MS uz detektor Q-TOF. Prvotno su snimljeni spektri u svrhu identifikacije novonastalih molekulskih iona, a potom i spektri MS/MS koji su omogućili fragmentaciju razgradnih produkata. Dodatne informacije omogućile su detaljniju strukturnu karakterizaciju generiranih iona. Spektri su snimljeni u pozitivnom načinu ionizacije.

4.6.1. Identifikacija razgradnog produkta nastalog u uvjetima povišene temperature

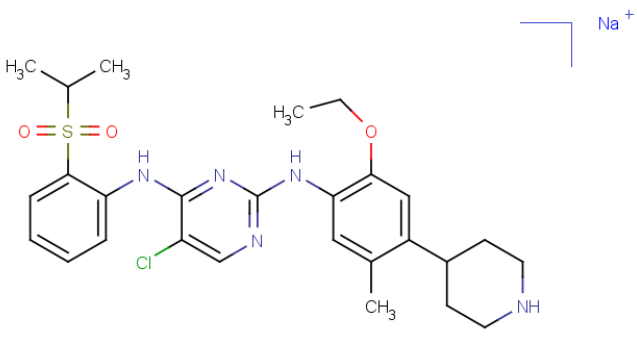
Spektar dobiven analizom UHPLC-MS otopine ceritiniba u uvjetima povišene temperature (120 °C) u vremenskom periodu od 10 dana prikazan je slikom 31.



Slika 31. Spektar MS razgradnog produkta RP 1.

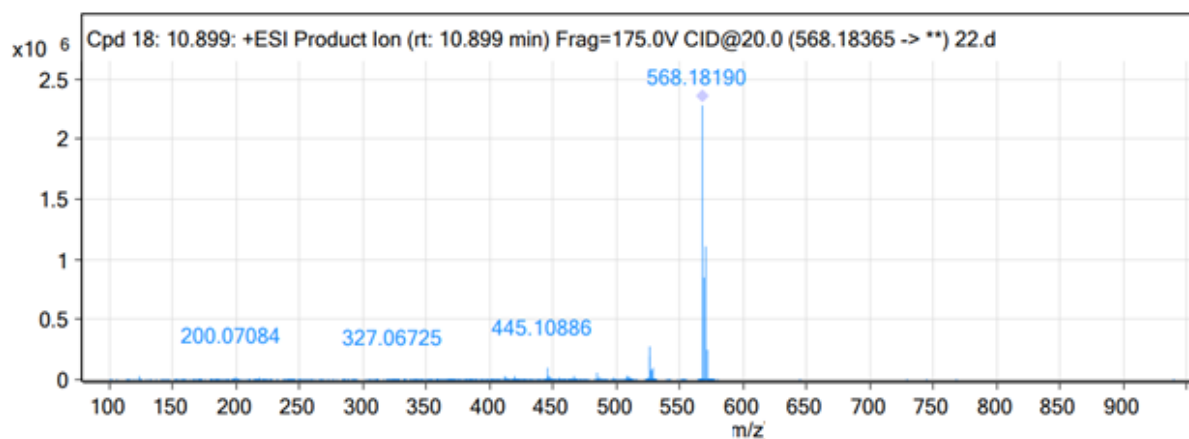
Na Slici 31 vidljivi su izotopni signali klora - intenzitet signala na $(M+2)^+$ iznosi otprilike trećinu odziva signala koji odgovara molekulskom ionu. Predložena struktura dobivenog razgradnog produkata uz mase očitane iz pripadajućih spektara prikazana je tablicom 28.

Tablica 28. Predložena struktura i dobivena vrijednost $M+1$ za razgradni produkt RP 1.

Razgradni produkt	Kemijska formula	M+1	Točna masa	Predložena struktura
RP 1	$C_{27}H_{34}ClN_5NaO_3S^+$	568,2	567,1	

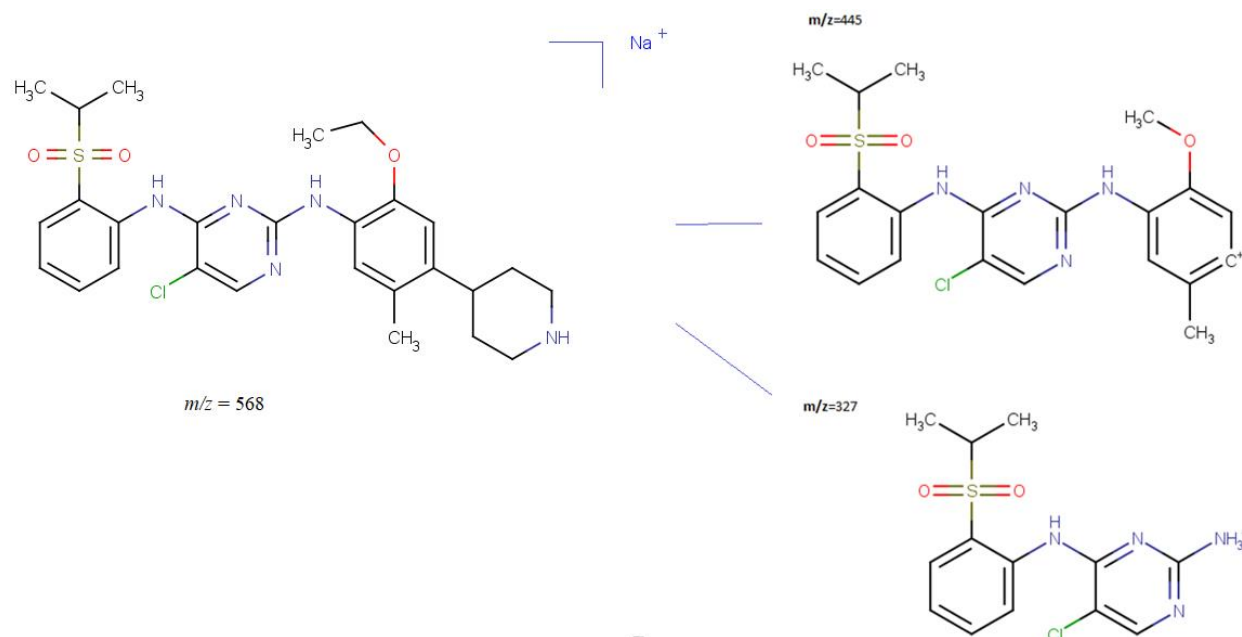
S obzirom na dobivenu vrijednost m/z izgledno je da se radi o aduktu s natrijem uz gubitak CH_3 , odnosno obliku $[M + Na]^+$, s predloženom molekulskom formulom $[C_{27}H_{34}ClN_5NaO_3S]^+$.

Dodatno su snimljeni spektri MS/MS pri različitim kolizijskim energijama kako bi se pomoću novonastalih fragmenata mogle potvrditi predložene strukture.



Slika 32. Spektar MS/MS produkta RP 1 pri kolizijskoj energiji jakosti 20 V

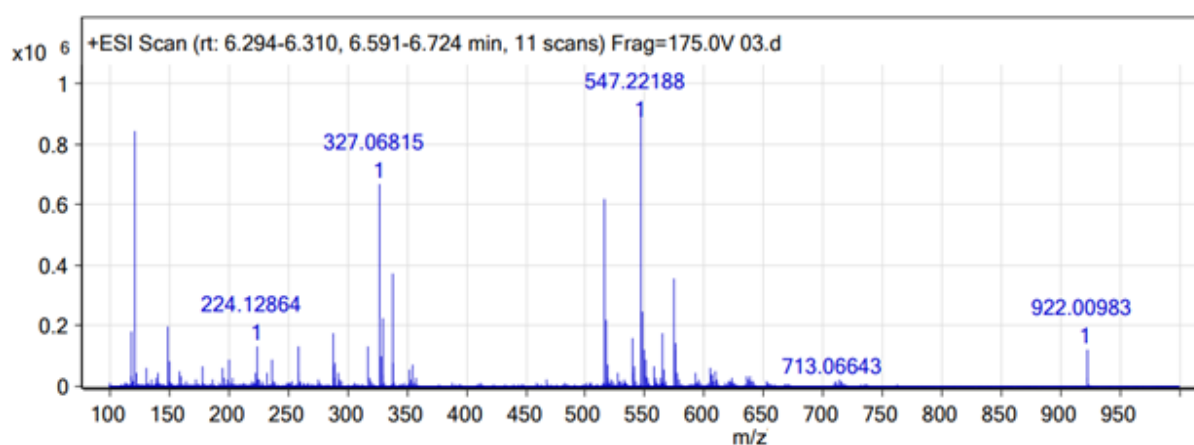
S obzirom na fragmentaciju, na slici 33 predložena je struktura dobivenih fragmenata.



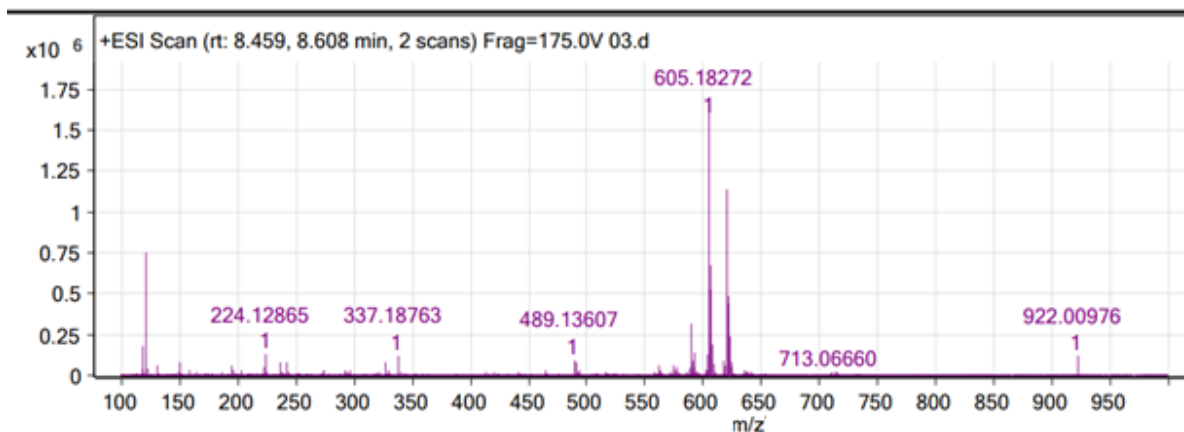
Slika 33. Predložena fragmentacija razgradnog produkta RP 1.

4.6.2. Identifikacija razgradnih produkata nastalih u oksidacijskim uvjetima

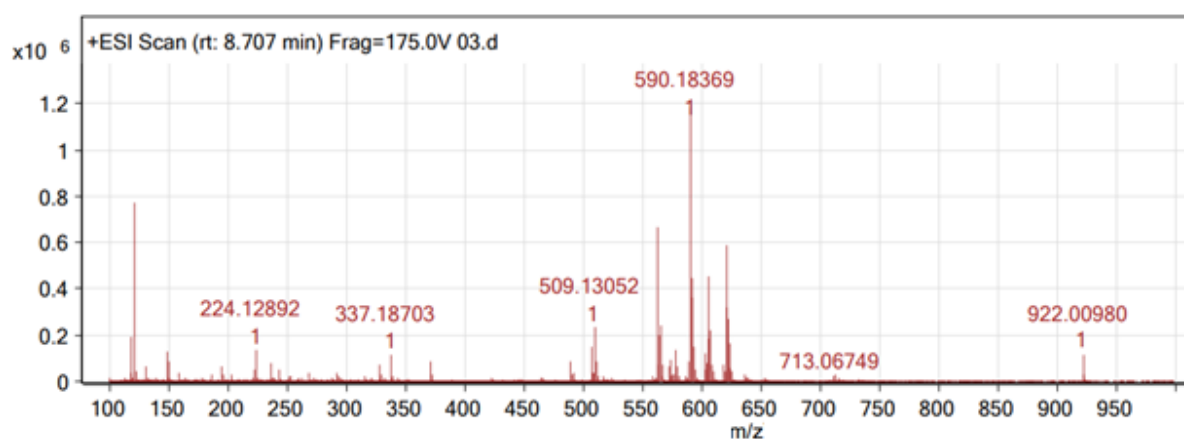
Spektri dobiveni analizom UHPLC-MS uzorka kod kojeg je došlo do razgradnje uz 20 % H_2O_2 prikazani su slikama 34-36. Iz omjera vrijednosti m/z dobivenih analizom predložene su strukture nastalih produkata.



Slika 34. Spektar MS razgradnog produkta RP 2.



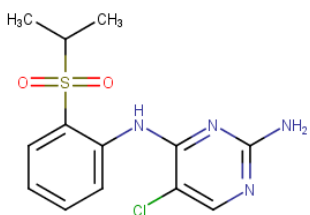
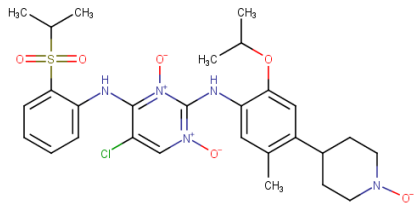
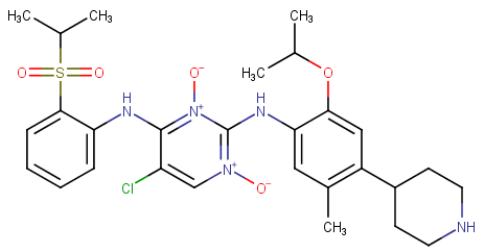
Slika 35. Spektar MS razgradnog produkta RP 3.



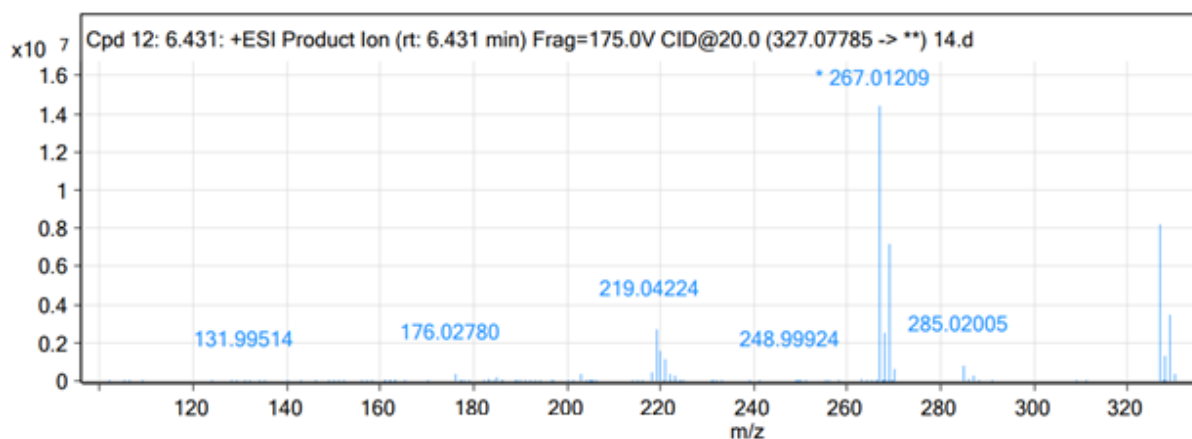
Slika 36. Spektar MS razgradnog produkta RP 4.

Na slikama 33-34 vidljivi su izotopni signali koji omogućavaju određivanje broja atoma klora u molekuli s doprinosom signalu $(M+2)^+$. Dodatnu potvrdu da se radi o atomu klora daje intenzitet signala na $(M+2)^+$ koji iznosi otprilike trećinu odziva signala koji odgovara molekulskom ionu. Predložene strukture dobivenih razgradnih produkata uz mase očitane iz pripadajućih spektara prikazane su tablicom 29.

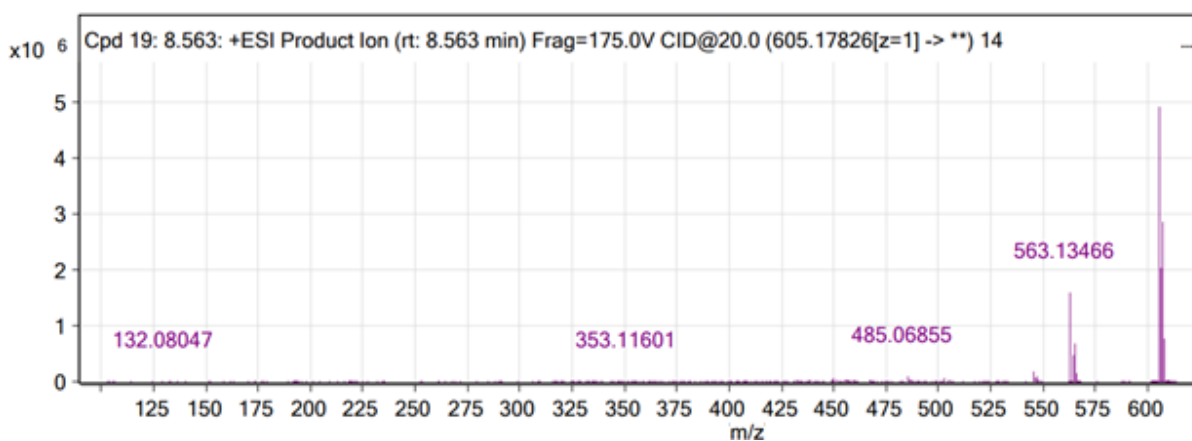
Tablica 29. Predložene strukture i dobivene vrijednosti M+1 za razgradne produkte RP 2 – RP4.

Razgradni produkt	Kemijska formula	M+ 1	Točna masa	Predložena struktura
RP 2	$C_{13}H_{15}ClN_4O_2S$	327,1	326,1	
RP 3	$C_{28}H_{36}ClN_5O_6S$	605,2	604,2	
RP 4	$C_{28}H_{36}ClN_5O_5S$	590,2	589,2	

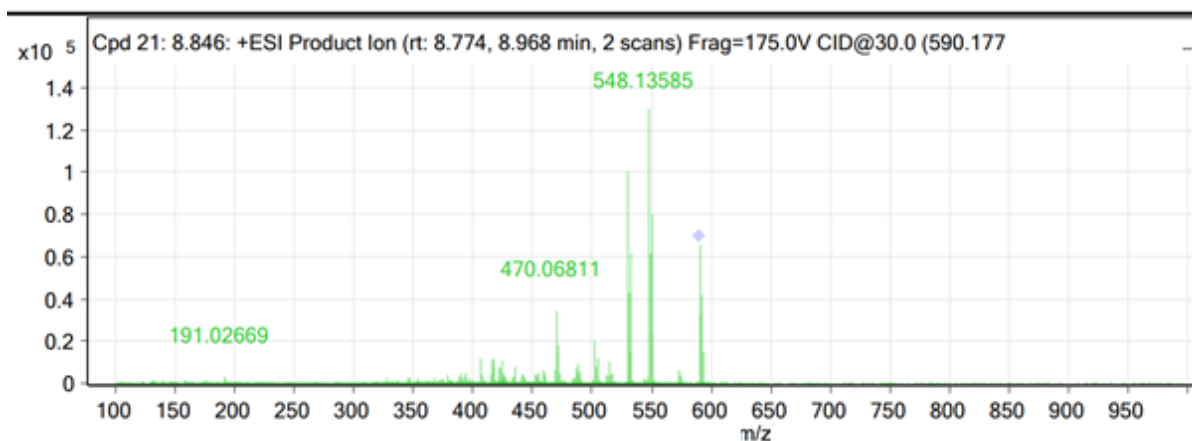
Nakon prvotne analize, snimljeni su spektri MS/MS uz kolizijsku energiju od 20-30 V, kako bi se pomoću fragmenata potvrdila struktura dobivena analizom LC-MS. Dobiveni spektri prikazani su slikama 37.-39.



Slika 37. Spektar MS/MS produkta RP 2 pri kolizijskoj energiji jakosti 20 V

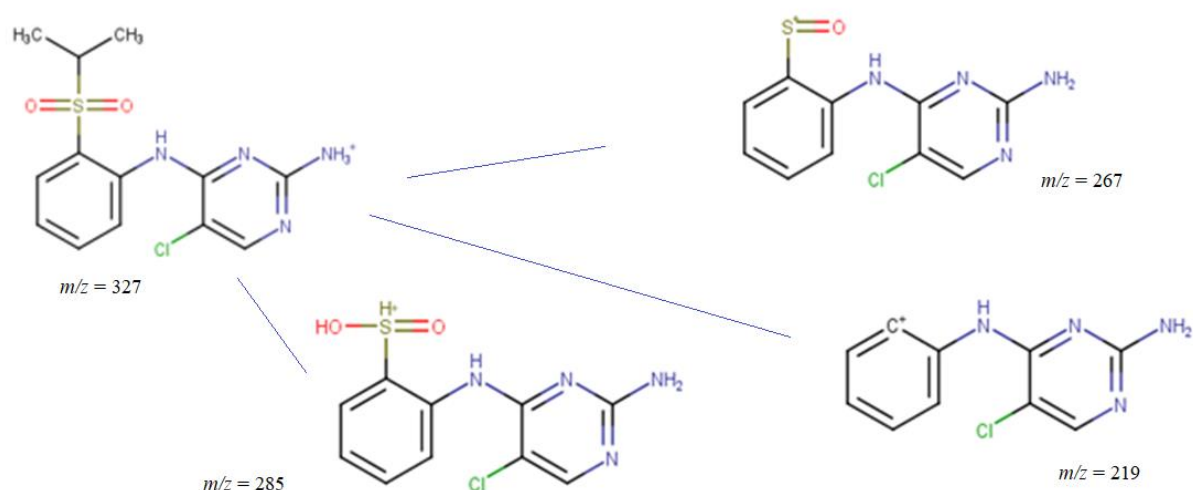


Slika 38. Spektar MS/MS produkta RP 3 pri kolizijskoj energiji jakosti 20 V



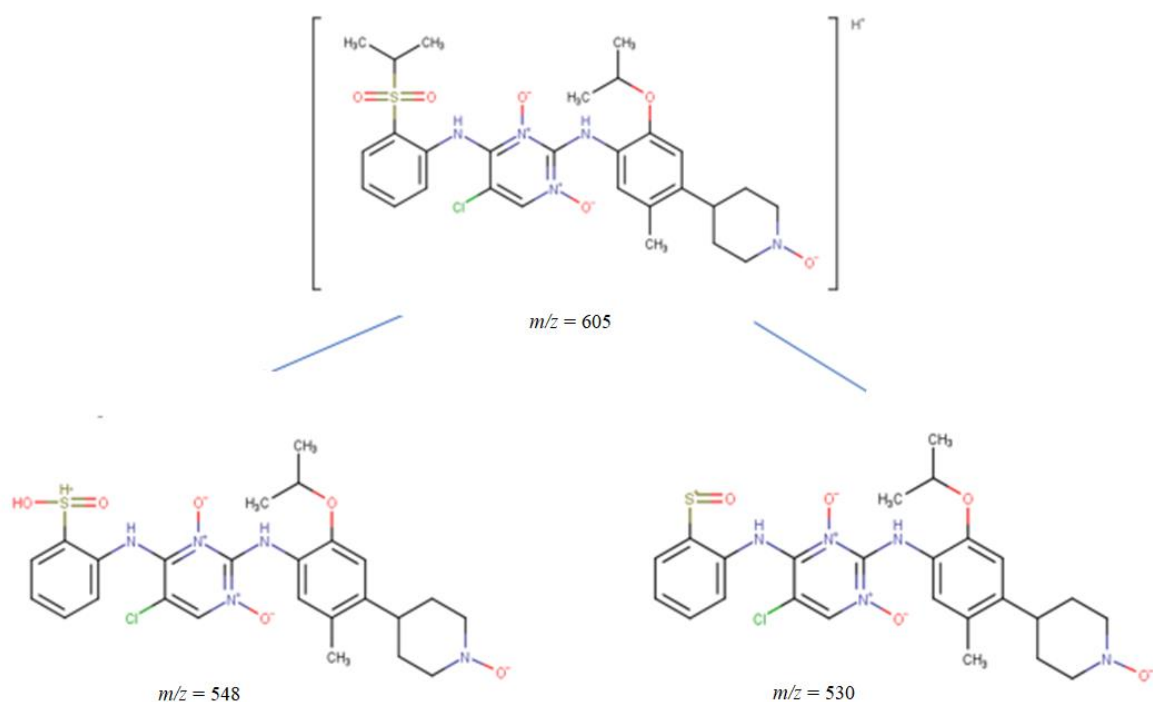
Slika 39. Spektar MS/MS produkta RP 4 pri kolizijskoj energiji jakosti 30 V

Pomoću masa dobivenih iz spektara MS/MS razgradnih produkata, predložene su strukture fragmenata.



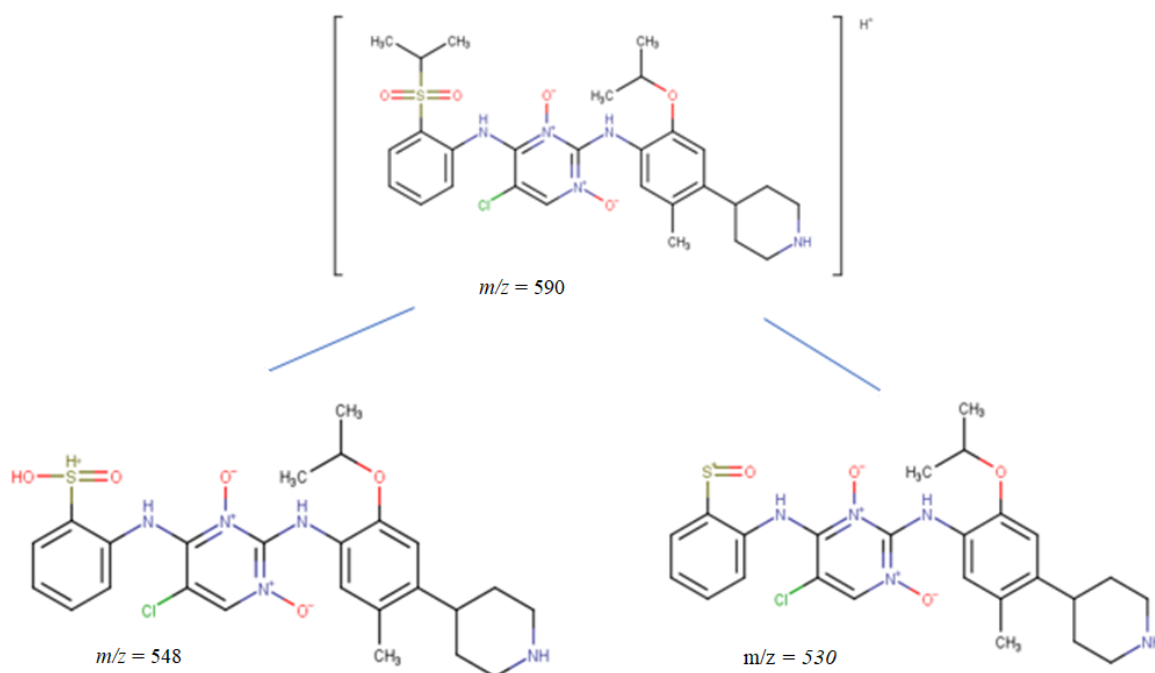
Slika 40. Predložena fragmentacija razgradnog produkta RP 2.

Protonirana molekula RP 2, s vrijednosti m/z 327, odgovara molekularnoj formuli $[C_{13}H_{16}ClN_4O_2S]^+$. Pripadajući spektar dobiven MS/MS analizom prikazuje fragmente s omjerima m/z 285 (gubitak C_3H_6), 267 (gubitak $C_3H_6-H_2O$), 219 (gubitak $C_3H_6-H_2O-SO$) kako je prikazano slikom 40.



Slika 41. Predložena fragmentacija razgradnog produkta RP 3.

Molekulskom ionu RP 3 pripisana je vrijednost m/z 605, stoga je predložena molekulska formula $[C_{28}H_{37}ClN_5O_6S]^+$. Spektar dobiven MS/MS analizom (slika 38) upućuje na fragmente nastale gubitkom C_3H_6 ($m/z = 563$), te gubitkom $C_3H_6-H_2O$ ($m/z = 545$). Slikom 41 predložene su strukture fragmenata.

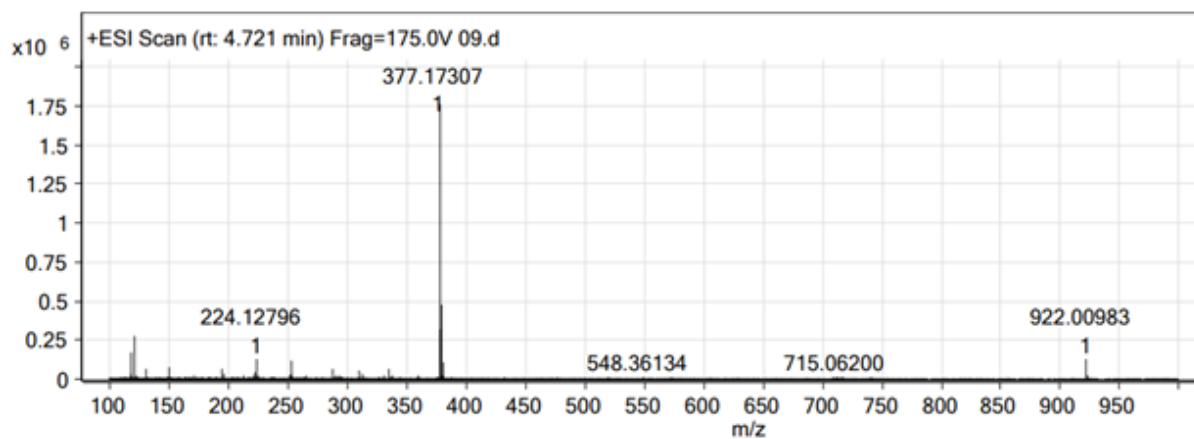


Slika 42. Predložena fragmentacija razgradnog produkta RP 4.

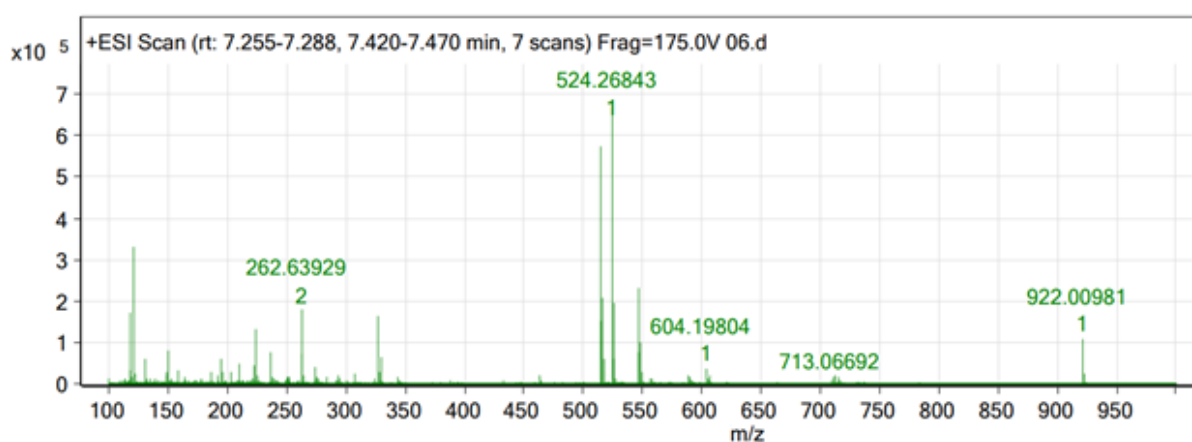
Molekulski ion fragmenta RP 4 opažen je pri vrijednosti m/z 590, stoga je predložena molekulska formula $[C_{28}H_{37}ClN_5O_5S]^+$. Spektar MS/MS (slika 39) prikazuje fragmente pri vrijednostima m/z :548 (gubitak C_3H_6) i 530 (gubitak $C_3H_6-H_2O$).

4.6.3. Identifikacija razgradnih produkata nastalih u kiselim uvjetima

Spektri dobiveni analizom UHPLC-MS uzorka kod kojeg je došlo do razgradnje uz 5 mol L^{-1} HCl 2 dana pri 70°C prikazani su slikama 43 i 44. Iz omjera m/z dobivenih analizom predložene su strukture nastalih produkata. Uz novonastale razgradne produkte RP 5 i RP 6, došlo je do generiranja razgradnog produkta RP 2 u velikoj količini. Fragmentacija produkta RP 2 predložena je u sklopu razgradnje u prisustvu H_2O_2 .



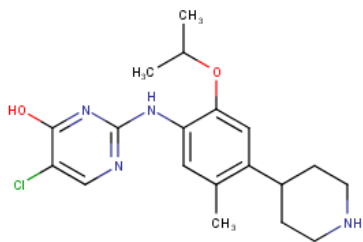
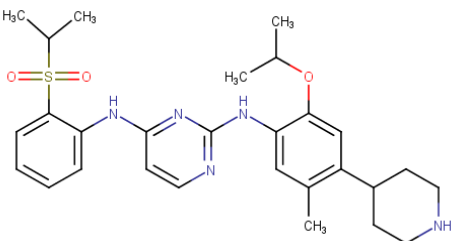
Slika 43. Spektar MS razgradnog produkta RP 5.



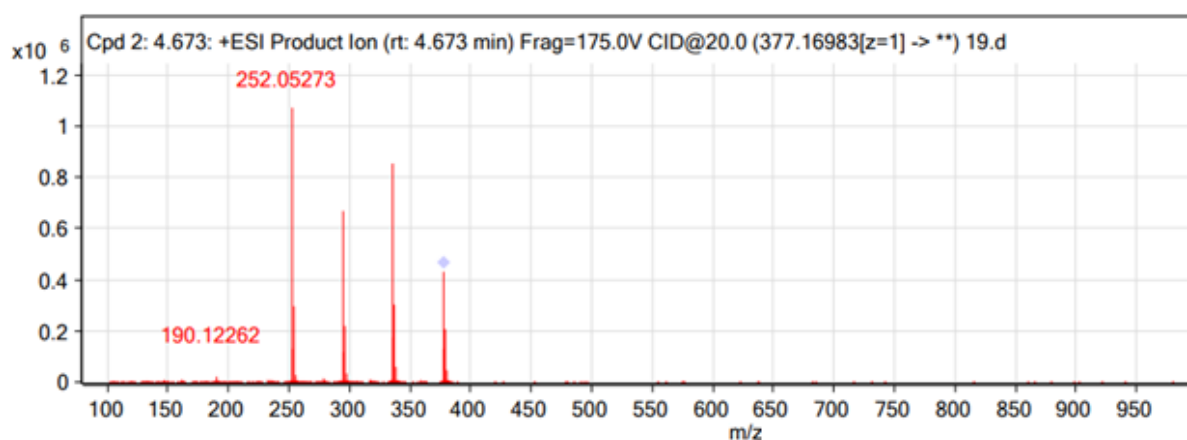
Slika 44. Spektar MS razgradnog produkta RP 6.

Na Slici 44, kao i na spektrima RP 1 – RP 4, vidljiv je izotopni signal $(M+2)^+$ karakterističan za molekule koje imaju prisutan atom klora. Tablicom 30 prikazane su predložene strukture za produkte RP 5 i RP 6.

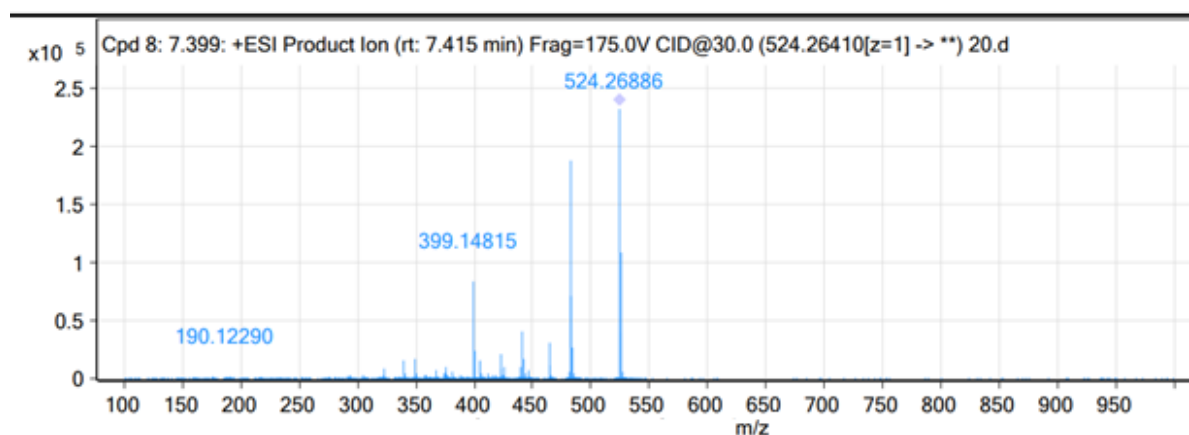
Tablica 30. Predložene strukture i dobivene vrijednosti M+1 za razgradne produkte RP 5 i RP6.

Razgradni produkt	Kemijska Formula	M + 1	Točna masa	Predložena struktura
RP 5	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₄ O ₂	377,2	376,2	
RP 6	C ₂₈ H ₃₇ N ₅ O ₃ S	524,3	523,3	

Iz spektara dobivenih analizom LC-MS/MS dodatno su analizirani fragmenti nastali uz kolizijsku energiju od 20, odnosno 30 V.

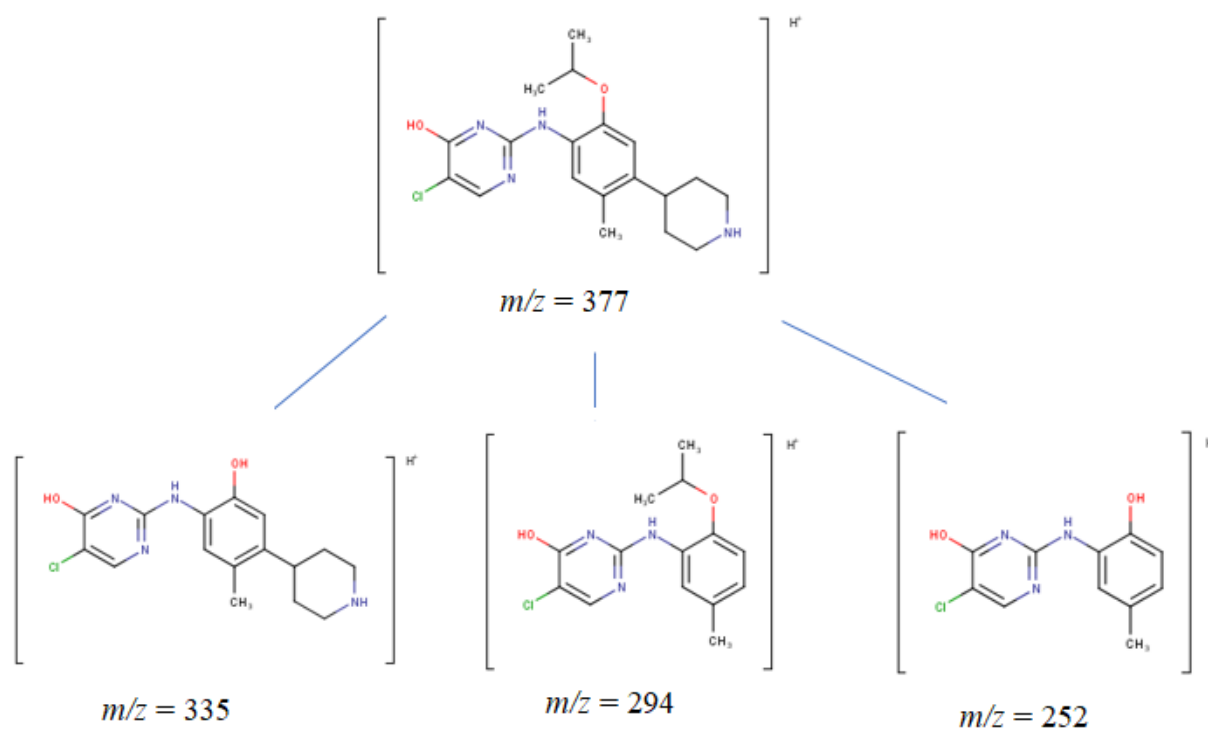


Slika 45. Spektar MS/MS produkta RP 5 pri kolizijskoj energiji jakosti 20 V



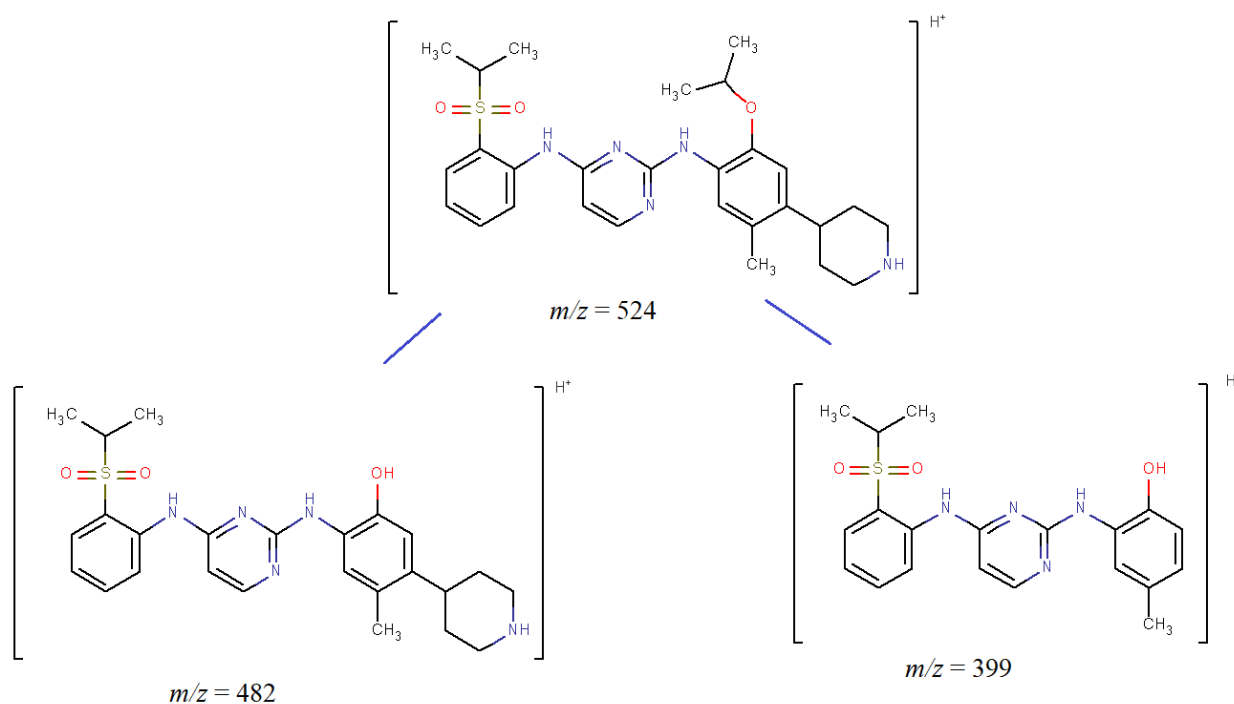
Slika 46. Spektar MS/MS produkta RP 6 pri kolizijskoj energiji jakosti 30 V

Pomoću vrijednosti m/z dobivenih iz spektara MS/MS razgradnih produkata RP 5 i RP 6, predložene su strukture fragmenata.



Slika 47. Predložena fragmentacija razgradnog produkta RP 5.

Protonirana molekula RP 5 opažena je pri vrijednosti m/z 377, što odgovara molekularnoj formuli $[C_{19}H_{26}ClN_4O_2]^+$. Pripadajući spektar MS/MS razgradnog produkta RP 5 (slika 45) pokazuje ione produkte pri vrijednostima m/z : 335 (gubitak C_3H_6), 294 (gubitak $C_5H_{10}N$), te 252 (gubitak C_3H_6 - $C_5H_{10}N$).

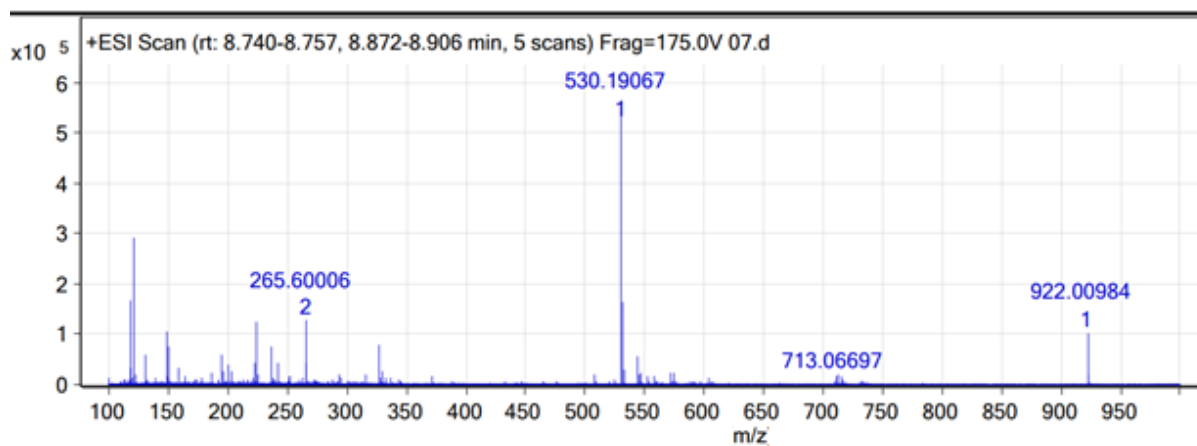


Slika 48. Predložena fragmentacija razgradnog produkta RP 6.

Protonirana molekula RP 6 opažena je pri vrijednosti m/z 524, što odgovara molekularnoj formuli $[C_{28}H_{38}N_5O_3S]^+$. Iz samog spektra MS (slika 44) vidljivo je da nema signala koji bi odgovarao molekuli klora. Spektar MS/MS razgradnog produkta RP 6 (slika 46) pokazuje ione produkte pri vrijednostima m/z : 482 (gubitak C_3H_6) te 399 (gubitak $C_3H_6-C_5H_{10}N$).

4.6.4. Identifikacija razgradnih produkata nastalih u bazičnim uvjetima

Spektar dobiven analizom UHPLC-MS uzorka kod kojeg je došlo do razgradnje u prisutnosti NaOH prikazan je slikom 49. Iz omjera m/z dobivenih analizom predložene su strukture nastalih produkata. Uz produkt RP 7, došlo je do generiranja razgradnih produkata RP 5 i RP 6, čije su strukture predložene u sklopu analize razgradnje u kiselim uvjetima.



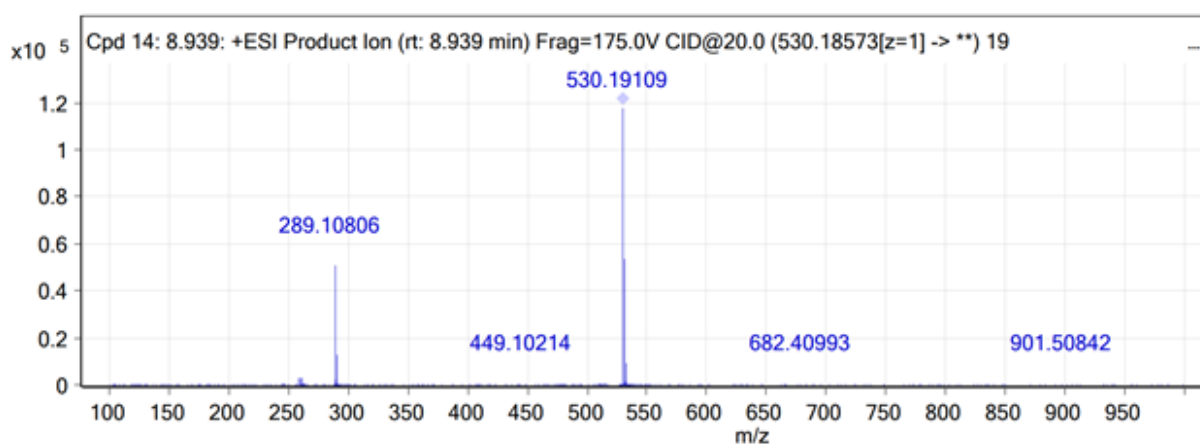
Slika 49. Spektar MS razgradnog produkta RP 6.

Tablicom 31 prikazana je predložena struktura za produkt RP 7

Tablica 31. Predložena struktura i dobivena vrijednost M+1 za razgradni produkt RP 7.

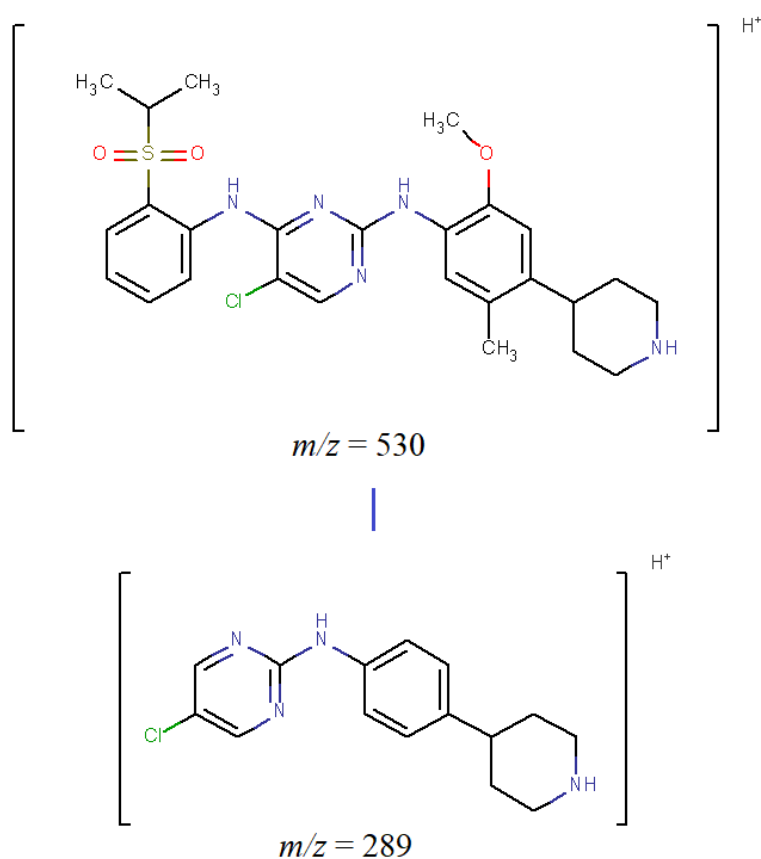
Razgradni produkt	Kemijska Formula	M + 1	Točna masa	Predložena struktura
RP 7	$C_{26}H_{32}ClN_5O_3S$	530,2	529,2	

Iz spektra dobivenog analizom LC-MS/MS dodatno je analiziran fragment nastao uz kolizijsku energiju od 20 V.



Slika 50. Spektar MS/MS produkta RP 7 pri kolizijskoj energiji jakosti 20 V.

Pomoću vrijednosti m/z dobivenih iz spektara MS/MS razgradnog produkta RP 7, predložena je strukture fragmenta.



Slika 51. Predložena fragmentacija razgradnog produkta RP 7.

Protonirana molekula RP 7 opažena je pri vrijednosti m/z 530, što odgovara molekularnoj formuli $[C_{26}H_{33}ClN_5O_3S]^+$. Spektar MS/MS razgradnog produkta RP 7 (slika 51) pokazuje ion produkt pri vrijednosti m/z : 289 (gubitak $C_{11}H_{20}NO_3S$).

Razgradnja ceritiniba prvotno je isprobana prema uvjetima iz rada S. Kapavarapu i suradnika³³, međutim za generiranje razgradnih produkata ceritiniba, otopina uzorka morala se podvrci ekstremnijim uvjetima pod utjecajem kiseline, lužine i oksidansa, uz različita vremena i temperature zagrijavanja. Pri tome su korištene vodene otopine 20 % i 30 % H_2O_2 , 2 mol L^{-1} i 5 mol L^{-1} HCl i NaOH.

Do najizraženije razgradnje ceritiniba došlo je u oksidirajućim uvjetima, dodatkom 20% i 30% H_2O_2 , gdje je postignut raspad uz najblaže zagrijavanje (zagrijavanje pri 60 °C u trajanju 30 minuta), dok je za nastajanje razgradnih produkata ceritiniba u prisutnosti kiseline i lužine bilo potrebno znatno dulje zagrijavanje (2 dana) pri temperaturi od 70 °C. Ovi rezultati ukazuju na nestabilnost ceritiniba u oksidativnim uvjetima, gdje je došlo do generiranja razgradnih produkata RP 2, RP 3 i RP 4. Pri bazičnim uvjetima hidrolize, uz ekstremnije uvjete razgradnje, generirani su razgradni produkti RP 5, RP 6 i RP 7, dok su pri kiselim uvjetima hidrolize nastali produkti RP 2 – jednak kao pri razgradnji u oksidirajućim uvjetima, te RP 5 i RP 6 – jednaki kao pri razgradnji u bazičnim uvjetima razgradnje.

Uzorci kod kojih je primijećena razgradnja snimljeni su instrumentom LC-MS. Iz dobivenih spektara masa očitane su mase razgradnih produkata. Nastali produkti s određenim vrijednostima m/z dodatno su snimani metodom MS/MS. Na izdvojene fragmente djelovano je energijama sudara jakosti 0, 10, 20, 30 i 40 V. Optimalna fragmentacija postignuta je korištenjem energije sudara jakosti 20 i 30 V, dok su veće vrijednosti dovele do prevelikog raspada molekula i šuma instrumenta. Pomoću spektara masa pretpostavljene su strukture razgradnih produkata te njihove moguće fragmentacije.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu razvijena je i validirana metoda za analizu potencijalno genotoksičnih onečišćenja ceritiniba tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti spregnutom sa spektrometrijom masa. Validacijom je potvrđeno da je razvijena metoda specifična, točna i robusna. Linearnost metode potvrđena je u rasponu od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ do $10 \mu\text{g L}^{-1}$, odnosno od 0,5 ppm – 5 ppm s obzirom na masenu koncentraciju uzorka ceritiniba od $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Granica kvantifikacije potencijalno genotoksičnih onečišćenja ceritiniba potvrđena je pri masenoj koncentraciji $1 \mu\text{g L}^{-1}$, dok je granica detekcije postignuta pri masenoj koncentraciji $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Točnost metode ispitana je pomoću izračuna analitičkog povrata, čija je vrijednost u rasponu od 81,0 % - 107,3 %. Metoda je ponovljiva u cijelom linearnom rasponu, pri čemu je RSD % višestrukih priprema $<7,0$ %. Robusnost metode dokazana je malim promjenama pojedinih parametara, konkretno protoka, temperature kolone te korištenjem istovjetne kolone različitog serijskog broja, pri čemu nije došlo do razlike u dobivenim rezultatima. Dodatno je potvrđeno da su otopine uzoraka stabilne minimalno 48 sati u prikladnim uvjetima (hladnjak).

Za analizu onečišćenja ceritiniba razvijena je metoda tehnikom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti, a potom optimirana pomoću softvera Drylab. Razvijena metoda je specifična, selektivna, te točna i linearna za određivanje onečišćenja ceritiniba u rasponu od 0,05 %-2,5 % s obzirom na testnu koncentraciju uzorka ceritiniba od $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Metoda je prilagođena za analizu pomoću tehnike LC-MS.

Metoda prilagođena za analizu tehnikom LC-MS korištena je u svrhu identifikacije razgradnih produkata ceritiniba. Razgradnja ceritiniba postignuta je pri povišenoj temperaturi, te u oksidacijskim, kiselim, i bazičnim uvjetima uz zagrijavanje. Zamijećeno je 7 razgradnih produkata (RP 1 - RP 7). Svaki razgradni produkt podvrgnut je analizi UHPLC-MS pomoću detektora Q-TOF, a potom i dodatnoj fragmentaciji čime su dobiveni spektri MS/MS. Iz prikupljenih podataka predložene su strukture razgradnih produkata, uz dodatnu potvrdu pomoću predloženih fragmentacija.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

OZNAKA	NAZIV
ALK	Kinaza aplastičnog limfoma
DAP	Dobra analitička praksa
DLP	Dobra laboratorijska praksa
DPP	Dobra proizvođačka praksa
EMA	Europska agencija za lijekove (eng. <i>European Medicines Agency</i>)
ESI	Ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>electrospray ionization</i>)
FDA	Organizacija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
HC	kanadski vladin Odjel za zdravlje (eng. <i>Health Canada</i>)
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	Internacionalne konferencije za harmonizaciju (engl. <i>International Conference on Harmonisation</i>)
LC	Tekućinska kromatografija (engl. <i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS/MS	Tekućinska kromatografija- tandemna spektrometrija masa (engl. <i>Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry</i>)
LOD	Granica detekcije (engl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	Granica kvantifikacije (engl. <i>limit of quantification</i>)
<i>m/z</i>	Omjer mase i naboja (engl. <i>mass-charge ratio</i>)
MRM	Praćenje višestrukih reakcija (engl. <i>multiple reaction monitoring</i>)
NSCLC	Rak pluća nemalih stanica (engl. <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>)
PMDA	japanska Agencija za lijekove i medicinsku opremu (eng. <i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i>)
ppm	engl. parts per million
QbD	Kvaliteta osigurana dizajnom (engl. <i>quality by design</i>)
QQQ	Trostruki kvadrupol (engl. <i>triple quadrupol</i>)

Q-TOF	Hibridni analizator vremena leta s kvadrupolom (engl. <i>quadrupole time-of-flight</i>)
RRF	relativni faktor odgovora (engl. <i>relative response factor</i>)
S/N	Omjer signala i šuma
SIM	Metoda praćenja stabilnosti (engl. <i>stability indicating method</i>)
SIR	Praćenje odabranih iona (engl. <i>selected ion recording</i>)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. 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.
2. https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170726138214/anx_138214_hr.pdf (datum pristupa 26.7.2020.)
3. J. P. Koivunen, C. Mermel, K. Zejnullahu, C. Murphy, E. Lifshits, A. J. Holmes, H. G. Choi, J. Kim, D. Chiang, R. Thomas, J. Lee, W. G. Richards, D. J. Sugarbaker, C. Ducko, N. Lindeman, J. P. Marcoux, J. A. Engelman, N. S. Gray, C. Lee, M. Meyerson, P. A. Janne, *Clin. Cancer Res.* **14** (2008) 4275–4283.
4. M. W. Burns, E. S. Kim, *Lung Cancer: Targets Ther.* **6** (2015) 35–42.
5. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-r2-impurities-new-drug-substances-step-5_en.pdf (datum pristupa 26.7.2020.)
6. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-limits-genotoxic-impurities_en.pdf (datum pristupa 26.7.2020.)
7. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf
8. S. Narayan, C. Manupiya, *Int. J. Appl. Pharm. Biol. Res.* **2** (2017) 67–75.
9. A. Arunachalam, M. Shankar, *Asian J. Pharm. Anal. Med. Chem.* **1** (2013) 184–195.
10. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-3-b-r2-impurities-new-drug-products-step-5_en.pdf (datum pristupa 26.7.2020.)
11. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf (datum pristupa 26.7.2020.)
12. T. Rawat, I. P. Pandey, *J. Pharm. Sci. Res.* **7** (2015) 238–241.
13. A. R. Mladenović, Proučavanje stabilnosti donepezil-hidroklorida različitim analitičkim metodama, Doktorski rad, Tehnološkometalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2015., str. 22–52.
14. S. Khozin, G. M. Blumenthal, L. Zhang, S. Tang, M. Brower, E. Fox, W. Helms, R. Leong, P. Song, Y. Pan, Q. Liu, P. Zhao, H. Zhao, D. Lu, Z. Tang, A. Al Hakim, K. Boyd, P. Keegan, R. Justice, R. Pazdur, *Clin Cancer Res.* **21**(2015) 2436–2439.
15. New Drugs, *Aust Prescr.* **40** (2017) 82–83.
16. H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, *Molecular Cell Biology*, izdanje 4, W. H. Freeman, New York, 2000. poglavlje 20.4, Receptor Tyrosine Kinases and Ras.
17. R. Chiarle, C. Voena, C. Ambrogio, R. Piva, G. Inghirami, *Nat. Rev.* **8** (2008), 11–23.
18. T. R Webb, J. Slavish, R. E. George, A. T. Look, L. Xue, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **9**(3) (2009) 331–356.
19. M. Reck, S. Popat, N. Reinmuth, K. M. Kerr, S. Peters, *Ann. Oncol.* **25** (2014) 27–39.
20. J. Rotow, T. Bivona, *Nat. Rev. Cancer* **17** (2017) 637–658.

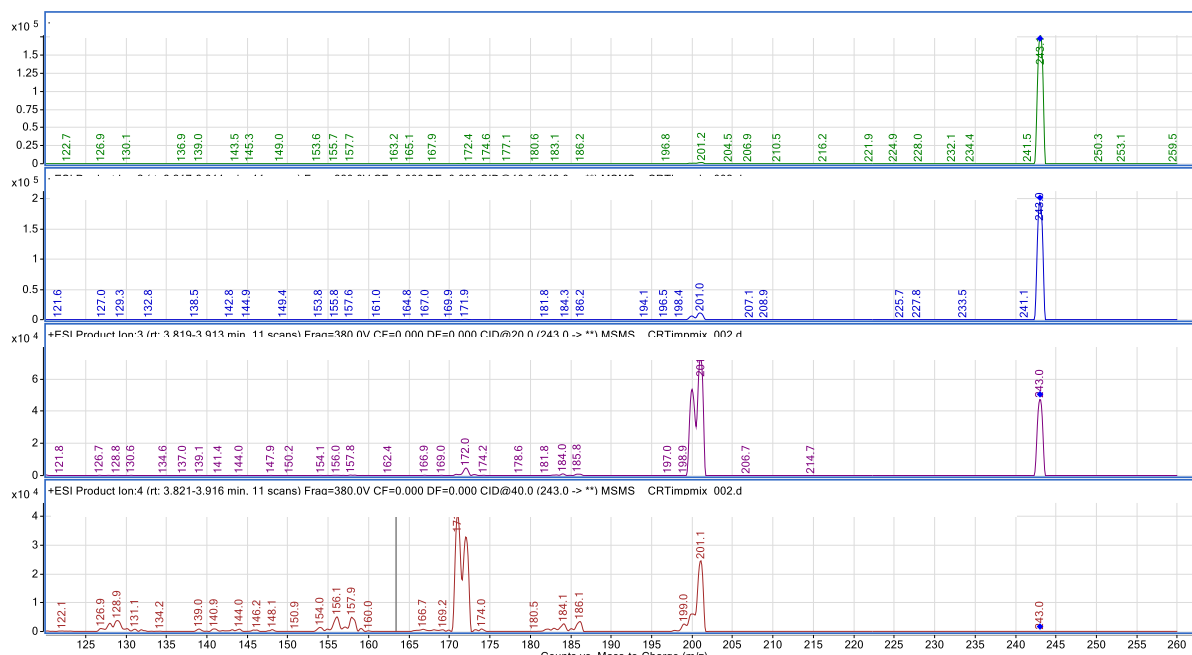
-
21. C. Zappa, S. A. Mousa, *Transl. Lung Cancer Res* **5** (2016) 288–300.
 22. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-33.pdf (datum pristupa 29.7.2020.)
 23. P. K. Gupta, *Fundamentals of Toxicology*, Academic Press, Cambridge, 2016. str 151–164.
 24. T. Nohmi, T. Tsuzuki, *Thresholds of Genotoxic Carcinogens - From Mechanisms to Regulation*, Academic Press, Cambridge, 2016, str. 49–66.
 25. Genotoxic impurities in pharmaceutical products, Agilent technologies, 2013
<https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-1876EN.pdf>
 26. D. Kirkland, D. Snodin, *Int. J. Pharm. Med.* **18** (2004) 197–207.
 27. A. Giordani, W. Kobel, H. Gally. *Eur J Pharm Sci* **43** (2011) 1–15.
 28. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-33.pdf (datum pristupa 29.7.2020.)
 29. R. Kroes, G Kozianowski, *Toxicol. Letters* **127** (2002) 43–46.
 30. U.S. Food and Drug Administration (FDA), *Fed. Regist.* **60** (1995) 36582–36596.
 31. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, Y. K. Agrawal, *J. Pharm. Anal.*, **4** (2014) 159–165.
 32. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-guidance-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-3_en.pdf (datum pristupa 2.8.2020.)
 33. S. Kapavarapu, N. Mopidevi, R. Chintala, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **8** (2015) 44–51.
 34. N. Rifai, A. R. Horvath, C. T. Wittwer, *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, 2018, str.1–32.
 35. I. M. Bird, *BMJ (Clinical research ed.)* **299** (1989) 783–787.
 36. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
 37. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina*, **45** (2009) 218–232.
 38. M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, *Školska knjiga*, Zagreb, (2003) 217–235.
 39. http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/glossary/df_rel.html (datum pristupa 3.8.2020.)
 40. M. Thammana, *Res. Rev.: J. Pharm. Anal.* **5** (2016) 22–28.
 41. K. Toppner, D. Hansen, E. Herbig, *J. Eur.* **17** (2014) 16–18.
 42. E. Generalić, "Beerov zakon.", *Englesko-hrvatski kemijski rječnik i glosar*. KTF-Split, 2018.

-
43. M. Swartz, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **33** (2010) 1130–1150.
44. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 645–674.
45. J. J. van Deemter, E. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.* **5** (1965) 271–289.
46. B. Srivastava, B. K. Sharma, U. S. Baghel, Yashwant, N. Sethi, *Int. J. Pharma. Qual. Assur.* **2** (2010) 19–25.
47. F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1302** (2013) 1–13.
48. A. D. Jerkovich, J. S. Mellors, J. W. Jorgenson, *LCGC N. Am.* **21** (2003) 600–610.
49. D. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 1836–1848.
50. K. Broeckhoven, G. Desmet, *TRAC-Trend Anal Chem.* **63** (2014) 65–75.
51. https://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016 (datum pristupa 4.8.2020.)
52. M. Aleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam, A. Hafeez, *Anal. Pharm. Chem.* **2** (2015) 1056–1060.
53. D. T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J. L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 1836–1848.
54. N. Galić, *Spektrometrija masa*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2004.
55. G. Siuzdak, *An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology*. 2. izdanje, MCC Press, San Diego, 2005.
56. P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 804–817.
57. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry, Principles and Applications* 3th , Wiley, 2007.
58. S. J. Hird, B. Lau, R. Schuhmacher, R. Krska, *TrAC Anal. Chem.* **59** (2014) 59–72.
59. I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, *J Mass Spectrom.* **36** (2001) 849–865.
60. J. C. Wolff, C. Eckers, A. B. Sage, K. Giles, R. Bateman, *Anal. Chem.* **73** (2001) 2605–2612.
61. https://www.researchgate.net/figure/5-Schematic-diagram-of-a-QTOF-mass-spectrometer_fig3_41662887 (datum pristupa 15.7.2020.)
62. J. P. Antignac, P. Marchand, B. Le-Bizec, F. André, *J. Chromatogr. B.* **774** (2002) 59–64.
63. J.A. Van Rhijn, J.J.P. Lasaroms, B.J.A. Berendsen, *J. Chromatogr. A* **960** (2002) 121–133.

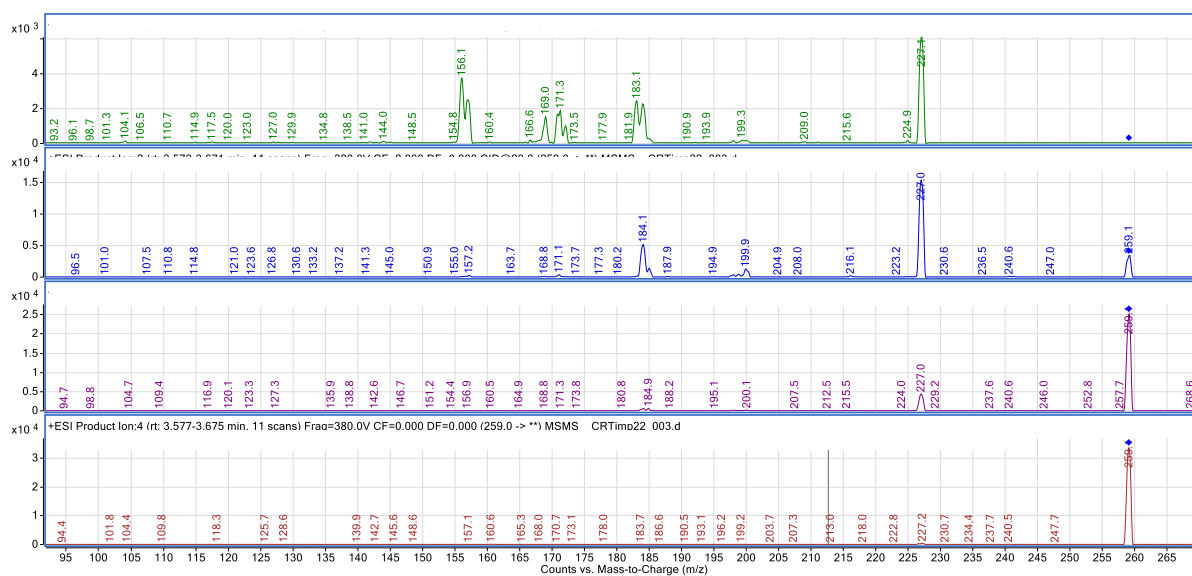
-
64. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf (datum pristupa 5.8.2020.)
 65. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>(datum pristupa 5.8.2020.)
 66. J. M. Green, *Anal. Chemi.* **68** (1996) 305A–309A
 67. R. Kormany, H. J. Rieger, I. Molnar, *LCGC* **31** (2013) 20–27.
 68. N. Racz, R. Kormany, J. Feket, I. Molnar, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **108** (2015) 1–10.
 69. https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf (datum pristupa 7.8.2020.)
 70. L. X. Yu, G. Amidon, M. A. Khan, *AAPS J* **16** (2014) 771–783.
 71. A. Rathore, H. Winkle, *Nat. Biotechnol.* **27** (2009) 26–34.
 72. T. S. Patil, A. S. Deshpande, *Chromatographia* **82** (2019) 579–590.
 73. C. dos Santos Moreira, F. R. Lourenço, *Microchem. J.* **154** (2020) 104610.
 74. S. Raman, U. R. Mallu, H. R. Bapatu, *J. Chem.* **2015** (2015) 1–8.
 75. M. Deepa, K. R. Reddy, S. V. Satyanarayana, *J Pharm Res.* **11** (2017) 272–277.
 76. R. M. Krisko, K. McLaughlinb, M. J. Koenigbauer, C. E. Lunte, *J. Chromatogr. A.* **1122** (2006) 186–93.
 77. J. Terzić, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, *Arh. farm.* **64** (2014) 205–219.
 78. H. Katsialevich H. J. Rieger, I. Molnár, A. Zöldhegyi, *Handb. Anal. Sep.* **8** (2020) 277–305.
 79. W. Yang, Y. Pan, R. Yang, *IJCM* **38** (2016) 350–354.
 80. C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, *J. Chromatogr. A.* **125** (1976) 129–156.
 81. P. Nikitas, A. Papa–Louisi, *J Chromatogr A.* **1216** (2009) 1737–1755.
 82. S. C. Moldoveanu, E. Caiali, V. David *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **41** (2018) 24–32.
 83. I. Molnár, *J. Chromatogr. A.* **965** (2002) 175–194.
 84. <https://www.polygen.com.pl/files/1815181677/drylab2010.pdf> (datum pristupa 7.8.2020.)
 85. R. Kormány, The role of liquid chromatographic modeling software in Quality by Design principles, Thesis, Budapest University of Technology and Economics, Department of inorganic and analytical chemistry, 2015., str.6.
 86. A. H. Schmidt, I. Molnár, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **78–79** (2013) 65–74.
 87. L. Müller et al. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **44** (2006), 198–211.
 88. C. Barber et al., *Regul. Toxicol. Pharmacol* **73** (2015), 367–377.
 89. M. Kamberi, H. Garcia, D. P. Feder, R. J. Rapozac, *Eur J Pharm Sci.* **42** (2011) 230–237.
 90. S. O. Krause, Good Analytical Method Validation Practice – Deriving Acceptance Criteria for the AMV Protocol: Part II, Bayer HealthCare Corporation ([file:///C:/Users/miaan/Downloads/GoodAnalyticalPartII%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/miaan/Downloads/GoodAnalyticalPartII%20(1).pdf), datum pristupa 14.8.2020.)

-
91. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, Laboratory and Scientific Section, United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna (https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf, datum pristupa 14.8.2020.)

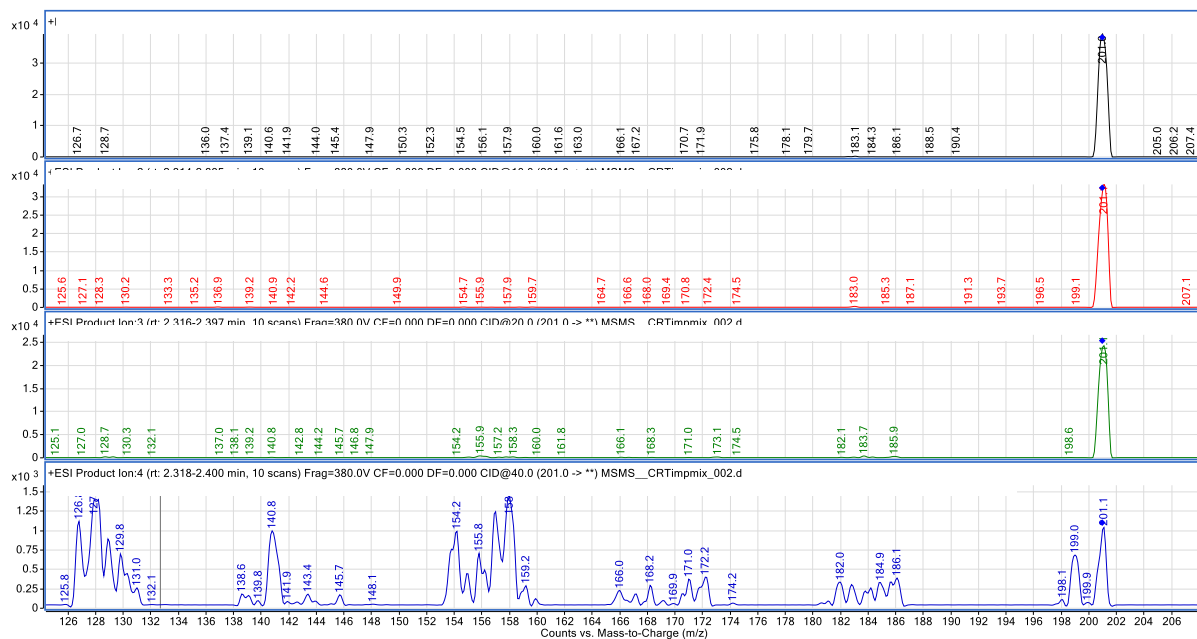
§ 8. DODATAK



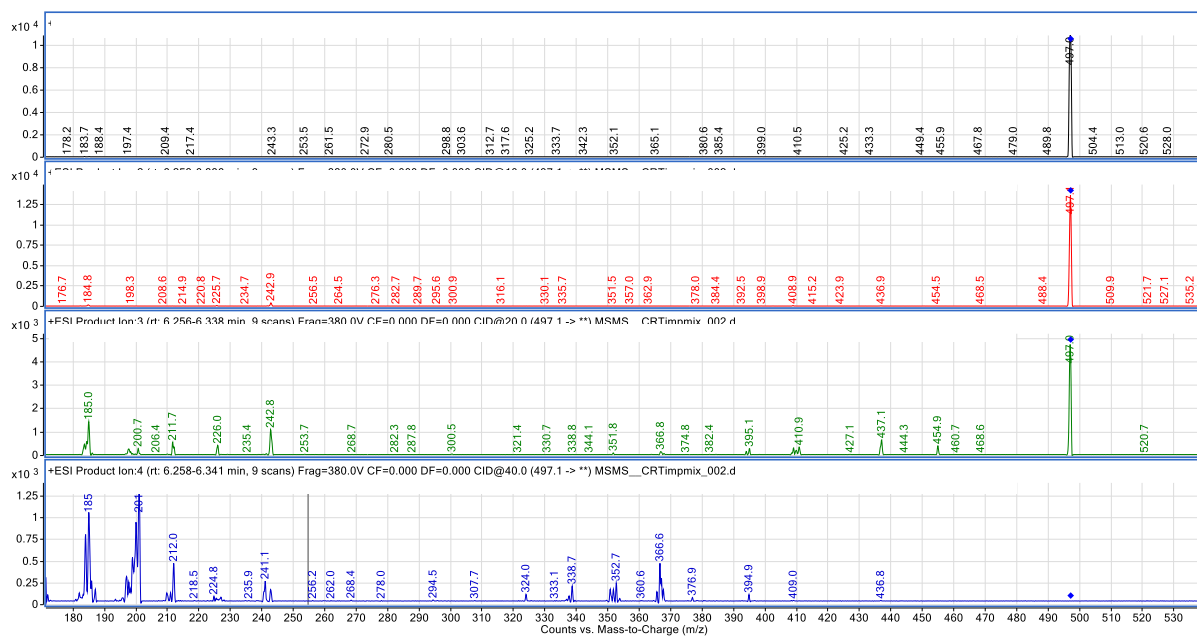
Slika D1. Spektar MS/MS onečišćenja PGI 1 pri četiri različite kolizijske energije.



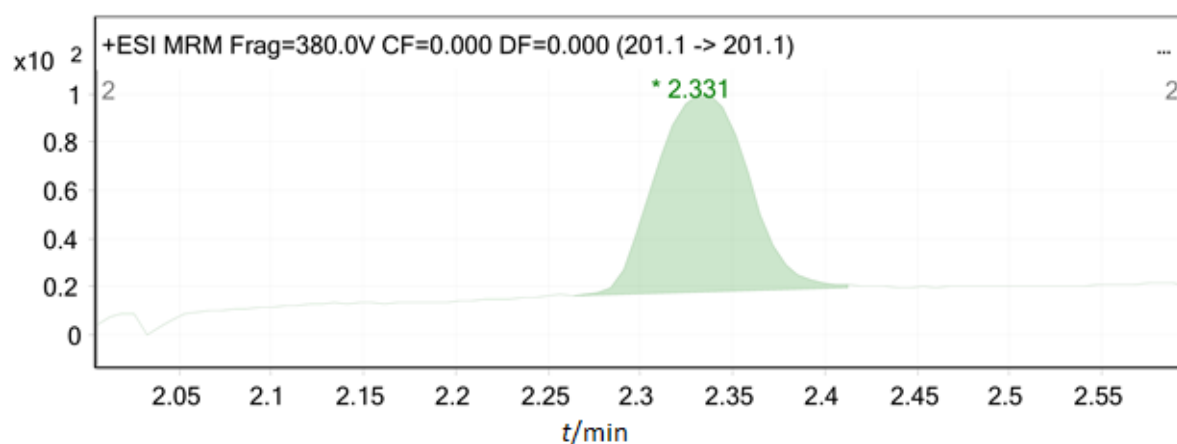
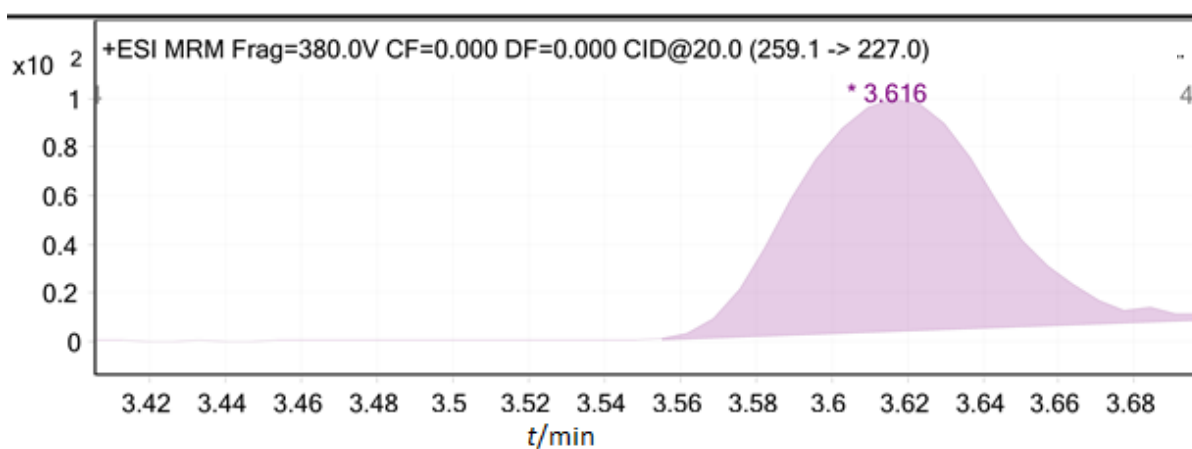
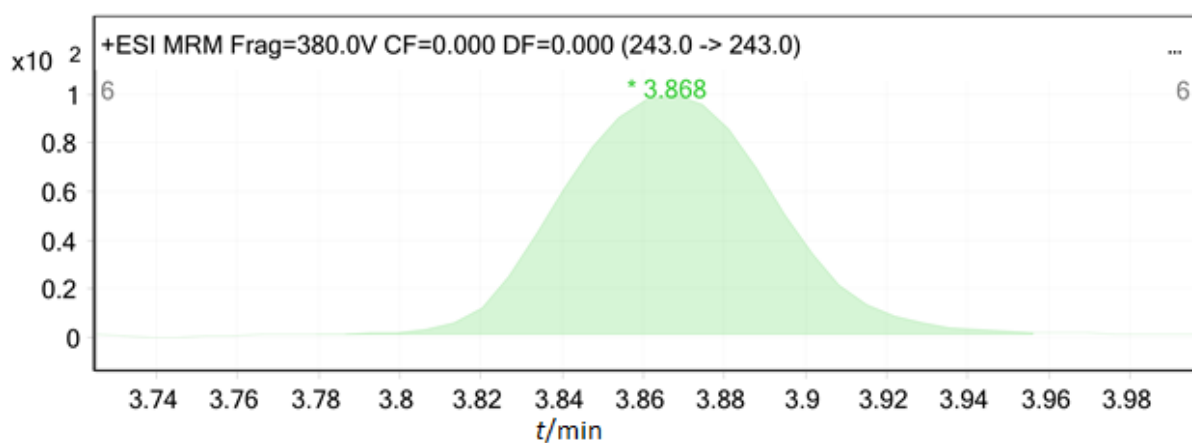
Slika D2. Spektar MS/MS onečišćenja PGI 2 pri četiri različite kolizijske energije.



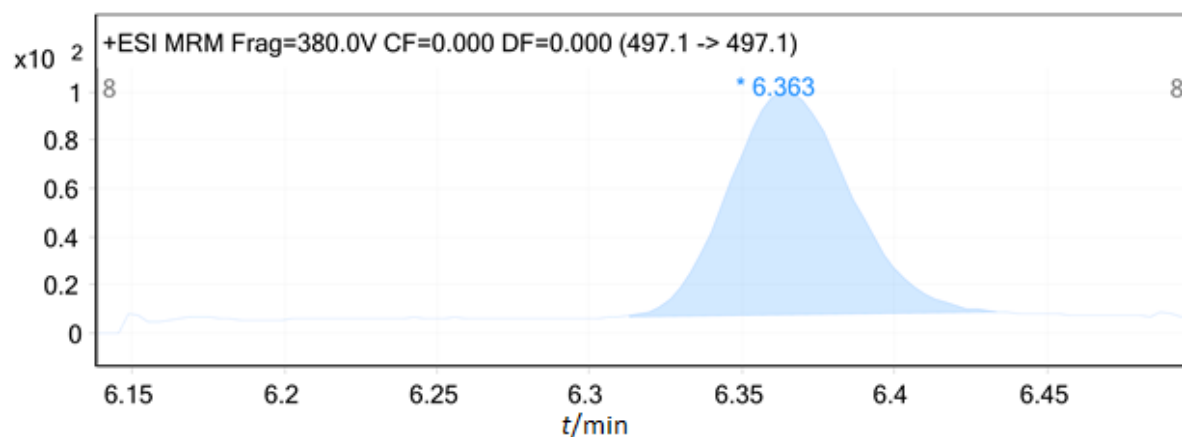
Slika D3. Spektar MS/MS onečišćenja PGI 3 pri četiri različite kolizijske energije.



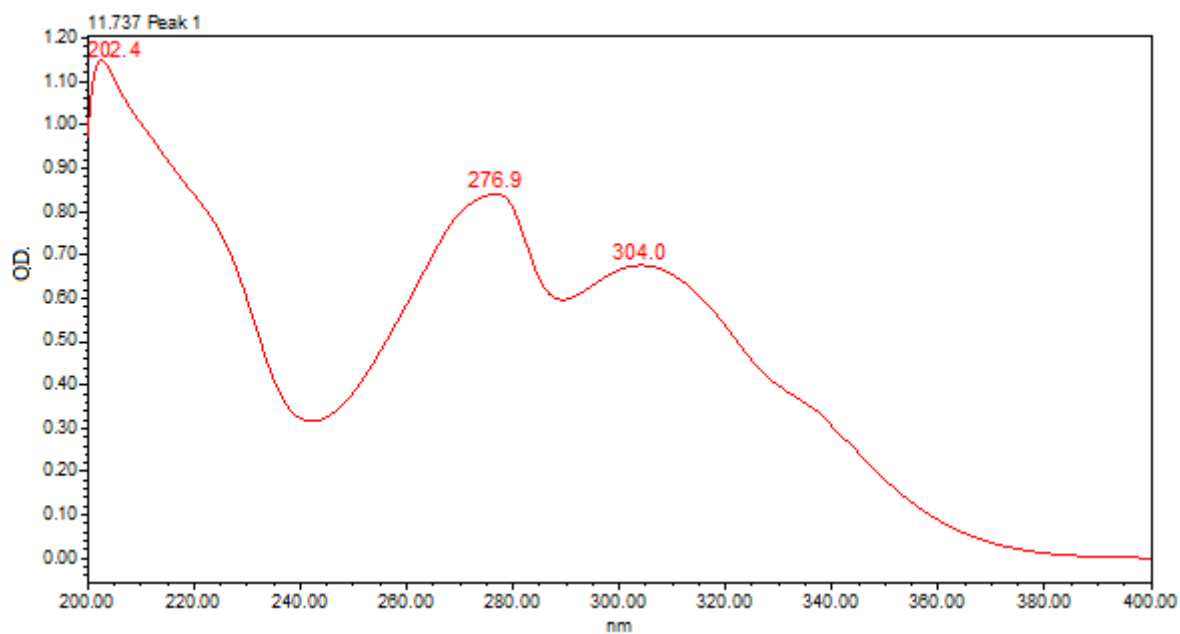
Slika D4. Spektar MS/MS onečišćenja PGI 4 pri četiri različite kolizijske energije.

Slika D5. Kromatogram onečišćenja PGI 1 pri koncentraciji od $4 \mu\text{g L}^{-1}$.Slika D6. Kromatogram onečišćenja PGI 2 pri koncentraciji od $4 \mu\text{g L}^{-1}$.Slika D7. Kromatogram onečišćenja PGI 3 pri koncentraciji od $4 \mu\text{g L}^{-1}$.

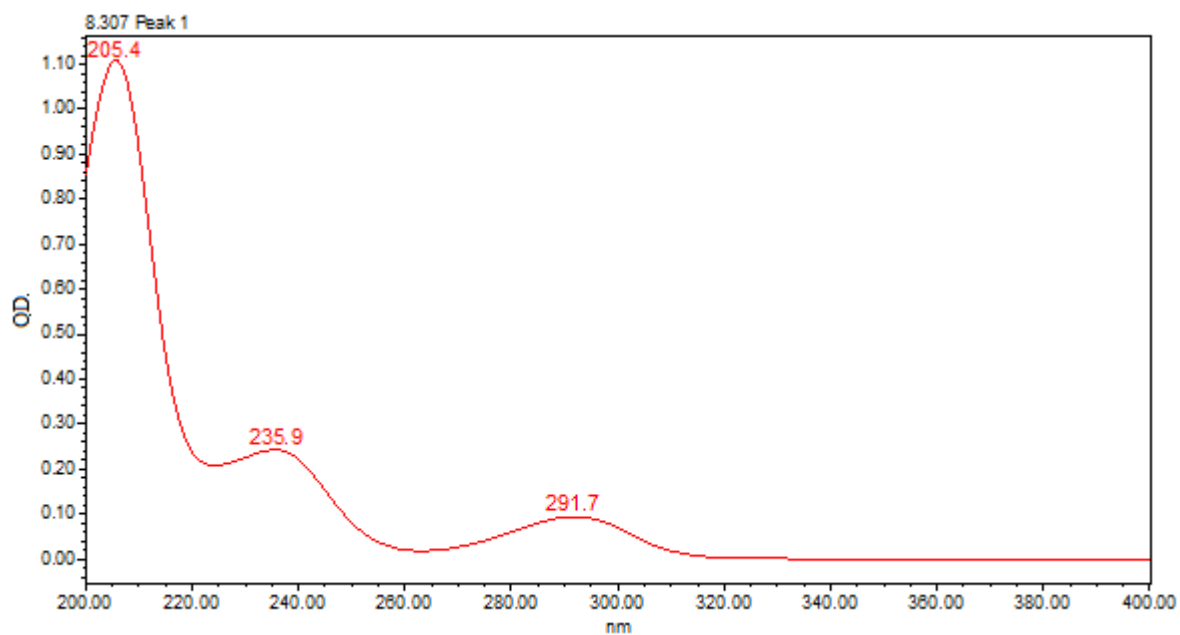
Fragmentor Voltage 380 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



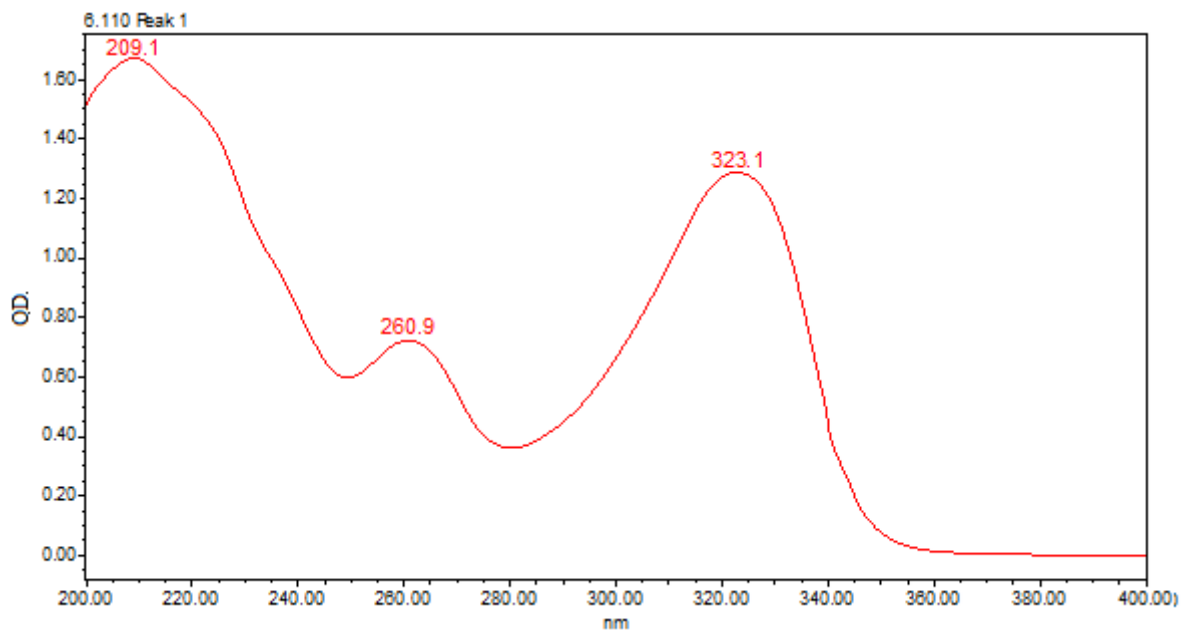
Slika D8. Kromatogram onečišćenja PGI 4 pri koncentraciji od $4 \mu\text{g L}^{-1}$.



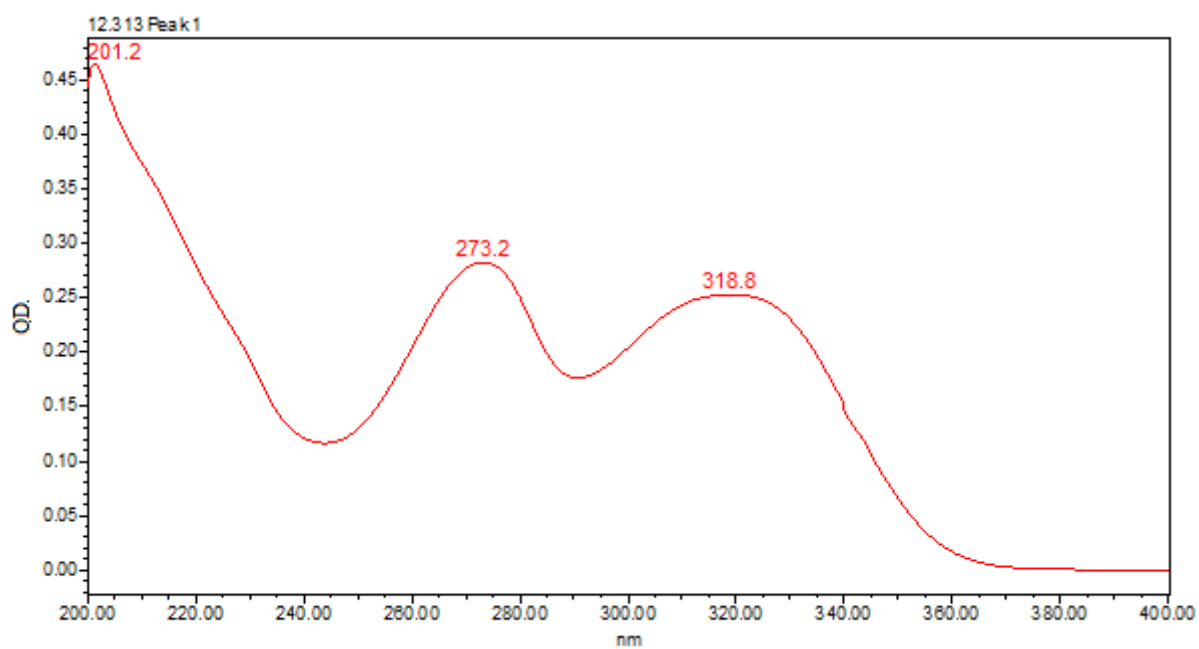
Slika D9. Spektar UV/VIS djelatne tvari ceritinib.



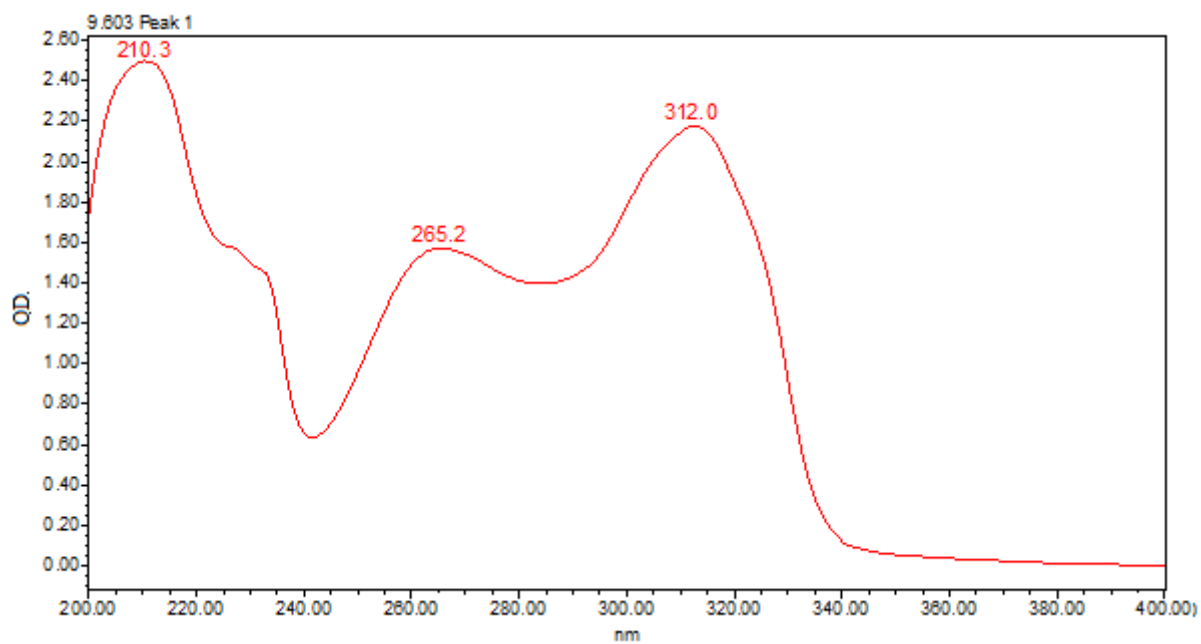
Slika D10. Spektar UV/VIS onečišćenja CRT-1



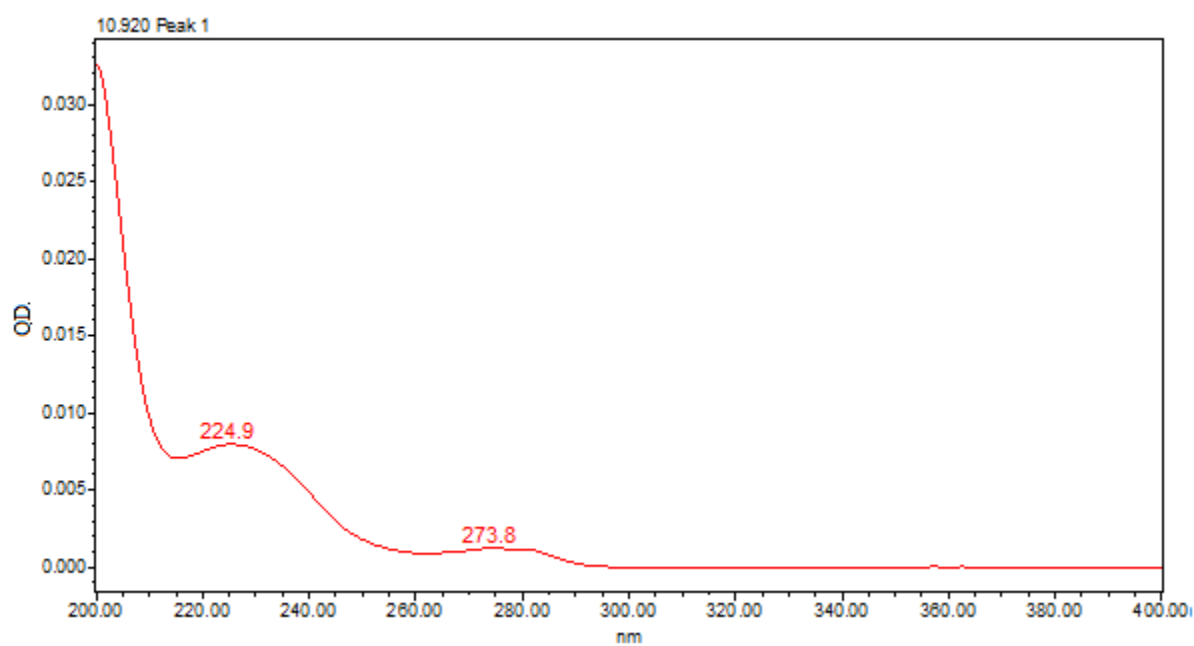
Slika D11. Spektar UV/VIS onečišćenja CRT imp 1



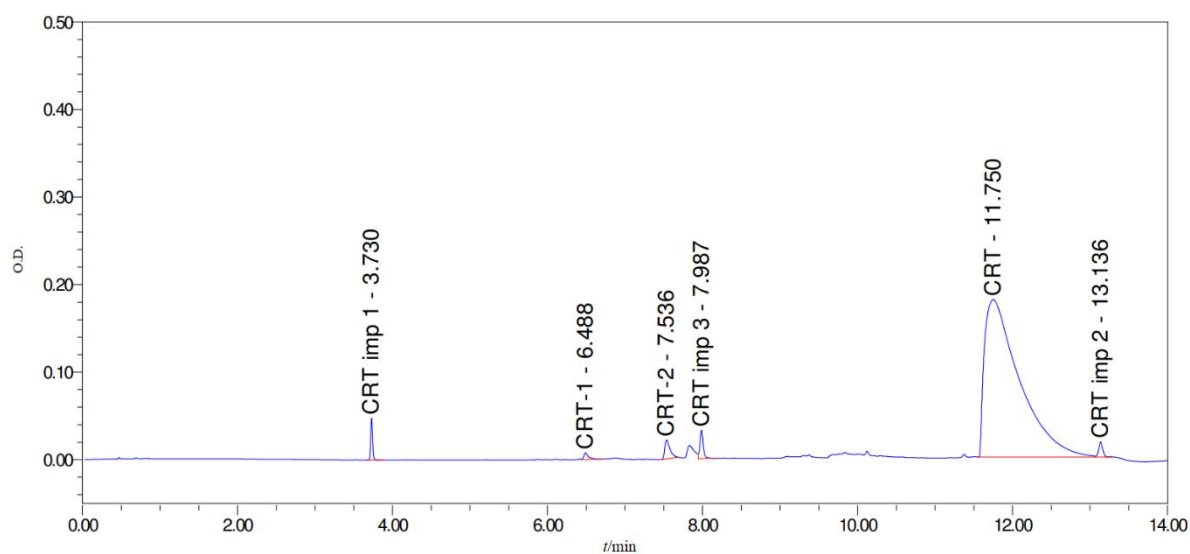
Slika D12. Spektar UV/VIS onečišćenja CRT imp 3



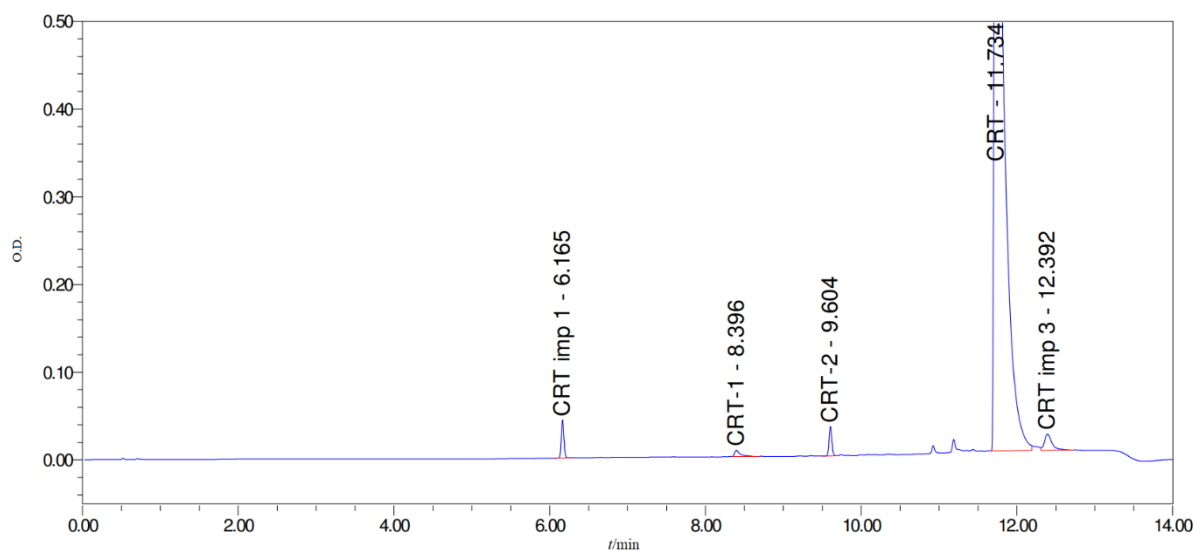
Slika D13. Spektar UV/VIS onečišćenja CRT-2



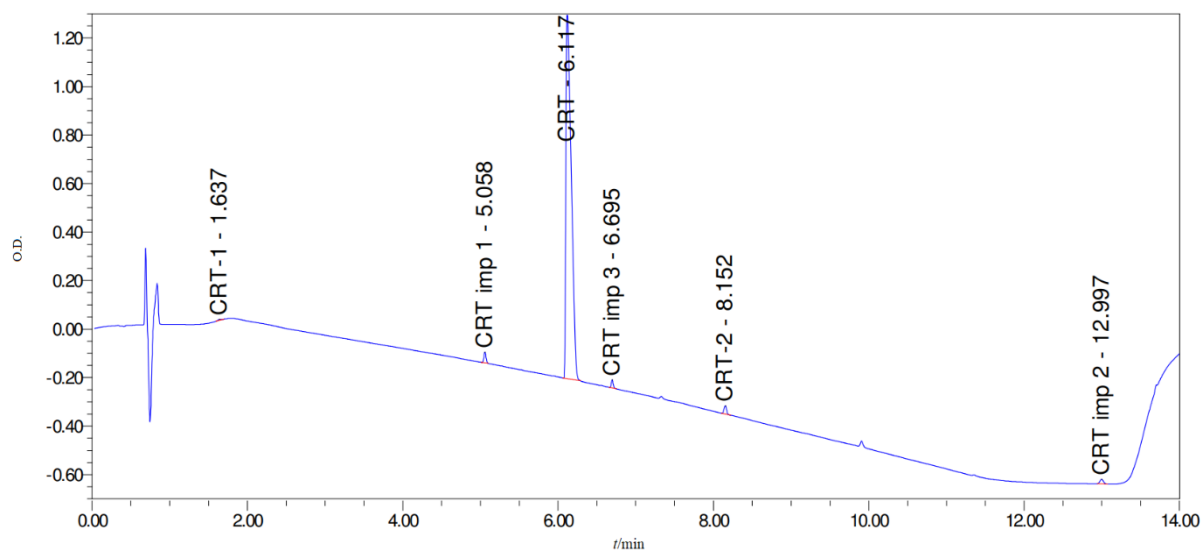
Slika D14. Spektar UV/VIS onečišćenja CRT imp 2



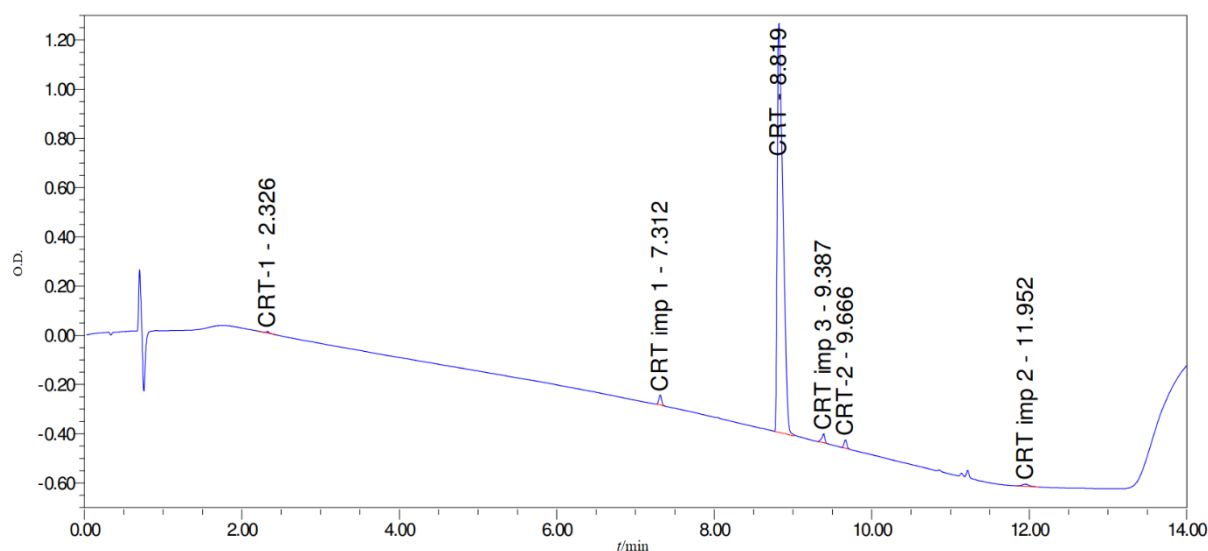
Slika D15. Kromatogram ceritiniba i onečišćenja ceritiniba dobiven korištenjem kolone WATERS Acquity BEH C18, razrijeđene otopine amonijaka kao vodene pokretne faze i acetonitrila kao organske pokretne faze.



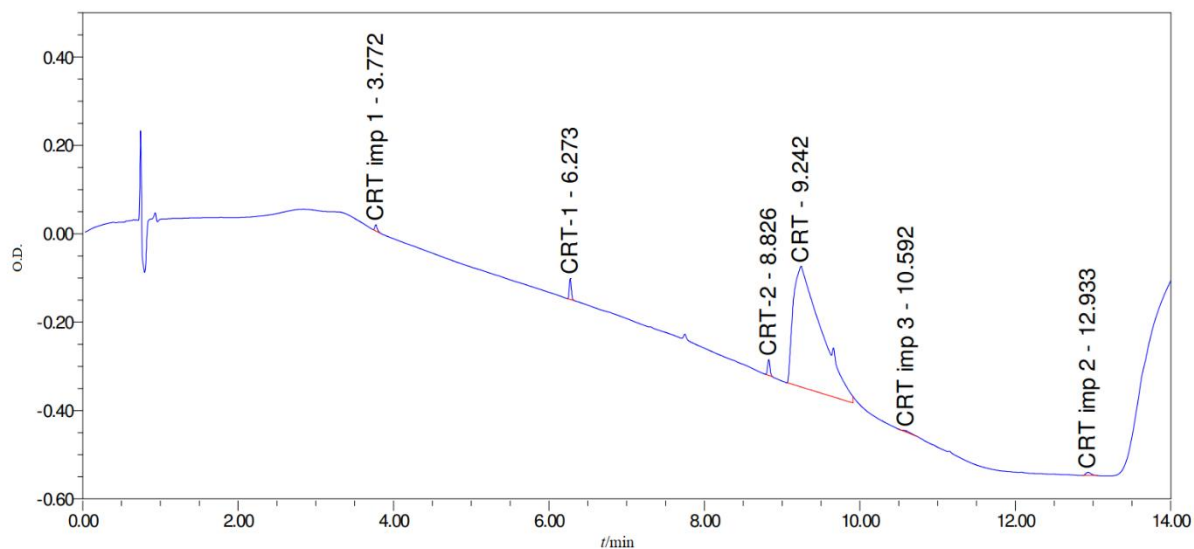
Slika D16. Kromatogram ceritiniba i onečišćenja ceritiniba dobiven korištenjem kolone WATERS Acquity BEH C18, razrijeđene otopine amonijaka kao vodene pokretne faze i metanola kao organske pokretne faze.



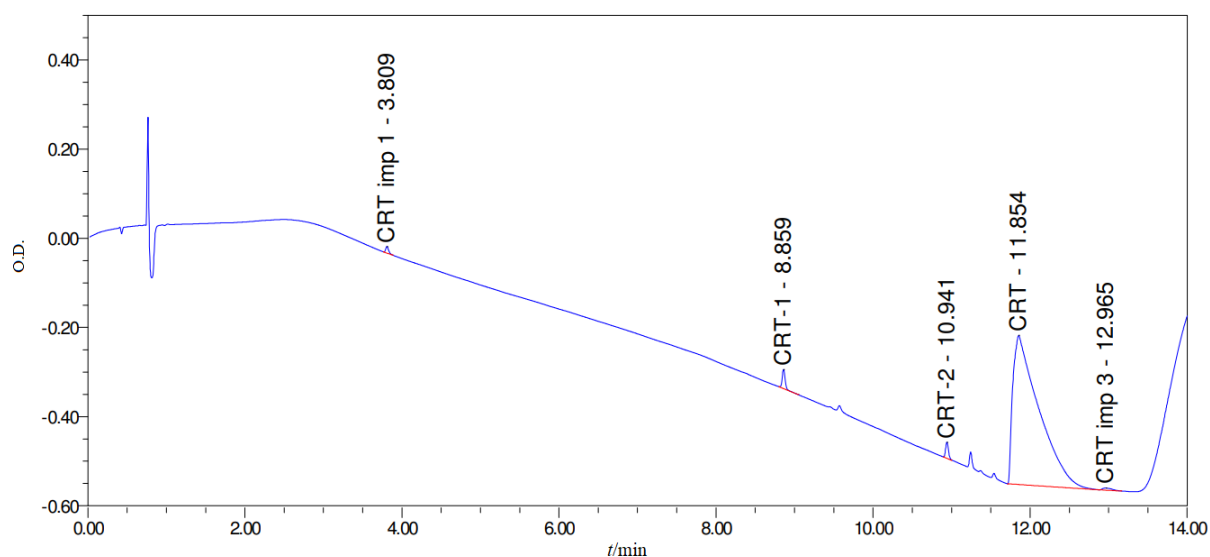
Slika D17. Kromatogram ceritiniba i onečišćenja ceritiniba dobiven korištenjem kolone WATERS Acquity BEH C18, razrijeđene otopine mravlje kiseline kao vodene pokretne faze i acetonitrila kao organske pokretne faze.



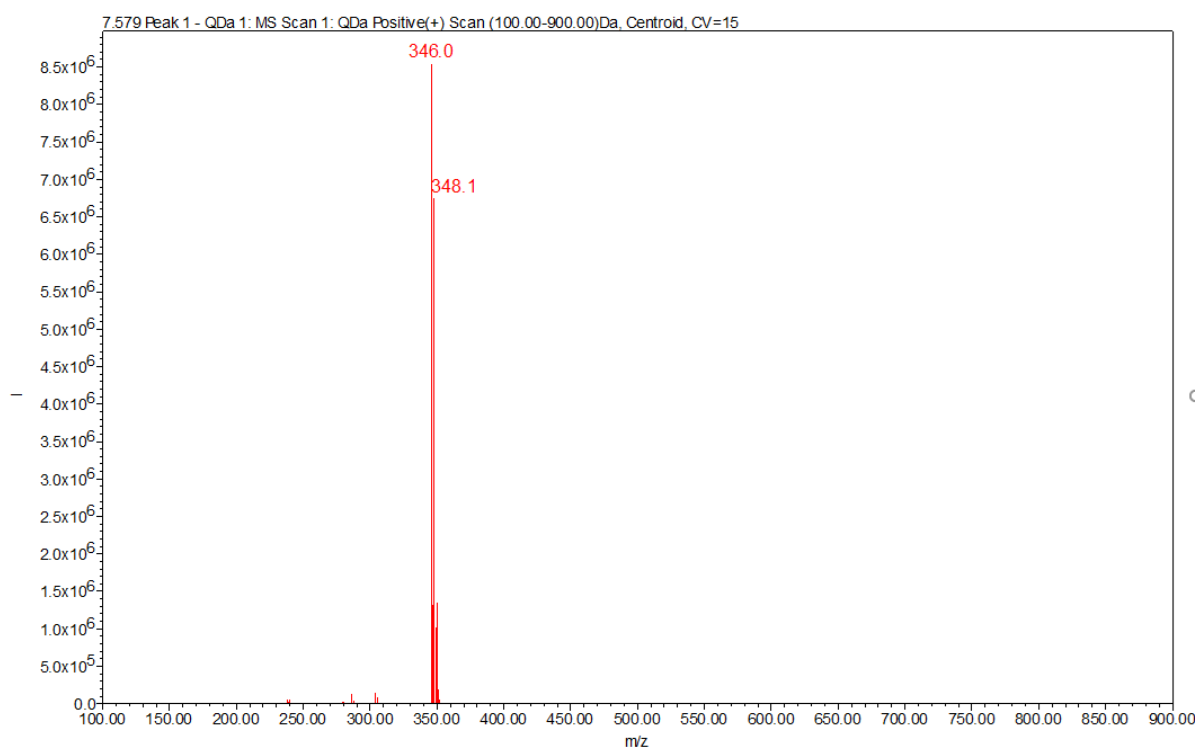
Slika D18. Kromatogram ceritiniba i onečišćenja ceritiniba dobiven korištenjem kolone WATERS Acquity BEH C18, razrijeđene otopine mravlje kiseline kao vodene pokretne faze i metanola kao organske pokretne faze.



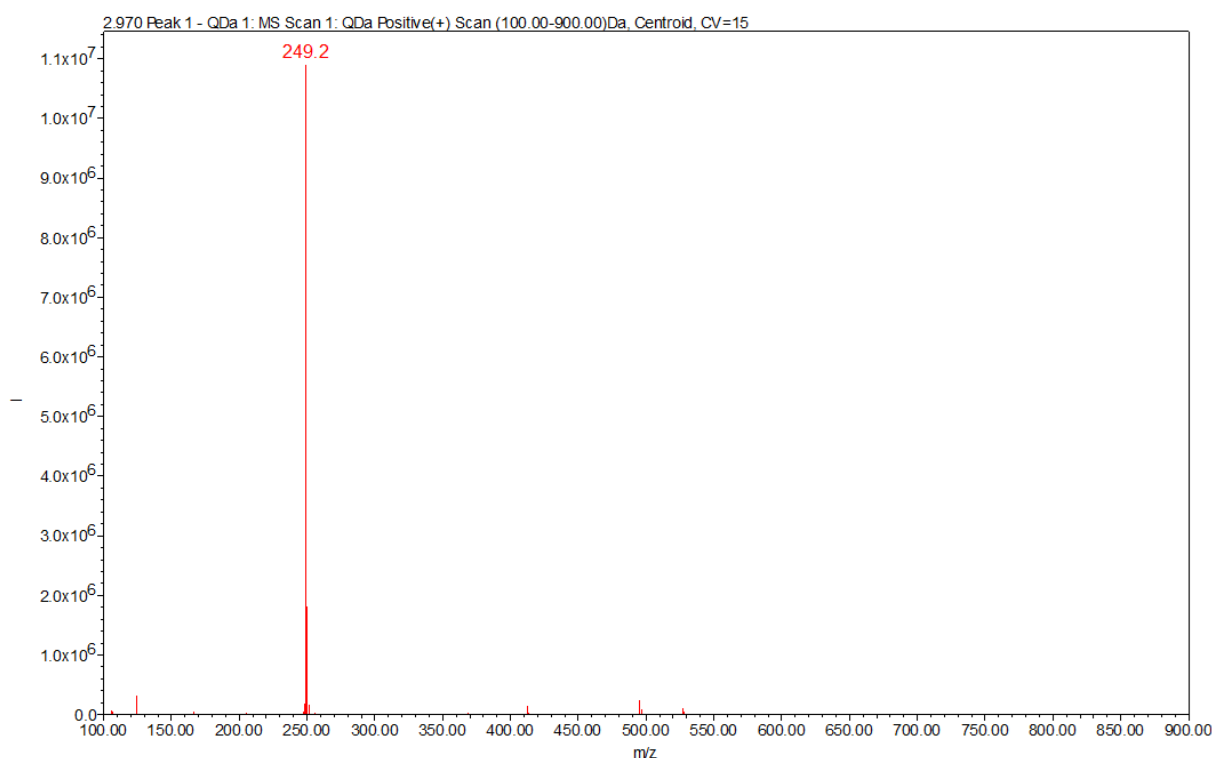
Slika D19. Kromatogram ceritiniba i onečišćenja ceritiniba dobiven korištenjem kolone WATERS Acquity BEH Phenyl, razrijeđene otopine mravlje kiseline kao vodene pokretne faze i acetonitrila kao organske pokretne faze.



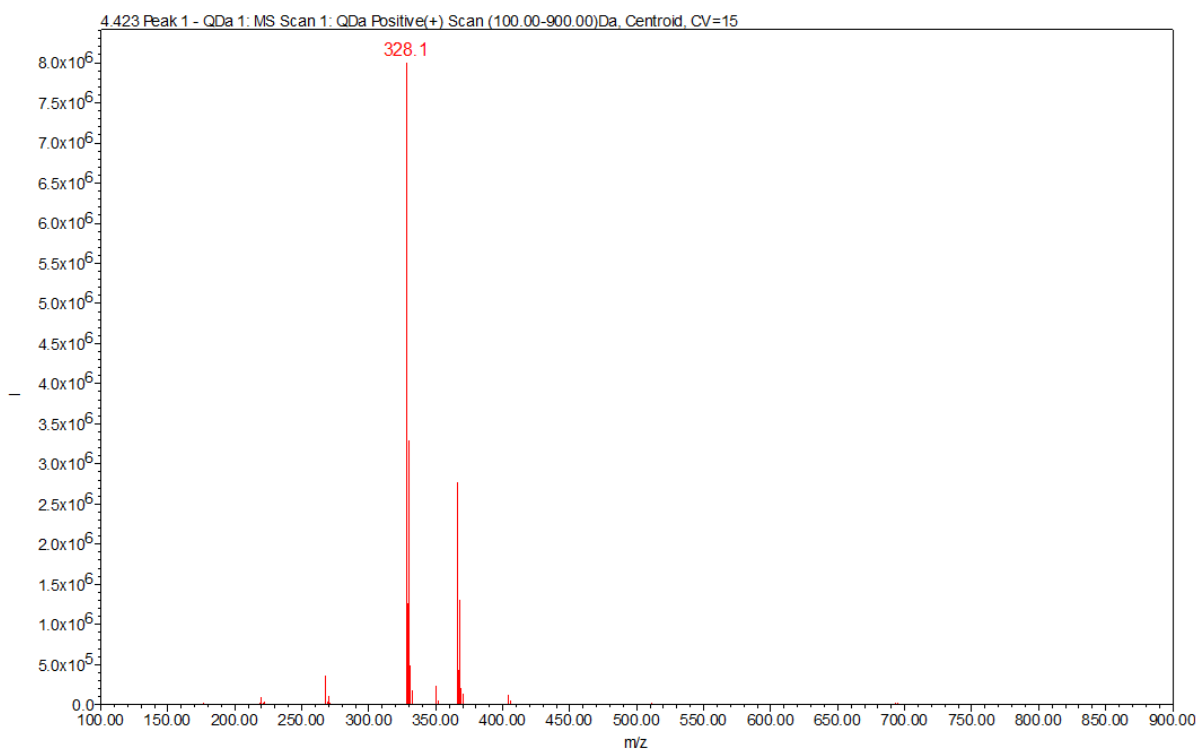
Slika D20. Kromatogram ceritiniba i onečišćenja ceritiniba dobiven korištenjem kolone WATERS Acquity BEH Phenyl, razrijeđene otopine mravlje kiseline kao vodene pokretne faze i metanola kao organske pokretne faze.



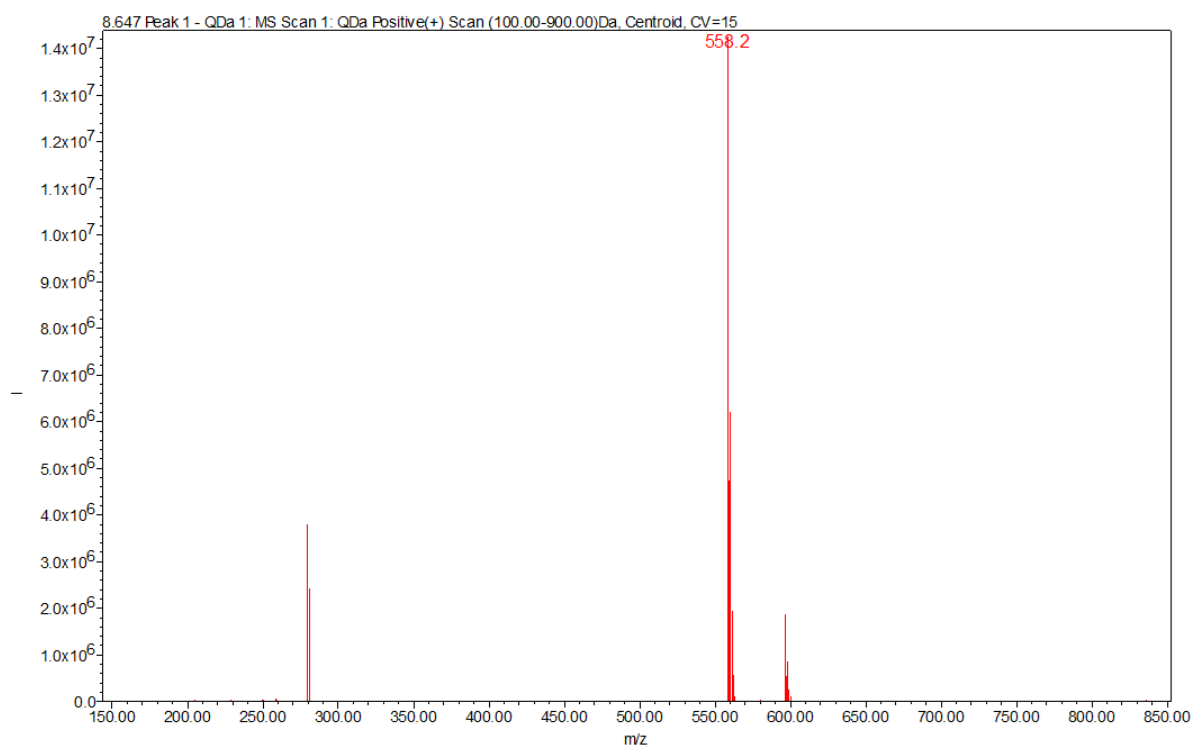
Slika D21. Spektar MS djelatne tvari ceritinib.



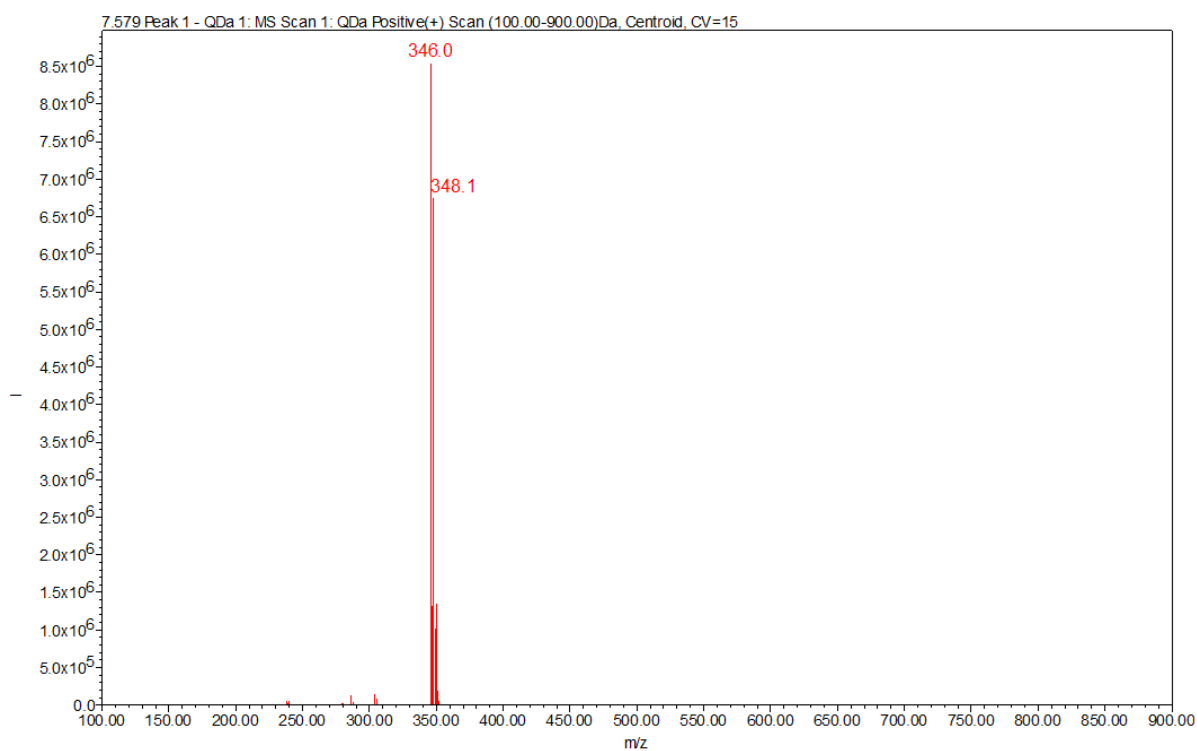
Slika D22. Spektar MS onečišćenja CRT- 1



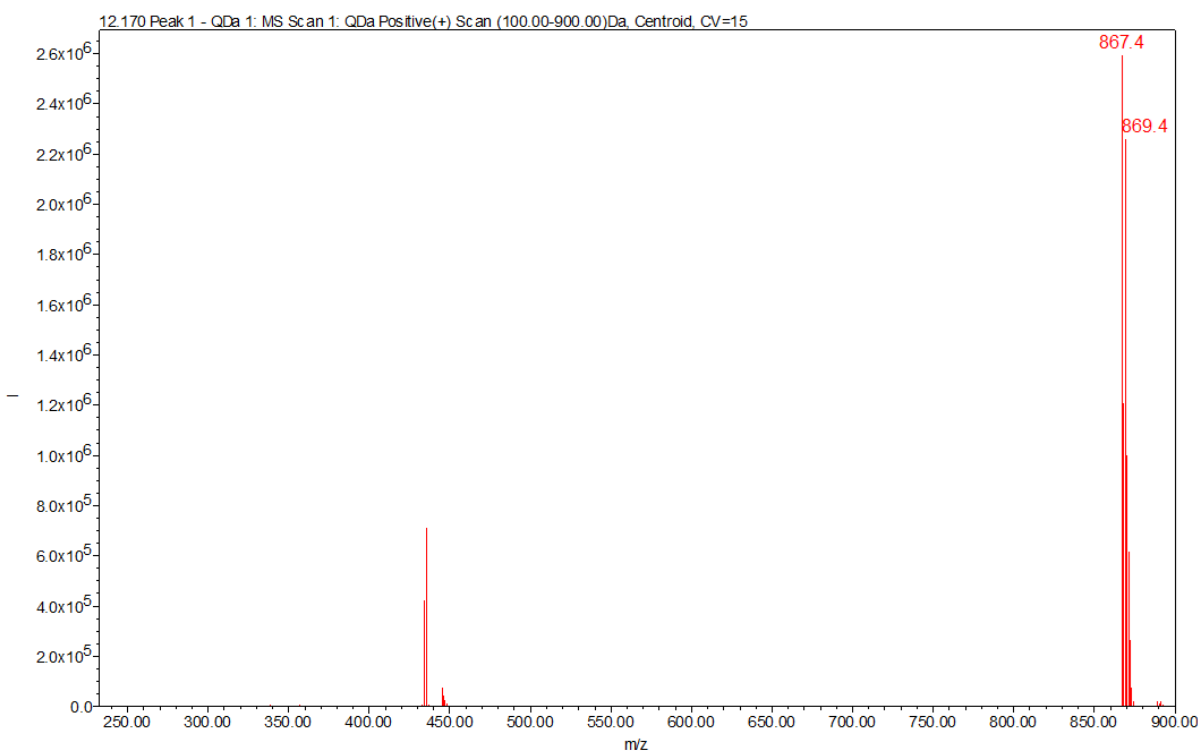
Slika D23. Spektar MS onečišćenja CRT imp 1



Slika D24. Spektar MS onečišćenja CRT imp 3



Slika D25. Spektar MS onečišćenja CRT -2.



Slika D26. Spektar MS onečišćenja CRT imp 2.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Mia Antolčić rođena je 27. veljače 1991. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Godine 2009. upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2014. godine predstavljala je Kemijski odsjek u sklopu Smotre Sveučilišta u Zagrebu te je tamo dobila priznanje za najcjelovitije informacije o studijskim programima. Godine 2015. stekla je zvanje magistre kemije izradivši diplomski rad po nazivom „Interakcija nukleozid-difosfat-kinaza Nme1 i Nme2 s proteinom TRF1 koji veže telomere“ pod mentorstvom dr. sc. Helene Četković, v.zn.sur. u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković. Godine 2016. upisuje Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija pod vodstvom prof.dr.sc. Nives Galić. Rezultate svojih dosadašnjih istraživanja prikazala je u znanstvenom radu objavljenom u časopisu Analytical methods. Aktivno je sudjelovala na međunarodnom znanstvenom skupu NDPK2016 s kratkim usmenim priopćenjem, te na skupu HSKIKI s posterskim priopćenjem. 2015. godine zapošljava se u PLIVI- Istraživanje i razvoj, odjel TAPI Analitika. 2019. godine počinje raditi u Centru za kontrolu namirnica pri PBF-u kao Ispitivač, a od svibnja 2021. godine zaposlena je u Pgf Pharma International kao Voditeljica odjela kontrole kvalitete.