

Laura Gubić

**Prisilna razgradnja fosamprenavira i analiza
razgradnih produkata LC-MS tehnikom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Plivi, Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Nigović i suvoditeljstvom Kornelije Lasić, mag. pharm.

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Biljani Nigović na ogromnoj životnoj prilici i ukazanom povjerenju te svim znanjima i neizmjernom trudu koje mi je pružila. Zahvaljujem se svojoj komentorici dr. sc. Korneliji Lasić na pomoći i zalaganju tijekom izrade ovog rada u Plivi te njenom timu na podršci i dragocjenim iskustvima. Najveće hvala mojim roditeljima koji su me uvijek vraćali u život, ohrabivali i podržavali u svemu i bratu koji je bio njihova produžena ruka kad god je trebalo. Hvala mojoj cimerici i svim prijateljima koji su bili uz mene.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. HIV/AIDS.....	1
1.1.1. Ciklus razmnožavanja HIV-a.....	1
1.2. Fosamprenavir.....	3
1.3. Onečišćenja u lijekovima i klasifikacija onečišćenja.....	4
1.4. Ispitivanja stabilnosti.....	6
1.4.1. Prisilna razgradnja lijeka.....	6
1.4.1.1. Uvjeti prisilne razgradnje.....	7
1.5. Zeneth predikcija.....	8
1.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	9
1.6.1. UPLC.....	10
1.6.2. Dijelovi HPLC/UPLC instrumenta.....	11
1.7. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda.....	12
1.8. Spektrometrija masa.....	13
1.8.1. Ionizacija.....	14
1.8.2. Ionska separacija.....	16
1.9. LC-MS.....	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	21
3. MATERIJALI I METODE.....	22
3.1. Kemikalije.....	22
3.2. Radni instrumenti.....	22
3.2.1. UHPLC-DAD.....	23
3.2.2. UHPLC-QTOF.....	23
3.3. Metode.....	23
3.3.1. Priprema otopina pufera.....	23
3.3.2. UHPLC metoda.....	24
3.3.3. Priprema uzoraka- prisilna razgradnja fosamprenavira.....	24
3.3.3.1. Kisela/bazična razgradnja.....	25
3.3.3.2. Oksidacijska razdgradnja.....	25
3.3.3.3. Toplinska razgradnja.....	25
3.3.3.4. Fotolitička razgradnja.....	26

3.3.4. MS analiza.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. Provjera uvjeta razgradnje pomoću UHPLC tehnike.....	27
4.2. MS analiza uzorka fosamprenavira.....	31
4.2.1. Uzorak razgrađen u kiselim uvjetima pomoću HCl.....	32
4.2.2. Uzorak razgrađen u lužnatim uvjetima pomoću NaOH.....	34
4.2.3. Uzorak razgrađen u oksidacijskim uvjetima pomoću H ₂ O ₂	36
4.2.4. Uzorak razgrađen pod utjecajem topline na 105 °C tijekom 48 sati.....	41
4.2.5. Uzorak razgrađen zagrijavanjem na 80 °C tijekom jednog sata.....	44
4.2.6. Uzorak razgrađen utjecajem svjetlosti tijekom 24 sata.....	46
4.3. Određivanje struktura razgradnih produkata.....	49
4.3.1. Razgradnja fosamprenavira u kiselim uvjetima.....	51
4.3.2. Razgradnja fosamprenavira u bazičnim uvjetima.....	51
4.3.3. Razgradnja fosamprenavira oksidacijom.....	52
4.3.4. Toplinska razgradnja fosamprenavira.....	57
4.3.5. Fotolitička razgradnja fosamprenavira.....	58
5. ZAKLJUČCI.....	60
6. LITERATURA.....	61
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	64

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. HIV/AIDS

Sindrom stečene imunodeficijencije (Acquired Immunodeficiency Sindrom=AIDS) otkiven je 1981. godine u SAD-u među pripadnicima homoseksualne orijentacije, a ubrzo je identificiran i HIV virus koji je uzročnik bolesti te je postavljen temelj znanstvenicima da pokušaju napraviti učinkovitu terapiju za oboljele od ove teške zarazne bolesti. Prvenstveno je cilj bio povećati stopu preživljenja oboljelih, usporiti tijek bolesti te poboljšati kvalitetu njihova života što je zahvaljujući otkriću i razvoju novih antiretrovirusnih lijekova i ostvareno, ali trajnog ozdravljenja ipak još uvijek nema (Završnik i sur., 2005).

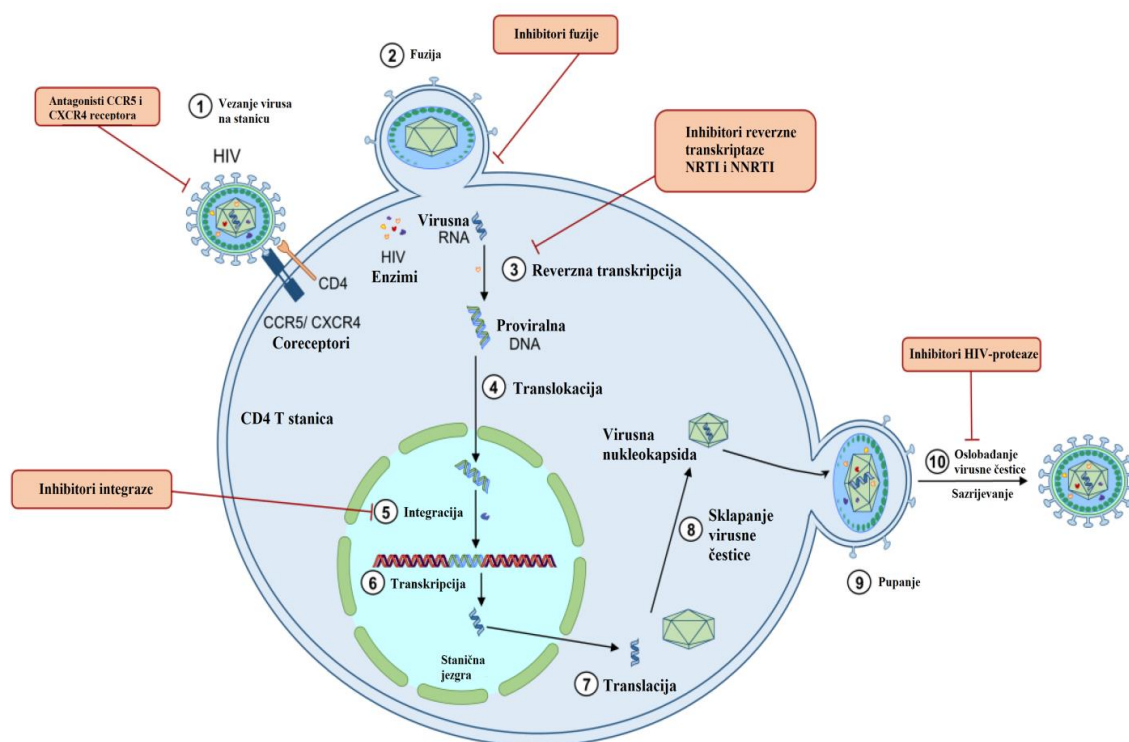
HIV (Human Immunodeficiency Virus) je retrovirus koji pogađa imunosni sustav domaćina i oslabljuje njegov imunološki odgovor time i obranu od mnogih infekcija te povećava rizik od razvoja različitih vrsta tumora. Kako virus uništava imunosne stanice, a posebice napada CD4+ limfocite i umanjuje njihovu funkciju, tako oboljela osoba vremenom razvija teški sindrom stečene imunodeficijencije što na kraju završava fatalno budući da se organizam ne može izboriti sa svim infekcijama i bolestima. Infekcija HIV-om prenosi se izmjenom tjelesnih tekućina kao što su krv, majčino mlijeko, sperma te vaginalni sekreti, dakle put prijenosa je s majke na dijete prilikom poroda i dojenja, krvlju te spolnim putem, što je vrlo važno znati kako bi se bolest mogla što bolje prevenirati (www.who.int).

Dijagnosticira se provedbom serološkog probirnog testa uz zajamčenu diskreciju i zaštitu povjerljivosti ispitivane osobe te kada se otkrije zaraza potrebno je inicijalno procijeniti uznapređovalost bolesti određivanjem broja CD4+ limfocita i HIV-viremije u krvi. Department of Health and Human Services i International AIDS Society preporučuju inicijaciju terapije kod svih pacijenata koji imaju broj CD4 stanica manji od 350 stanica/ μ L krvi ili razinu virusa u krvi veću od 10 000 do 20 000, bez obzira na broj CD4 stanica (Završnik i sur., 2005).

1.1.1. Ciklus razmnožavanja HIV-a

Životni ciklus i replikacija HIV virusa je vrlo kompleksna, ali bez njenog znanja i razumijevanja poznavanje mehanizama djelovanja antivirusnih lijekova i terapije nije moguće

(Slika 1). HIV je retrovirus i njegov genetski materijal je pohranjen u molekuli RNA. Dva su važna glikoproteina na površini vanjske ovojnice virusa gp120 i gp41, a u unutrašnjosti virusne čestice se nalaze RNA i enzimi potrebni za replikaciju. Nakon ulaska virusa u organizam, najprije se pomoću gp120 virus veže na membranski CD4+ receptor, te u kontaktu s CCR5 i CXCR4 koreceptorima na T-limfocitu dolazi do njegovih konformacijskih promjena te se potom odstranjuje. Nakon adsorpcije, pomoću gp41 dolazi do fuzije, pa otpuštanja i ulaska nukleokapside virusa u stanicu. Nukleokapsida se razgrađuje djelovanjem enzima HIV-proteaze te se RNA otpušta u citoplazmu stanice. Tu nastupa enzim reverzna transkriptaza koji koristi virusnu RNA za sintezu proviralne DNA ponašajući se kao DNA polimeraza i pritom se stari lanac RNA uništava. Tako nastala DNA ulazi u jezgru stanice domaćina i uz enzim integrazu se proviralna DNA ugrađuje u staničnu DNA domaćina čime se stanica ireverzibilno transformira u potencijalnog proizvođača virusa (Simon i sur., 2006). Nezreli virusi nastali na staničnoj membrani domaćina se otkidaju i ulaze u krvotok. Virus da bi bio infektivan mora proći kroz fazu maturacije gdje je najvažniji enzim HIV-proteaza koji cijepa multiproteinske molekule na funkcionalne proteine čime nastaju enzimi integraza i reverzna transkriptaza. Završno se virus koji sadrži RNA i enzime pupanjem kroz staničnu membranu oprema glikoproteinima i oslobađa iz stanice (Završnik i sur., 2005).



Slika 1. Životni ciklus HIV-a i mete lijekova

(<https://www.mdpi.com/2073-4409/10/1/174/htm>)

Danas odobreni i dostupni lijekovi za terapiju AIDS-a sprječavaju replikaciju virusa, mogu spriječiti pojavu bolesti, primjerice prijenos sa zaražene majke na dijete, te znatno smanjiti pojavnost oportunističkih infekcija i smrtnost (www.who.int).

Najveći problem anti-HIV terapije je brza mutacija virusa te nastanak rezistencije čemu se doskočilo primjenom kombinacije lijekova različitih mehanizama djelovanja, popularno nazvano HAART (highly active antiretroviral treatment) terapijom. Po mjestu djelovanja najznačajniji lijekovi se mogu podijeliti u nekoliko skupina: inhibitori reverzne transkriptaze (nukleozidni i nenukleozidni), inhibitori integraze, inhibitori proteaze, inhibitori fuzije te antagonisti CCR5 i CXCR4 receptora (Završnik i sur., 2005).

1.2. Fosamprenavir

Fosamprenavir je antiretrovirusni lijek druge generacije, inhibitor HIV-proteaze koji se koristi u kombinacijama s drugim antiretrovirusnim lijekovima kao dio HAART terapije. (Slika 2.)

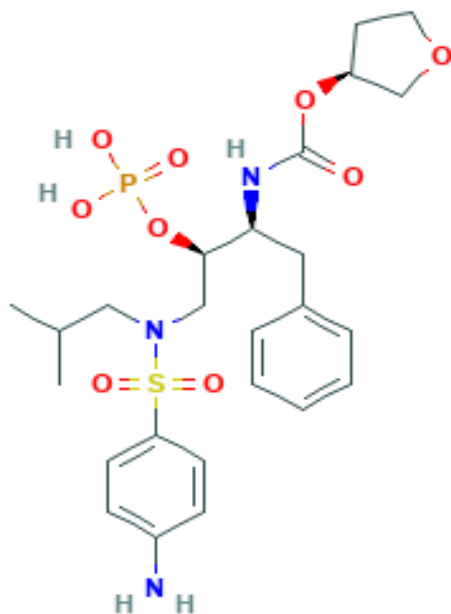
Kemijsko ime fosamprenavira po IUPAC-u je [(3S)-oksolan-3-il] N-[(2S,3R)-4-[(4-aminofenil)sulfonyl-(2-metilpropil)amino]-1-fenil-3-fosfonooksibutan-2-il]karbamat.

Molekularna formula je $C_{25}H_{36}N_3O_9PS$, a molekulska masa (M_r) iznosi 585,62 g/mol. Izgledom je bijeli prah, dobro topljiv u metanolu, etanolu, DMSO-u, DMF-u, a djelomično topljiv u vodi. Po strukturi je derivat sulfonamida i fosforilirani prolijek amprenavira koji se nakon primjene u tijelu metabolizira do njegovog aktivnog oblika i djeluje selektivno se vežući na HIV-proteazu (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Cilj formiranja prolijeka osim poboljšanja bioraspoloživosti i veće učinkovitosti zbog polaganog oslobađanja bilo je i povećanje topljivosti u vodi. Fosamprenavir *in vitro* nema dokazanu antivirusnu aktivnost, nego je ta aktivnost uočena tek *in vivo* nakon pretvorbe u aktivni oblik amprenavir djelovanjem alkalne fosfataze koja se nalazi u ili blizu intestinalnog epitela (www.ema.europa.eu).

Amprenavir je kompetitivni inhibitor enzima HIV-proteaze, sastavljenog od dvije monomerne jedinice građene od 99 aminokiselina s aspartatom u katalitičkom mjestu. Kao izoster prijelaznog stanja enzima veže se u aktivno mjesto jače od supstrata te sprječava enzimsku aktivnost odnosno cijepanje nefunkcionalnog peptida u funkcionalne proteine tj.enzime (Ghosh i sur., 2016).

Fosamprenavir je na tržištu dostupan u obliku kalcijeve soli u kombinaciji s malim količinama ritonavira, jedna filmom obložena tableta sadrži 700 mg fosamprenavir kalcija i 100 mg ritonavira, a primjenjuje se dvaput dnevno (www.ema.europa.eu).



Slika 2. Struktura fosamprenavira

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fosamprenavir#section=Structures>)

1.3. Onečišćenja u lijekovima i klasifikacija onečišćenja

Onečišćenje je bilo koja sastavnica ljekovite tvari koja nema kemijski entitet definiran kao ta ljekovita tvar. Kako su onečišćenja vrlo bitna u aspektu učinkovitosti i sigurnosti gotovog proizvoda, a njihova svojstva mogu varirati od neškodljivosti do ekstremne toksičnosti vrlo važno ih je karakterizirati i pažljivo kontrolirati.

Prema ICH Q3A smjernicama dijele se na nekoliko kategorija:

- organska onečišćenja
- anorganska onečišćenja
- ostatna otapala

Organska onečišćenja mogu nastati tijekom procesa proizvodnje i/ili skladištenja ljekovite tvari te mogu biti identificirana ili neidentificirana, hlapljiva ili nehlapljiva, a uključuju polazne sirovine, nusprodukte, međuprodukte, razgradne produkte, reagense, ligande i

katalizatore. Identificirana onečišćenja su prisutna u ljekovitoj supstanciji u količinama iznad granice za identifikaciju i zato su opisana i strukturno karakterizirana, dok su neidentificirana prisutna u manjim količinama te su definirana isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvima, a oboje se još nazivaju i specificiranim onečišćenjima. Posebno su propisane i definirane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju tih onečišćenja što je prikazano u tablici 1 (ICH Q3A). Osim specificiranih u farmakopeji postoje i druga dokaziva onečišćenja, to su teorijski moguća onečišćenja definirane strukture koja se mogu, ali ne moraju naći u količinama većim od identifikacijskog praga tijekom procesa proizvodnje i čuvanja, te se mogu detektirati metodom predloženom u Europskoj farmakopeji. Organska onečišćenja mogu se analizirati različitim tehnikama, uključujući one koje uspoređuju analitički odgovor onečišćenja u odnosu na odgovarajući referentni standard ili u odnosu na odgovor same ispitivane tvari (ICH, Q3A).

Tablica 1. Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja u ljekovitim supstancijama prema ICH smjernicama.

Maksimalna dnevna doza	Granica za izvještavanje	Granica za identifikaciju	Granica za kvalifikaciju
≤2g/dan	0,05%	0,10% ili 1.0 mg/dan (ovisno što je niže)	0,15% ili 1.0 mg/dan (ovisno što je niže)
>2g/dan	0,03%	0,05%	0,05%

Anorganska onečišćenja nastaju tijekom procesa proizvodnje, poznata su i identificirana i uključuju reagense, ligande i katalizatore, teške i druge metale, anorganske soli, te druge materijale npr. drveni ugljen.

Ostatna otapala su zaostale, hlapljive organske kemikalije koje se koriste u sintezi odnosno proizvodnji ljekovite tvari (ICH, Q3A). Prema toksičnosti i s obzirom na dozvoljenu dnevnu izloženost organizma tim otapalima dijele se na tri skupine (ICH Q3C):

1. skupina- otapala koja treba izbjegavati, poznate humane kancerogenosti, opasna za okoliš
2. skupina- otapala koja treba ograničiti, negenotoksični životinjski kancerogeni ili mogući kaustični agensi druge ireverzibilne toksičnosti kao što je neurotoksičnost ili teratogenost te reverzibilne toksičnosti (0,1 mg/dan, koncentracije 10 ppm)

3. skupina- otapala s niskom potencijalnom toksičnosti, ograničeni dnevni unos je ≤ 50 mg/dan, koncentracije 5000 ppm

Identificiraju se i kvantificiraju kromatografskim tehnikama, najčešće plinskom kromatografijom, a propisane granice ovise o toksičnosti otapala, načinu primjene i dozama farmaceutske tvari te se nalaze u ICH smjernicama, poglavlje Q3C.

1.4. Ispitivanja stabilnosti

Za ispitivanja stabilnosti u prošlosti su se koristile razne smjernice, međutim danas su od strane Japana, SAD-a i Europske unije prihvaćene smjernice koje propisuje Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkim zahtjevima za registraciju lijekova za ljudsku upotrebu (eng. International Committee for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH), a provode se u svim fazama razvoja lijeka i čine ključni kriterij prilikom odlučivanja koji je spoj kandidat najpogodniji za daljnji razvoj. Tako prema ICH smjernicama ispitivanja stabilnosti uključuju praćenje i provjeru onih karakteristika lijeka koje su podložne promjenama tijekom skladištenja te mogu utjecati na kvalitetu, sigurnost, i/ili učinkovitost lijeka (Ahuja i Scypinski, ured., 2011).

Cilj provedbe ispitivanja stabilnosti je pokazati i dokazati kako se kvaliteta lijekovite supstancije ili gotovog farmaceutskog proizvoda mijenja tijekom vremena pod utjecajem izloženosti različitim okolišnim čimbenicima poput temperature, vlažnosti i svjetla, a potom ustvrditi vrijeme kada je potrebno ponovno provjeriti kvalitetu lijekovite supstance ili koliko je dozvoljeno vrijeme skladištenja nekog gotovog proizvoda te preporučene uvjete čuvanja. Izbor uvjeta na kojima će se provesti ispitivanje je definirano i ovisi o klimatskim uvjetima te je tako svijet podijeljen na četiri klimatske zone (ICH, Q1A).

1.4.1. Prisilna razgradnja lijeka

Prisilna razgradnja lijeka (engl. stress testing ili stress studies, standardni je dio ispitivanja stabilnosti. Pomaže u identifikaciji najvjerojatnijih razgradnih produkata što uvelike doprinosi otkrivanju puta razgradnje lijeka i unutarnje stabilnosti molekule te u validaciji korištenih stabilitetno-indikativnih analitičkih postupaka. Informacije o mehanizmu razgradnje su osnova razumijevanja kako će se djelatna tvar ponašati u različitim uvjetima. Iako su putevi razgradnje puno kompleksniji na stresnim uvjetima nego na sobnoj temperaturi, raspodjela

masa razgradnih produkata daje mogućnost predviđanja koji od njih bi mogao nastati tijekom dugotrajnog skladištenja, a njihovo dobro razdvajanje je važno za razvoj i validaciju stabilitetno-indikativne metode (Ahuja i Scypinski, ured., 2011).

1.4.1.1. Uvjeti prisilne razgradnje

Ispitivanje se provodi na jednoj seriji lijekovite supstancije i uključuje provjeru utjecaja temperature (povećanje za 10 °C, npr. 50 °C, 60 °C), vlažnosti (npr. 75% RH ili više), te kada je moguće oksidacije, fotolize lijekovite supstancije i osjetljivosti na hidrolizu na različitim pH vrijednostima, a detaljniji izbor uvjeta ovisi o kemijskim svojstvima ispitivane tvari i odluci samog analitičara (ICH, Q1A).

Međutim, pitanje je kako odabrati najbolje uvjete za provedbu prisilne razgradnje lijeka, prema mnogim znanstvenicima oni bi trebali biti takvi da se aktivna tvar razgradi između 5% i 20%, ističući da bi za validaciju analitičke metode za određivanje sadržaja malih molekula idealno bilo 10%. Iako nije nužno da prisilna razgradnja rezultira razgradnim produktima, već i takav ishod je dobar pokazatelj i govori o stabilnosti lijeka (Blessy i sur., 2014).

Pretjerani uvjeti razgradnje mogu dovesti do formiranja sekundarnih razgradnih produkata koji se neće pronaći tijekom čuvanja lijeka, k tome mogu smetati nastajanju onih primarnih i vjerojatnijih, pa je stresne uvjete važno dobro podesiti i izabrati, a razlikuju se s obzirom na prirodu ispitivane tvari te njena svojstva. Neki znanstvenici imaju pristup da prvotno nastupaju s ekstremnijim uvjetima i kraćim vremenima izlaganja, pa čak i višestrukim uzorkovanjem tijekom određenih vremenskih intervala kako bi pratili stupanj razgradnje tijekom vremena i dobili bolju sliku o putu razgradnje. Dok drugi pristupaju s oprezom kao da je tvar labilna, a tek onda pogoršavaju ili ublažavaju te uvjete ovisno o ponašanju tvari kako bi dobili zadovoljavajući stupanj razgradnje. Drugi pristup je favoriziran i teži se primjeni što normalnijih uvjeta, jer kao prvo, prilikom ekstremnih uvjeta razgradnje može doći do promjene mehanizama reakcije razgradnje, a kao drugo, teže je neutralizirati korištenu veliku količinu reaktanata prije analize (Blessy i sur., 2014).

Hidroliza je najčešća kemijska reakcija razgradnje u kojoj se odvija kataliza ionizirajućih funkcionalnih skupina prisutnih u molekuli s vodom pri različitom pH. Stresni uvjeti obuhvaćaju izlaganje kiselinu ili lužini u određenim koncentracijama, uobičajeno su to

klorovodična ili sumporna kiselina (0,1-1M) i natrijev ili kalijev hidroksid (0,1-1M). Razgradnja se provodi na sobnoj temperaturi, ili ako nema razgradnje primjenjuju se više temperature (50-70 °C), ne dulje od 7 dana, a važan korak je završna neutralizacija s odgovarajućom kiselinom, bazom ili puferom da se spriječi daljnja razgradnja (Blessy i sur., 2014).

Za oksidaciju se najviše koristi vodikov peroksid, ali se mogu koristiti i drugi oksidacijski agensi kao što su metalni ioni ili inicijatori radikala (npr. azobisisobutironitril, AIBN) u odabranim koncentracijama. Razgradni produkti nastaju mehanizmom prijenosa elektrona i formiranja reaktivnih aniona i kationa, a najčešće se provodi izlaganjem tvari 0,1-3% vodikovom peroksidu pri neutralnom pH i sobnoj temperaturi, najviše 7 dana odnosno do maksimalno 20% razgradnje (Blessy i sur., 2014).

Predloženi uvjeti za ispitivanje fotostabilnosti i termalne razgradnje su opisani u ICH smjernicama. Za fotolizu se tvar obično izlaže izvoru svjetlosti koje emitira valnu duljinu u rasponu od 300 do 800 nm, te minimalno 1,2 milijun lx h i 200W h/m², a maksimalno 6 milijuna lx h. Termalna razgradnja zahtijeva najnapornije uvjete, suhe tvari i lijekovi se izlažu suhom i vlažnom zagrijavanju, a otopine i tekućine suhom zagrijavanju, obično pri višim temperaturama i kraćem vremenu, a temperature izlaganja su 40-80 °C (Blessy i sur., 2014).

1.5. Zeneth predikcija

Prvi korak kako pristupiti predviđanju mehanizama razgradnje supstancije je proučavanje dostupne literature, informacije proizvođača o lijeku ili relevantna monografija lijeka u farmakopeji gdje su opisana poznata kemijska svojstva tvari. Ako takve informacije nisu dostupne i ne postoje specifična znanja vezana za tu tvar, tada se poseže za analognim informacijama o tvarima slične osnovne strukture u kombinaciji s principima organske kemije kako bi se došlo do pretpostavke eventualnih teoretskih razgradnih puteva i produkata. Principi organske kemije se mogu i samostalno koristiti, što za rukom polazi tek vrlo vrsnom sintetičaru ili organskom kemičaru, s tim da nerijetko čak i njemu može biti teško pratiti brz razvoj toga područja i ogromnu količinu novootkrivenih informacija i spoznaja. Posebice je izazovno to sve objediniti i brzo ponuditi rješenje koje je točno i iskoristivo u praksi, stoga se uvidjela potreba i mogućnost za stvaranje računalnih *in silico* programa predviđanja (Ali i sur., 2018).

Zeneth je *in silico* sustav razvijen specifično za predviđanje puteva prisilne razgradnje lijeka i trenutno je jedini komercijalno dostupan i održavan program za tu svrhu. Kao sustav baziran na informacijama pokušava imitirati razmišljanje ljudskog mozga pri pretraživanju i povezivanju informacija te donošenju mogućeg rješenja. Predviđa puteve razgradnje molekule uzimajući u obzir njenu strukturu, korisnikove odabrane uvjete reakcije te ograničenja procesa poput broja reakcijskih koraka, mogućnost dimerizacije ili tautomerizacije. Može predvidjeti i potencijalnu razgradnju supstancije zbog interakcija s ionima i pomoćnim tvarima povećavajući mogućnost korištenja i za gotove farmaceutske proizvode, a rezultati se mogu prikazati i spremi u obliku Word, Excel dokumenata (Ali i sur., 2018). Ima mogućnost stvaranja vlastite baze podataka, pružajući informacije o kemijskoj strukturi, imenu, empirijskoj formuli i točnoj molekulskoj masi razgradnih produkata i ispitivane molekule pri zadanim uvjetima, te njenom ponašanju i putu razgradnje. Općenito, Zeneth predviđa puno više potencijalnih razgradnih produkata nego što su prisutni u praksi, iako neki produkti nastaju eksperimentalno, samo količinski nedovoljno za detekciju i identifikaciju. Međutim, opažen je značajan doprinos otkrivanju struktura nepoznatih spojeva dobivenih pikova na kromatogramu te masenom spektru (m/z) LC-MS metodom usporedbom sa softverski predviđenim strukturama (Kleinman i sur., 2014).

1.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je najsvestranija i najšire korištena tehnika za odjeljivanje i određivanje sastavnica u različitim organskim, anorganskim i biološkim materijalima, u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze (veličine 3-10 μm) noseći sastavnice uzorka. S obzirom na vrstu stacionarne faze i mehanizme odjeljivanja može se podijeliti na nekoliko tipova: razdjelnu, adsorpcijsku, kiralnu, afinitetnu, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem po veličini (Skoog i sur., 2014).

Prema razdiobi se razlikuje još i normalno-fazna te obrnuto-fazna kromatografija.

U normalno-faznoj kromatografiji zadržavanje ispitivane tvari ovisi o razdiobi između polarne stacionarne faze i nepolarne mobilne faze, i koristi se najviše za odjeljivanje neutralnih spojeva. Što su interakcije analita sa stacionarnom fazom jače, to je duže vrijeme

zadržavanja, a skraćuje se povećanjem polarnosti mobilne faze (Ahuja i Scypinski, ured., 2001).

Obrnuto-fazna kromatografija se temelji na razdiobi ispitivane tvari između nepolarne stacionarne faze i polarne mobilne faze, s tim da se analit brže eluira što je sastav mobilne faze nepolarniji. Prvi je izbor kod većine analita zbog njihove bolje topljivosti i lakše detekcije u nepolarnim otapalima, a kolone s takvom stacionarnom fazom su iskoristive, stabilne i reproducibilne (Ahuja i Scypinski, ured., 2001).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je točna, precizna i izdržljiva metoda za kvantitativnu analizu farmaceutskih tvari i gotovih proizvoda, praćenje stabilnosti aktivnih supstancija i dozirnih oblika te određivanje razgradnih produkata, praćenje oslobađanja djelatne tvari iz farmaceutskog oblika, određivanje lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i određivanje koeficijenta razdjeljenja i pK_a vrijednosti molekule (Watson, 1999).

Prednosti HPLC metode su preciznost i automatiziranost, manja mogućnost razgradnje uzorka od metode plinske kromatografije, visoka selektivnost metode s obzirom na različite kolone i detektore koji se mogu koristiti, te mogućnost analize nehlapljivih i termolabilnih tvari, anorganskih iona, makromolekula i slabo stabilnih prirodnih produkata. S druge strane ograničenja su velika potrošnja organskih otapala koja zahtijevaju pravilno zbrinjavanje, djelatne tvari prije analize se moraju ekstrahirati iz farmaceutskog oblika te je potreban razvoj pouzdanih i jeftinijih detektora za praćenje spojeva bez kromofora (Watson, 1999).

1.6.1. UPLC

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti je naprednija inačica HPLC tehnike koja koristi znatno više tlakove (1000-1500 bar), kolone sa stacionarnim fazama manjih čestica (<2,5 μm) i veće brzine protoka mobilne faze. Radi na istom principu kao HPLC, jednako je robustna i ponovljiva, ali s poboljšanom osjetljivošću, razlučivošću i brzinom analize te tako štedi vrijeme i novac. Osim toga povećana je i djelotvornost kolone povećanjem broja tavana što rezultira manjim širenjem vrpce i njihovim boljim izgledom. Moguće je odrediti manje koncentracije analita te lakše i brže optimizirati i validirati novu metodu, a manja je i potrošnja mobilne faze tj. ekološki neprihvatljivih organskih otapala jer je skraćeno vrijeme analize. Koristiti se može za iste svrhe kao i HPLC, između ostalog i za

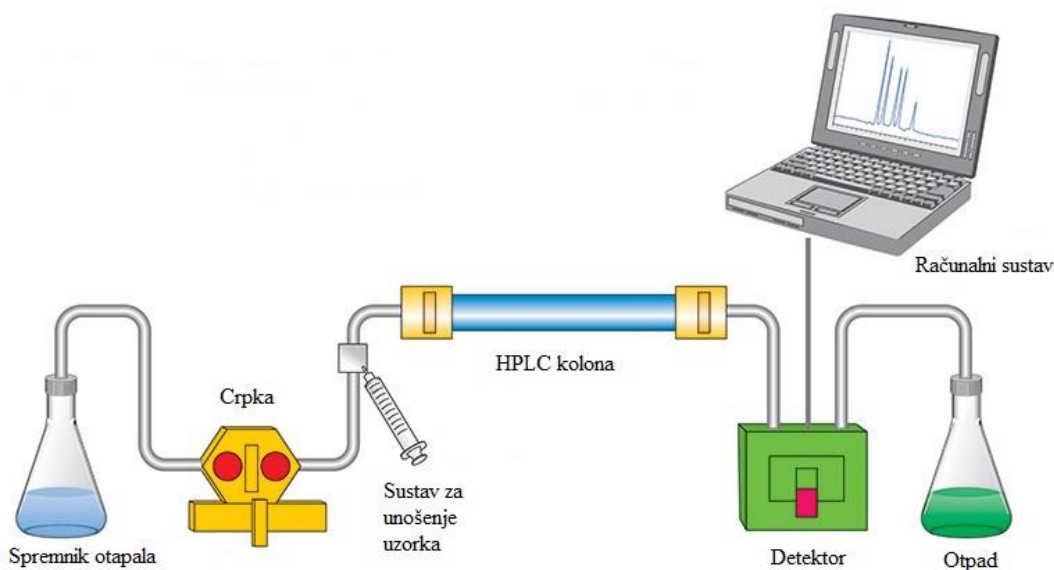
brži razvoj novih metoda, određivanje i kvantifikaciju onečišćenja, u procesnim analizama te u analizama okoliša, hrane, forenzičkim i toksikološkim analizama, a moguća je kombinacija i s drugim analitičkim tehnikama (Shaikh i Hussain, 2016).

1.6.2. Dijelovi HPLC/UPLC instrumenta

Tekućinski kromatograf se sastoji od (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007):

- Spremnika mobilne faze s jednim ili više staklenih spremnika koji sadržavaju 500 mL ili više otapala te sustava za obradu otapala koji uklanja čvrste čestice i otopljene plinove iz otapala koji utječu na radnu sposobnost detektora.
- Crpke koja omogućuje konstantan i neprekidan protok mobilne faze kroz sustav, a većina modernih crpki dopušta kontrolirano miješanje različitih otapala iz različitih spremnika.
- Sustava za unošenje uzorka koji omogućuje unošenje uzorka u mobilnu fazu prije njenog dolaska na kolonu. Većina modernih sustava za unošenje uzorka je automatizirano pa to dopušta programirano unošenje različitih volumena uzoraka.
- Kolone- čelična cijev punjena vrlo malim česticama (veličine 1-5 μ m) čvrstog poroznog materijala koji čini stacionarnu fazu i zaslužna je za odjeljivanje analita u smjesi. Može biti različitih duljina, unutarnjeg promjera i dimenzija čestica.
- Detektora- uređaj koji kontinuirano bilježi specifična fizikalna (ponekad kemijska) svojstva analita nakon prolaska kroz kolonu. Najčešće korišten je detektor s nizom fotoosjetljivih dioda (DAD, engl. diode array detector) koji prati i bilježi apsorbanciju ultraljubičastog ili vidljivog zračenja na odabranoj valnoj duljini ili rasponu valnih duljina. Zatim se još koriste maseni detektor (MS), fluorescencijski detektor (FLD), detektor raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (ELSD, engl. evaporative light scattering detector), elektrokemijski detektor (ECD) ili detektor indeksa loma (RID, engl. refractive index detection).

HPLC sustav je spojen na računalni sustav koji kontrolira sve kromatografske parametre uključujući sastav mobilne faze, temperaturu, redoslijed uzimanja uzorka, a može obraditi podatke koje dobiva preko detektora. Shematski prikaz HPLC uređaja prikazan je na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz HPLC uređaja

(<http://www.knowledge-savoir.com/chromatography-6/>)

1.7. Stabilitetno-indikativna HPLC metoda

Zahtjevi dobre proizvođačke prakse kažu da svaki lijek prije puštanja u promet mora biti ispitan stabilitetno-indikativnom metodom. Prema FDA-u, stabilitetno-indikativna metoda je validirani kvantitativni analitički postupak koji se koristi za detekciju promjene stabilnosti ljekovite supstancije ili gotovog farmaceutskog proizvoda tijekom vremena, mjereći promjenu koncentracije aktivne tvari bez međudjelovanja s drugim razgradnim produktima, onečišćenjima i pomoćnim tvarima (Blessy i sur., 2014).

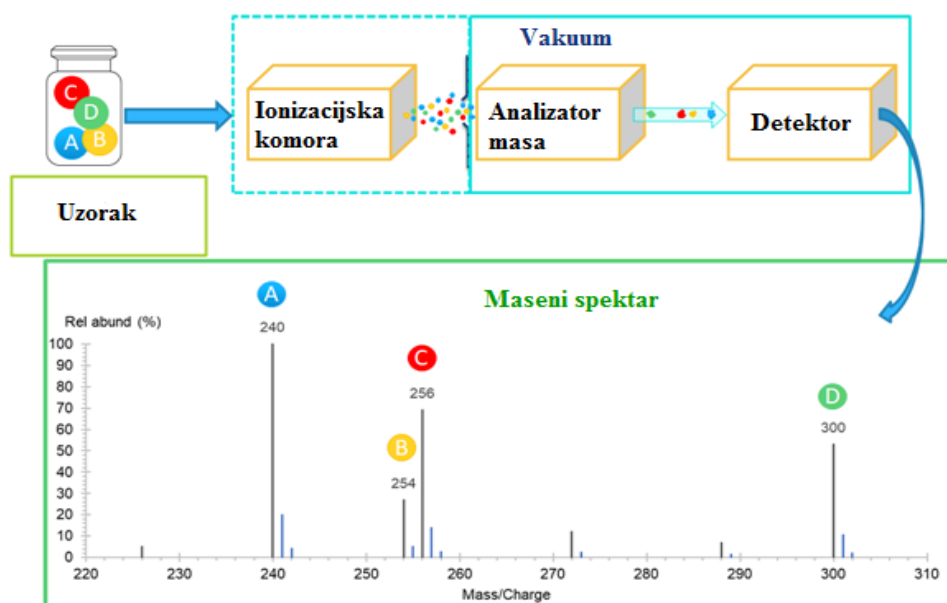
Specifičnost razvijene metode se provjerava provedbom prisilne razgradnje lijeka kada je vrlo malo poznatih informacija o potencijalnim razgradnim produktima, a razvoj odgovarajuće metode je važna karika tijekom praćenja procesa razvoja lijeka, provođenja ispitivanja stabilnosti i određivanja ispravnih uvjeta čuvanja proizvoda (Blessy i sur., 2014).

Razvijena stabilitetno-indikativna metoda mora biti validirana po ICH smjernicama te zadovoljavati validacijske parametre: selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, granicu dokazivanja, granicu određivanja i izdržljivost. Isto tako obavezno je potrebno izolirati, identificirati i kvantificirati onečišćenja koja su prisutna iznad granice za identifikaciju. Analitički postupak se revidira i validira sve dok ne zadovolji sve validacijske parametre određene zahtjevima (Blessy i sur., 2014).

1.8. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je snažna i svestrana analitička tehnika koja pruža informacije o identitetu, molekularnoj masi, elementarnom sastavu te kemijskoj strukturi nepoznate supstancije. Prema tome se može podijeliti na atomsku ili elementarnu i molekularnu masenu spektrometriju. Atomskom spektrometrijom masa se kvantitativno mogu odrediti gotovo svi elementi periodnog sustava, a molekularnom spektrometrijom masa strukture anorganskih, organskih i bioloških molekula te informacije o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu složenih smjesa spojeva (Skoog i sur., 2014).

Destruktivna je tehnika, radi po načelu ionizacije molekula ili molekulskih fragmenata u visokom vakuumu ili neposredno prije ulaska uzorka u visoki vakuum, koristeći različite tehnike ionizacije. Analit se iz čvrstog stanja mora prevesti u ionizirano plinovito stanje te se potom molekule razdvajaju po njihovoj masi primjenom električnog ili magnetskog polja (Watson, 1999).



Slika 4. Shematski prikaz spektrometra masa

(<https://sisu.ut.ee/heritage-analysis/52-mass-spectrometry>)

Maseni spektrometar je instrument različite veličine, cijene te razlučivanja, koji u visokom vakuumu ili pri atmosferskom tlaku neposredno prije ulaska u visoki vakuum ionizira

molekule, a potom ih razdvaja po vrijednosti omjera mase i naboja (m/z), detektira i prikazuje kao maseni spektar. Slika 4 shematski prikazuje da se sastoji od (Skoog i sur., 2014):

- ionizacijske komore u kojoj se mala količina analita prevodi u plinovito stanje i bombardira elektronima, fotonima, ionima ili molekulama a iz nje izlazi struja pozitivnih ili negativnih plinovitih iona (u atomskim masenim spektrometrima ionizacija se provodi dovođenjem toplinske ili električne energije)
- ubrzavajućih pločica koje ubrzavaju ione prije ulaska u analizator
- masenog analizatora koji razdvaja ione na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z)
- detektora/skupljača iona koji pretvara m/z vrijednosti iona u električni signal što računalni sustav za obradu podataka prikazuje kao maseni spektar

Masena spektrometrija je visokospecifična metoda za određivanje i potvrdu identiteta ili strukture ljekovitih tvari tijekom proizvodnje, za praćenje i karakterizaciju njihovih onečišćenja, te vrlo osjetljiva i specifična metoda za određivanje lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i tkivima u kombinaciji s kromatografskim tehnikama. Prednosti metode su uz sve gore navedene mogućnosti i male količine uzorka dovoljne za analizu, a nedostaci su rijetko korištenje u rutinskoj kontroli kakvoće i skupa instrumentalizacija koja zahtijeva posebno obrazovanog stručnjaka (Watson, 1999).

1.8.1. Ionizacija

Svojstva idealne ionizacijske komore bila bi visoka učinkovitost ionizacije i stabilnost iona, kontrola količine unutarnje energije koja se predaje molekulama kako ne bi došlo do dodatne razgradnje uzorka- te kompatibilnost s kromatografskim tehnikama, posebice HPLC-om. Postoji nekoliko najznačajnijih različitih načina ionizacije u primjeni: ionizacija djelovanjem snopa elektrona (EI, engl. Electron impact), kemijska ionizacija (CI), elektrosprej ionizacija (ESI), kemijska ionizacija kod atmosferskog tlaka (APCI, engl. Atmospheric-pressure chemical ionisation), matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI, engl. Matrix-assisted laser desorption ionisation) (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

Ionizacija djelovanjem snopa elektrona, EI

Jedna od najranije razvijenih ionizacijskih metoda gdje se molekule grijanog i plinovitog uzorka ioniziraju bombardiranjem sa snopom elektrona visoke energije (obično 70 eV). Nije primjenjiva kod nehlapljivih i nestabilnih uzoraka zbog toga što velika energija elektrona uzrokuje pucanje veza u analitu i snažnu fragmentaciju na manje ione, stoga je molekulski ion često slabo izražen. Ioni mogu izgubiti samo jedan radikal, ali i više neutralnih fragmenata (Watson, 1999).

Kemijska ionizacija, CI

U kemijskoj ionizaciji snopom elektrona se ioniziraju molekule inertnog plina stvarajući ione koji potiču ionizaciju molekula uzorka pri čemu nastaju pozitivni ili negativni ioni. Molekulski ion je prisutan u masenom spektru većinom u obliku adukta ili samostalno jer je fragmentacija značajno manja, a budući da ona ovisi o inertnom plinu potreban je njegov pažljiv odabir, a najčešće se koriste metan, amonijak i izobutan (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

Elektrosprej ionizacija, ESI

Elektrosprej ionizacija je danas najčešće korištena metoda ionizacije zbog kompatibilnosti s tekućinskom kromatografijom. Uzorak se ionizira i raspršuje u male kapljice prolaskom kroz kapilaru čiji je kraj na visokom potencijalu (4–5 kV). Ionizirani aerosol se stvara pri atmosferskom tlaku i otapalo se u velikoj većini uklanja strujom dušika, a nabijene molekule dalje putuju u maseni spektrometar. Osjetljiva je i blaga metoda ionizacije zbog čega spektar može biti jednostavan i sadržavati samo molekulski ion ili eventualna fragmentacija može biti potaknuta korištenjem različitih potencijala (Watson, 1999). Moguća je analiza makromolekula zbog formiranja višestruko nabijenih iona proteina/peptida, ali i malih molekula s tim da je pogodnija za polarne molekule (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

Kemijska ionizacija kod atmosferskog tlaka, APCI

Vrlo slična ESI i CI, pri atmosferskom tlaku se otopina uzorka raspršuje u struji dušika, a na visokoj temperaturi od 400-500 °C otapalo isparava s minimalnom razgradnjom uzorka.

Izbijajuća igla (potencijal 3-5kV) je odgovorna za proizvodnju naboja i inicijaciju ionizacije otapala, a tako stvoreni ioni reagiraju s molekulama analita koje su u plinovitoj fazi i ioniziraju ih. Budući da je ionizacija odvojena od isparavanja otapala za razliku od ESI, mogu se koristiti i otapala nepovoljna za stvaranje iona, ali isto tako i nema mogućnost višestrukog nabijanja makromolekula, pa je dobiveni rezultat direktno povezan s realnom količinom analita. Pogodna je za spajanje s HPLC-om te analizu hlapljivih ili djelomično hlapljivih spojeva, manjih i termostabilnih molekula (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

Matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom, MALDI

Široko korištena, superosjetljiva ionizacijska metoda u spektrometriji masa biomolekula, idealna je za karakterizaciju i određivanje molekulske mase velikih proteina. Uzorak je otopljen u matriksu koji apsorbira UV ili IR zračenje te zajedno s matriksom kristalizira nakon otparavanja otapala. Potom se ionizira kratkim laserskim pulsom jakog inteziteta i ioni se odvajaju od matriksa i ubrzavaju u električnom polju nakon čega u polju bez naboja lakši ioni putuju brže. Molekulska masa se određuje s obzirom na vrijeme potrebno molekulama da dođu do detektora (Watson, 1999).

1.8.2. Ionska separacija

Glavna funkcija analizatora masa je mjeriti vrijednosti omjera mase i naboja (m/z) te na osnovu toga provesti razdvajanje iona, a princip njihovog rada ovisi o interakcijama nabijenih čestica s električnim ili magnetskim poljem. Najčešće korišteni su magnetski analizator, kvadrupolni analizator masa, stupica iona analizator, analizator vremena leta (TOF, engl. Time of flight), analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama (FC-ICR, engl. Fourier transform ion cyclotron resonance). Kombinacijom različitih analizatora masa stvara se tandemska masena spektroskopija (MS/MS), znana i pod nazivom trostruki kvadrupol, koja se koristi za strukturnu karakterizaciju spojeva (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

Magnetski analizator

Nakon ionizacije ioni dolaze i ubrzavaju se u električnom polju jakosti 3-8 kV kako bi imali određenu kinetičku energiju prije ulaska u magnetsko polje. Prolaskom kroz polje dobivaju

otklon ovisno o njihovom omjeru mase i naboja, a pri tome veće molekule se teže otklanjaju, odnosno veličina otklona je obrnuto proporcionalna masi iona što je opisano formulom:

$$m/z = \frac{H^2 r^2}{2V}$$

H- jakost magnetskog polja

r- radijus puta u kojem ion putuje

V- napon ubrzavanja

Na određenim vrijednostima *H* i *V*, pojedini ioni određene mase nemaju otklona i ne mogu doći do detektora, stoga je važno da jakost magnetskog polja bude promjenjiva kako bi svi ioni različitih masa bili detektirani. Druga mogućnost je mijenjati napon ubrzavanja pri konstantnoj jakosti magnetskog polja kako bi se ioni razdvojili po svojim kinetičkim energijama i tako detektirali (Watson, 1999).

Kvadrupolni analizator

Jeftiniji i osjetljiviji analizator s 4 elektrode koji koristi dva električna polja postavljena pod točno određenim kutom od 180° pri čemu jedno oscilira rezonantnom frekvencijom za svaku *m/z* vrijednost. Ioni koji rezoniraju na frekvenciji kvadrupola mogu proći kroz njega do detektora, a ostali dotiču elektrode i postaju neutralne molekule. Mijenjajući frekvenciju kvadrupola mogu se odabrati ioni određenog omjera mase i naboja koji mogu doći do detektora (Watson, 1999).

Stupica iona (Ion trap) analizator

Trodimenzionalni analog kvadrupolnog analizatora, ioni ulaze u električno polje sastavljeno od tri elektrode s prstenastom elektrodom u sredini gdje se ioni nađu uhvaćeni u stupicu i kruže. Nakon primjene električnog polja određene jakosti stabilna putanja iona kroz stupicu je potpomognuta helijem koji uklanja kinetičku energiju sudarom s ionima što im omogućuje da izađu iz stupice kroz središnji dio i tako izbačeni dođu do detektora (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

Analizator vremena leta (TOF)

U analizatoru vremena leta ioni se najprije ubrzavaju u električnom polju poznate jakosti, a zatim slobodno putuju u dugoj cijevi do detektora. Mjeri se vrijeme leta iona do detektora koje je direktno ovisno o omjeru mase i naboja iona te proporcionalno masi molekule, odnosno teži ioni trebaju više vremena da stignu do detektora, a lakši putuju kraće. Analizatori TOF su prikladni za analizu iona velike molekulske mase, a mogu imati ugrađeno ionsko ogledalo (engl. reflectron, ion mirror) koje omogućava da ioni istih masa, a različitih kinetičkih energija istovremeno dođu do detektora tako što odbija ione i šalje ih u suprotnom smjeru te im produljuje put koji prolaze do detektora i povećava razlučivanje instrumenta (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

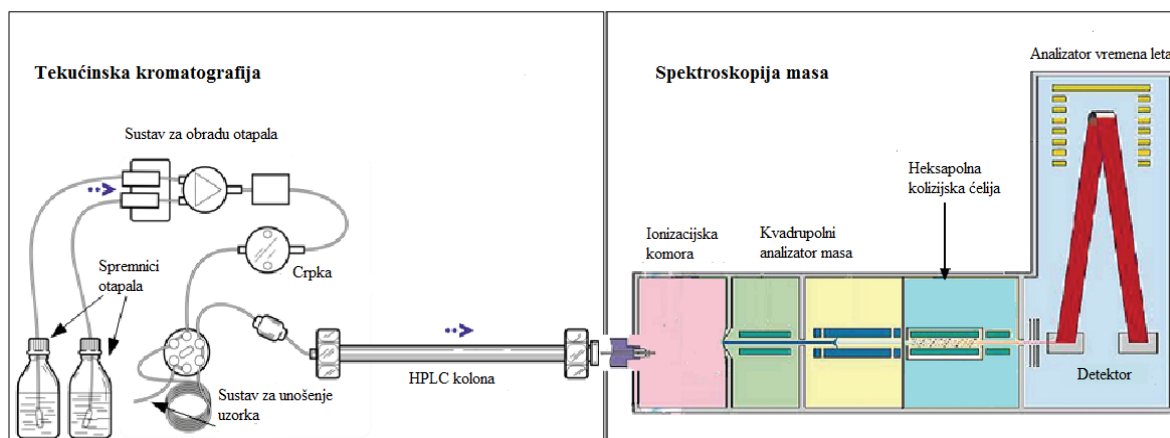
Tandemska masena spektroskopija (MS/MS)

U tipičnoj MS/MS tehnici koriste se dva analizatora masa, prvi se koristi za odabir iona od interesa (obično se naziva ion prekursor) koji se onda izlaže fragmentaciji u kolizijskoj ćeliji pri čemu nastaju ioni produkti koji dalje odlaze u drugi analizator gdje se analiziraju. Fragmentacija se najčešće postiže sudarom molekuskog iona s atomima argona u kolizijskoj ćeliji. Tandemska masena spektrometrija pruža važne informacije u analizi fragmentacije molekuskog iona te rasvjetljavanje njegove strukture i molekulske mase (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).

Q-TOF

Primjer najčešće korištenog MS ili MS/MS sustava današnjice je Q-TOF gdje je uspješno kombiniran kvadrupolni analizator i analizator vremena leta s APCI i ESI tehnikama ionizacije. Snažan je i robustan instrument, visoke osjetljivosti, razlučivosti i točnosti, shematski prikazan na slici 5 u kombinaciji s HPLC-om. Najlakše ga je opisati kao trostruki kvadrupol, gdje je zadnji kvadrupol zamijenjen TOF analizatorom. Prvi kvadrupol se nastavlja na ionizacijsku komoru, a služi za smirivanje kolizije i usmjeravanje iona te u MS/MS tehnici ima ulogu filtera masa, tako što propušta i ubrzava ion od interesa prije ulaska u drugi kvadrupol (ili heksapol), takozvanu kolizijsku ćeliju gdje se ion podvrgava fragmentaciji s neutralnim molekulama plina. Tako nastali fragmenti potom odlaze u TOF i

svi se istovremeno analiziraju što je također prednost ove tehnike (Kazakevich i LoBrutto, ured., 2007).



Slika 5. Shematski prikaz LC-MS sustava s Q-TOF analizatorom

(<https://www.semanticscholar.org/paper/Computational-Analysis-of-LC-MS%2FMS-Data-for-Zhou/abc1cc1807bcc922f3a2a1d143d7e5e5baa1008b/figure/2>)

1.9. LC-MS

Nakon što su pojedinačne tehnike dovoljno razvijene te su uočeni njihovi nedostaci i ograničenja, javila se ideja za spajanjem pojedinih tehnika i iskorištavanjem prednosti koje svaka od njih sa sobom nosi. Stoga danas imamo spregnutu tehniku LC-MS koja je pogodna za analizu velikih, polarnih, termolabilnih i nehlapljivih spojeva s visokom selektivnošću i osjetljivošću pri čemu ima mogućnost izoliranja i praćenja pikova na odabranoj masi te tako postaje i fingerprint analitička tehnika (www.agilent.com). Identifikacija i kvantifikacija metabolita lijekova važna je za razumijevanje metabolizma gotovog lijeka te ispitivanje farmakokinetičkih svojstava lijeka (Parasuraman i sur., 2014).

U procesu razvoja farmaceutskog proizvoda korisno je što LC-MS daje mogućnost strukturne karakterizacije analita, određivanja njegove molekularne mase, ali i kvalitativnu analizu, a osim toga velika je prednost što se tom tehnikom mogu analizirati i spojevi koji nemaju kromofore u svojoj strukturi. Maseni detektor spregnut s drugim LC detektorom primjerice DAD je učinkovitiji jer daje ogromnu količinu informacija za nedvojbenu potvrdu i identifikaciju pri niskim granicama dokazivanja uz provjeru čistoće pikova (www.agilent.com).

Međutim, nije bilo lako spojiti ove dvije tehnike budući da svaka ima svoje specifičnosti i zahtjeve pri kojima funkcionira, primjerice tekućinska kromatografija koristi velike protoke otapala koje se zatim mora pretvoriti u plinovito stanje pri čemu dolazi do njegove velike ekspanzije, a protok plina u masenom detektoru je puno manji od toga, pa se moralo nekako doskočiti odvođenju viška otapala. Također temperatura pri masenoj detekciji je puno veća, preferira hlapljive pufere te postoji ograničenje u rasponu masa koje se mogu detektirati, dok niti jedno od ovoga nije slučaj u tekućinskoj kromatografiji koja je mnogo fleksibilnija u tim aspektima i koristi anorganske pufere. Svemu tome se doskočilo primjenom različitih vrsta ionizacija od čega su najčešće korištene ESI i APCI (www.agilent.com).

Tipični LC-MS se sastoji od masenog spektrometra i HPLC uređaja. Nakon odjeljivanja uzorka na LC-u, čestice dolaze do mjesta ionizacije gdje se pretvaraju u ione u plinovitom stanju i ulaze u analizator masa. Tamo se raspoređuju ovisno o svojoj masi i omjeru naboja te odlaze u detektor koji broji te ione na izlasku iz analizatora i pretvara u signal. Rezultat se iskazuje masenim spektrom prikazan kao vrijednost omjera mase i naboja (m/z), te na temelju toga se može zaključiti o prirodi analiziranog spoja, njegovoj molekularnoj masi i strukturi koristeći dostupnu bazu podataka (Parasuraman i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tema ovog diplomskog rada je prisilna razgradnja fosamprenavira i analiza razgradnih produkata tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa. Iako su potpuna fragmentacija fosamprenavira, putevi razgradnje i onečišćenja opisani u literaturi (Singh i sur., 2019), cilj ovog rada bio je analizirati razgradne produkte fosamprenavira vrlo brzom stabilitetno-indikativnom metodom u kombinaciji sa spektrometrijom masa te rasvijetliti njihove strukture i mehanizme nastanka uz pomoć predviđanja sa Zeneth *in silico* računalnim sustavom.

Zeneth predikcija kao skup svih dostupnih znanja daje odlične informacije ne tako iskusnom analitičaru na kojim mjestima dolazi do pucanja veza kako bi što lakše zaključio o mehanizmu razgradnje ispitivane supstancije, zatim koje molekulske mase može očekivati u masenom spektru uz prikaz pripadajućih struktura, što štedi vrijeme analize i doprinosi nedvojbenoj potvrdi produkata razgradnje koji su najvjerojatniji da će nastati tijekom skladištenja gotovog proizvoda. Iako je u literaturi poznat detaljan mehanizam razgradnje fosamprenavira, ovdje nastali razgradni produkti ipak daju realniji prikaz promjena koje se događaju s djelatnom tvari tijekom primjene i čuvanja lijeka, a praćene su kraćom i jednostavnijom analitičkom metodom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

U izradi ovog diplomskog rada korišten je standard ljekovite supstancije fosamprenavir kalcija (engl. Active pharmaceutical ingredient; API): Fosamprenavir kalcij, Pliva, 2017.

Ostale korištene kemikalije su:

- Metanol- J.T.Baker, Phillipsburg, SAD, kromatografski stupanj čistoće
- Acetonitril- Biosolve, Nizozemska, stupanj čistoće za masenu spektroskopiju
- 30 %-tni H₂O₂- Merck, Darmstadt, Germany
- HCl min. 36,5 %- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NaOH- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Amonijev formijat- Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Amonijev acetat- Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- HCOOH- Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- CH₃COOH- Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Korištena voda je ultra visoke čistoće (Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System, Merck).

3.2. Radni instrumenti

Kako bi se opisala prisilna razgradnja fosamprenavira korišteni su sljedeći instrumenti:

- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan s detektorom s nizom fotoosjetljivih dioda (UHPLC-DAD) - za provjeru uvjeta razgradnje
- tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa (UHPLC-QTOF) - za strukturnu karakterizaciju onečišćenja

Za obradu kromatograma dobivenih tekućinskom kromatografijom korišten je programski paket Empower 2 (Waters, Velika Britanija), a za masene spektre upotrijebljen je programski paket Masshunter (Agilent Technologies, SAD). Za predviđanje struktura razgradnih produkata korišten je računalni program Zeneth (Lhasa Limited, Velika Britanija), a strukture su nacrtane u programu Chemdraw.

Uzorci su vagani na mikro vagi Mettler Toledo tip XPR2U minimalne odvage 0,3 mg i maksimalne 2,1 g. Za pripremu pufera odgovarajućeg pH kao mobilne faze korišten je Mettler Toledo SevenExcellence pH metar.

3.2.1. UHPLC-DAD

Ispitivanja provjere uvjeta prisilne razgradnje provedena su na tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies) koji se sastoji od binarne pumpe Agilent 1290 Infinity II High Speed Pump, sustava za automatsko unošenje uzorka Agilent 1290 Infinity II Multisampler, grijača odjeljka za kolonu Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat i detektora Agilent 1290 Infinity II Diode Array Detector.

3.2.2. UHPLC-QTOF

Ispitivanja karakterizacije onečišćenja su provedena na tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies) koji se sastoji od kvarterne pumpe Agilent 1290 Infinity Quaternary Pump, sustava za automatsko unošenje uzorka Agilent 1290 Infinity Autosampler, grijača odjeljka za kolonu Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment i detektora Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector.

Masena spektroskopija je provedena na instrumentu Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS. Izvor elektrona (engl. Ion Source) instrumenta je Dual Ion Source AIS ESI.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema otopine pufera

U UHPLC analizi kao mobilna faza su korišteni pufer (otapalo A) i acetonitril (otapalo B). Za analize su pripremljena dva pufera iste pH vrijednosti, korištene su jedino različite amonijeve soli zbog toga što maseni spektrometar ima posebne zahtjeve za odabir mobilne faze. Prvi pufer ($c = 5 \text{ mmol/L}$) za UHPLC-DAD instrument pripremljen je tako da se odvaže 0,39 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, otopi u ultračistoj vodi nadopunjavanjem do ukupnog volumena od 1L, te se pH-vrijednost korigira dodatkom nekoliko kapi octene kiseline kako bi se postigao željeni pH 4. Drugi pufer ($c = 5 \text{ mmol/L}$) za MS analizu se priprema vaganjem 0,315 g NH_4COOH i

otapanjem u ultračistoj vodi do ukupnog volumena od 1 L, s korekcijom pH-vrijednosti pomoću mravlje kiseline do pH 4.

3.3.2. UHPLC analiza

Za ovu analizu razgradnih produkata korištena je novorazvijena metoda čiji su parametri: protok 0,5 ml/min, temperatura kolone namještena na 50 °C, dok je temperatura na kojoj se čuvaju uzorci namještena na 15 °C. Korištena kolona je EclipsePlusC18 RRHD, Agilent, dimenzije 2,1 x 50 mm i veličine čestica 1,8 µm. Kao mobilna faza su korišteni acetatni/formijatni pufer pH 4 i acetonitril čiji se sastav mijenja tijekom vremena kako je prikazano u tablici 2. Gradijentno vrijeme je 3 minute, dok je ukupno vrijeme trajanja analize 5 minuta.

Tablica 2. Prikaz sastava mobilne faze korištene gradijentne metode elucije

t/min	pufer (otapalo A)/%	acetonitril (otapalo B)/%
0,00	95,00	5,00
1,30	65,00	35,00
3,00	5,00	95,00
3,01	95,00	5,00
5,00	95,00	5,00

3.3.3. Priprema uzoraka fosamprenavira za ispitivanja prisilne razgradnje

Uzorci standarda fosamprenavira su svi pripremljeni na isti način i u jednakoj koncentraciji od 1 mg/mL vaganjem 5 mg fosamprenavira u odmjernu tikvicu od 5 mL. Kao diluent je korištena smjesa metanola i ultračiste vode u volumnom omjeru 50:50, a otapanje uzorka je poboljšano korištenjem ultrazvučne kupelji u trajanju od 5 minuta i vorteks miješalice te je ovako pripremljena otopina korištena kao slijepa proba pri provedbi prisilne razgradnje fosamprenavira. UV spektri tih uzoraka su snimani na valnoj duljini od 265 nm.

3.3.3.1. Kisela/bazična razgradnja

Kisela razgradnja uzorka provedena je tako što je uzorak najprije odvagano u odmjernu tikvicu, a zatim u nju dodan 1 mL diluenta i 1 mL 1 M HCl, što je potom stavljeno grijati 1 sat na ultrazvučnu kupelj prethodno ugrijanu na 80 °C. Nakon proteklog vremena razgradnja se zaustavlja neutralizacijom s 1 mL 1 M otopine NaOH te tikvica nadopuni diluentom do oznake. Ovakvi uvjeti razgradnje su bili preblagi stoga je za analizu razgradnih produkata masenom spektroskopijom postupak ponovljen uz razliku što je tada korištena 5 puta veća koncentracija, odnosno 5 M HCl za razgradnju i 5 M NaOH za neutralizaciju.

Postupak bazične razgradnje se temelji na istim postupcima i principima kao i kisela s razlikom u tome što se uz 1 mL diluenta ovaj put dodaje 1 mL 1 M NaOH, a nakon 1 sat zagrijavanja se neutralizira s 1 mL 1 M HCl te nadopuni diluentom do oznake. Također je za analizu razgradnih produkata masenom spektroskopijom provedena razgradnja s 5 puta većom koncentracijom NaOH i HCl, kao i kod kisele razgradnje.

Prije postupka razgradnje, iz dostupne koncentrirane klorovodične kiseline razrjeđivanjem se treba pripremiti 1 M otopina tako da se pipetira 8,32 mL konc. HCl u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake, a za 5 M otopinu se pipetira 41,62 mL. Isto tako potrebna je priprema 1 M otopine NaOH, vaganjem 4 g krutog natrijevog hidroksida u odmjernu tikvicu od 100 mL i otapanjem u ultračistoj vodi koja se doda do oznake, što odgovara vaganju 20 g krutog natrijevog hidroksida za pripremu 100 mL 5 M NaOH.

3.3.3.2. Oksidacijska razgradnja

Oksidacija uzorka je provedena tako što je nakon vaganja uzorka u odmjernu tikvicu dodano 1 mL diluenta te 1 mL 30 %-tnog H₂O₂ te potom ostavljeno stajati 30 minuta na sobnoj temperaturi. Neutralizacija i zaustavljanje reakcije se provodi nadopunjavanjem diluentom do oznake. Za analizu razgradnih produkata masenom spektroskopijom uvjeti razgradnje su malo pojačani tako što je razgradnja provedena dodatkom jednakog volumena 30 %-tnog H₂O₂ i zagrijavanjem uzorka pri 80 °C na prethodno ugrijanoj ultrazvučnoj kupelji sat vremena nakon čega je reakcija zaustavljena nadopunjavanjem tikvice diluentom.

3.3.3.3. Toplinska razgradnja

Toplinska razgradnja je provedena na dva načina. Prvi je klasično zagrijavanje odmjerne tikvice s otopljenim uzorkom određene koncentracije 1 sat na termostatiranoj ultrazvučnoj kupelji pri 80 °C. Drugi način na koji je provedena razgradnja je da se uzorak u Petrijevoj zdjelici ostavi 48 sati u sušioniku na 105 °C te nakon toga pripremi za analizu na gore opisan način.

3.3.3.4. Fotolitička razgradnja

Fotolitička razgradnja uzorka ispitana je izlaganjem uzorka u kvarcnoj posudici UV-A (200 Whm⁻²) i vidljivom (1,2x10⁶ lux h) zračenju. Za provođenje eksperimenta korišten je uređaj Atlas Suntest XLS+ opremljen ksenonskom lampom kao izvorom umjetne Sunčeve svjetlosti. Intenzitet svjetiljke održavan je na 500 W m⁻², a temperatura na (25±2) °C. Uzorak je potom pripremljen na jednak način kao što je to prethodno opisano i analiziran.

3.3.4. MS analiza

Parametri MS analize su prikazani u tablici 3, a parametri *Scan Source parameters* su prikazani u tablici 4. Izvor iona je Dual AIS ESI i svi ioni su snimljeni u pozitivnom načinu snimanja.

Tablica 3. Parametri metode korištene u masenoj spektroskopiji

Parametar	Vrijednost
Temperatura plina (°C)	200
Protok plina (l/min)	14
Nebulizer (psig)	35
Sheath Gas Temp (°C)	350
Sheath Gas Flow (l/min)	11

Tablica 4. Parametri *Scan Source parameters*

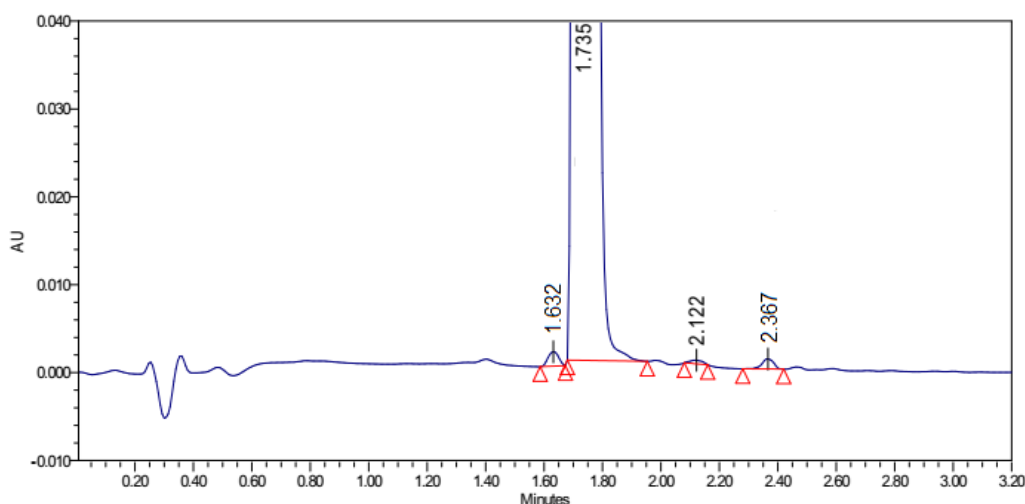
Parametar	Vrijednost
Vcap	3000
Nozzle Voltage (V)	1000
Fragmentor	175
Oct 1 RF Vpp	750

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Provjera uvjeta razgradnje pomoću UHPLC tehnike

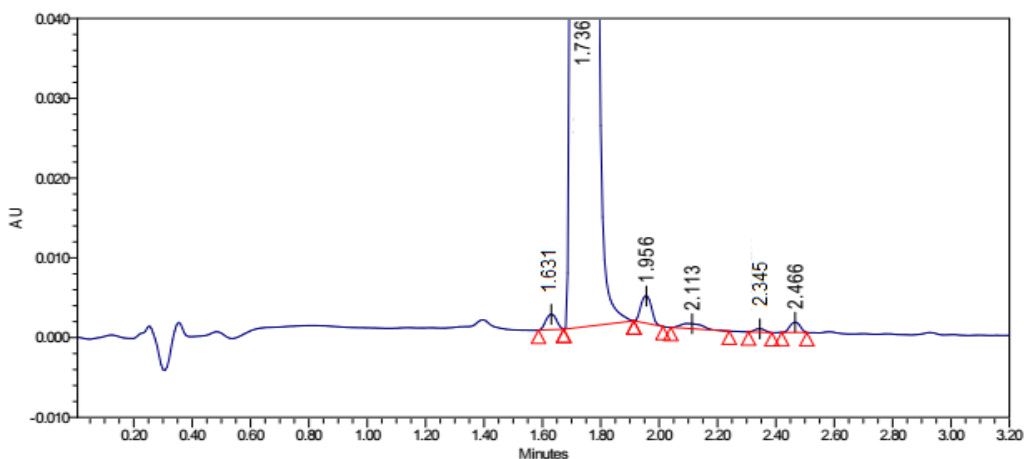
Prije analize masenom spektroskopijom, uzorak je podvrgnut prisilnoj razgradnji i analiziran tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti kako bi se provjerili uvjeti razgradnje. Prema tim dobivenim rezultatima vidjelo se jesu li uvjeti pretjerani ili uopće nije došlo do razgradnje te su se optimirali do onih koji će dovesti do zadovoljavajućeg stupnja razgradnje i formiranja razgradnih produkata.

Dobiveni rezultati, odnosno kromatogrami, su se uspoređivali s kromatogramom netretiranog fosamprenavira koji je također snimljen i prikazan na slici 6. Slika prikazuje pikove tri onečišćenja prisutna u uzorku te glavni pik s vremenom zadržavanja 1,735 minute koji odgovara fosamprenaviru.

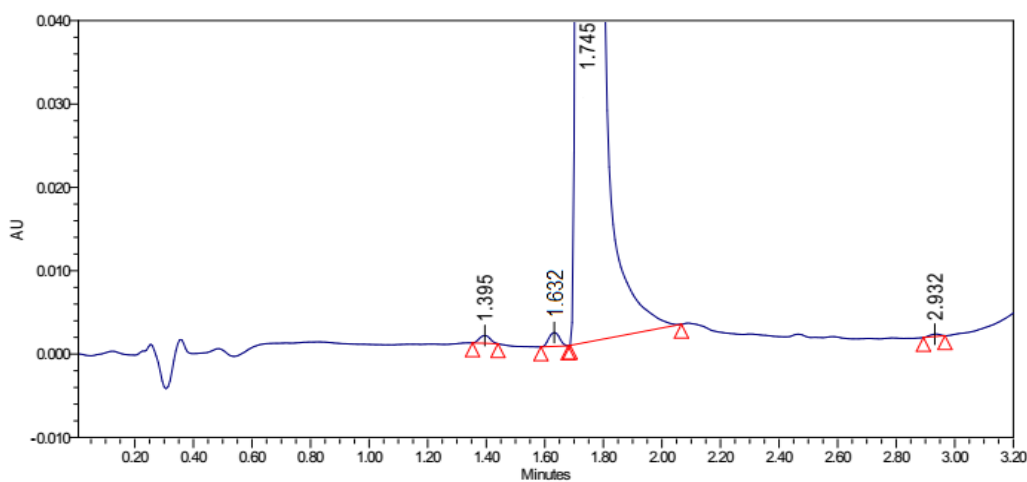


Slika 6. Kromatogram nerazgrađenog uzorka fosamprenavira snimljen tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

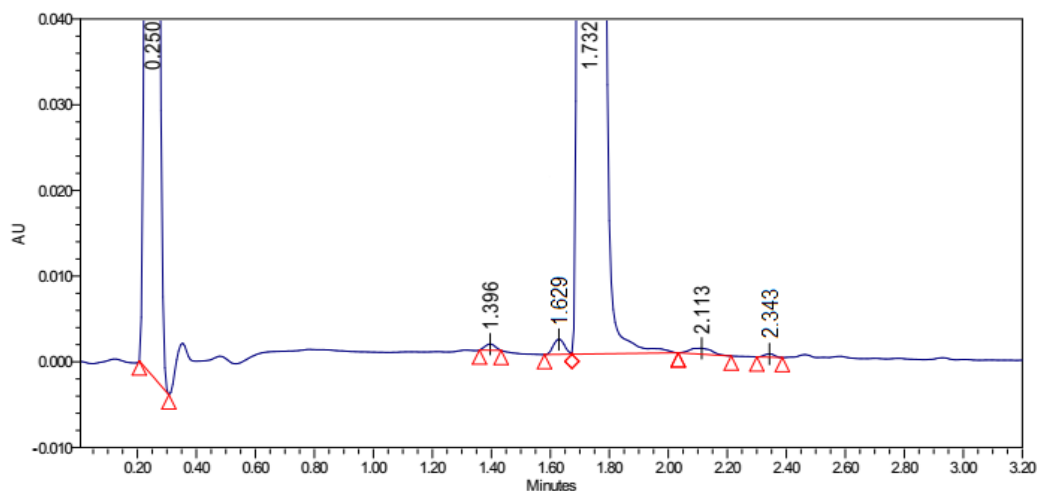
Slike 7, 8, 9, 10, 11 i 12 prikazuju kromatograme uzoraka koji su snimljeni nakon što su podvrgnuti prisilnoj razgradnji pomoću HCl, NaOH, H₂O₂, topline te svjetlosti.



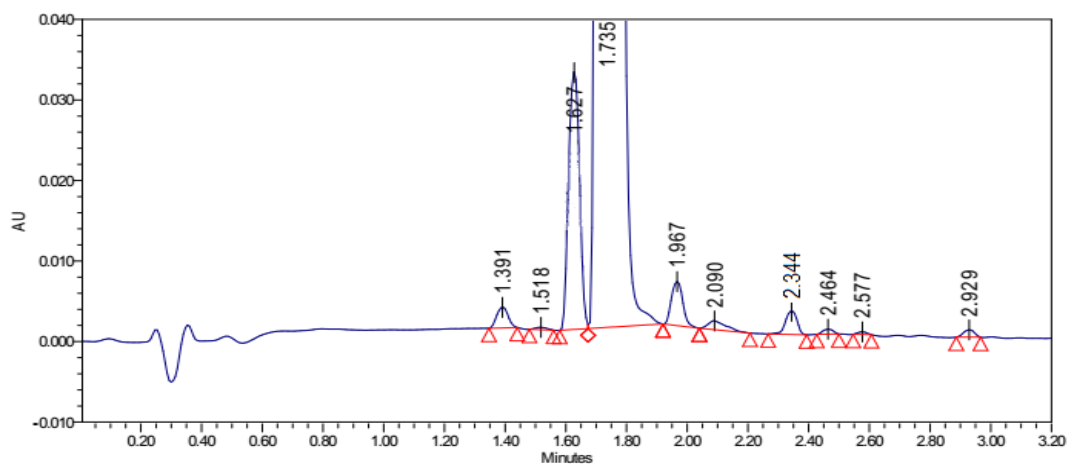
Slika 7. Kromatogram fosamprenavira razgrađenog u 1 M HCl snimljen tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.



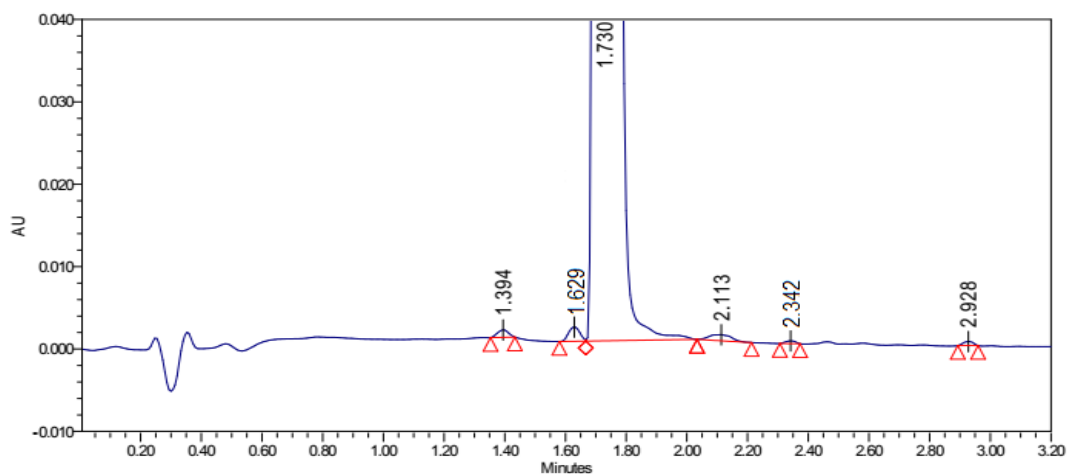
Slika 8. Kromatogram fosamprenavira razgrađenog u 1 M NaOH snimljen tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.



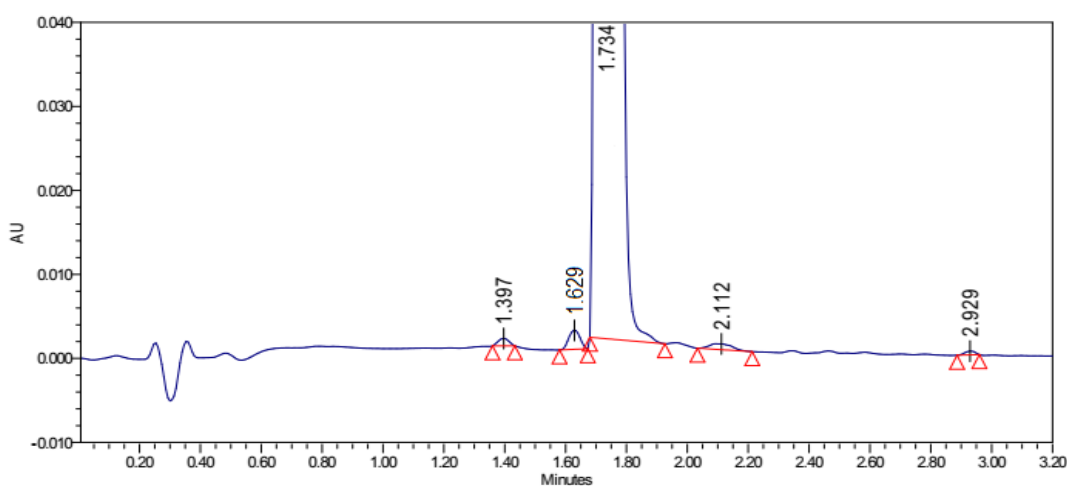
Slika 9. Kromatogram fosamprenavira razgrađenog u 30 %-tnim H₂O₂ snimljen tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.



Slika 10. Kromatogram fosamprenavira razgrađenog pod utjecajem topline tijekom 48 sati snimljen tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.



Slika 11. Kromatogram fosamprenavira razgrađenog termalnom razgradnjom pri 80 °C tijekom jednog sata snimljen tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

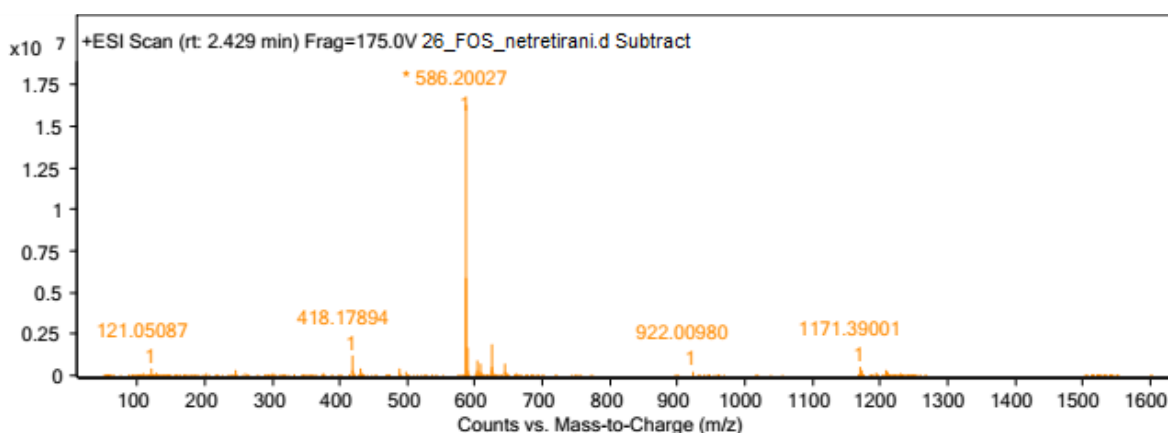


Slika 12. Kromatogram fosamprenavira razgrađenog fotolizom snimljen tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

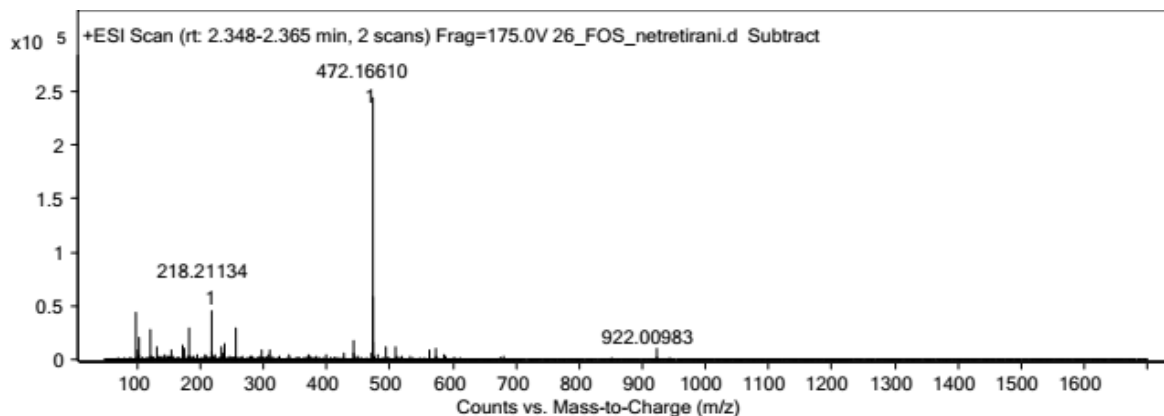
Pod ovakvim uvjetima su u prosjeku nastala dva nova onečišćenja, dok ih je najviše nastalo termalnom razgradnjom. Najveći pik s vremenom zadržavanja oko 1,7 minute (1,736 min za HCl, 1,745 min za NaOH, 1,732 za H₂O₂ itd.) odgovara fosamprenaviru. Ostali pikovi odgovaraju onečišćenjima nastalim tijekom prisilne razgradnje čime je potvrđena razgradnja uzorka pri tim uvjetima što je i bio cilj ove analize, ali je i zaključeno da se trebaju primijeniti nešto jači uvjeti razgradnje kako bi se uzorak razgradio u zadovoljavajućem postotku.

4.2. MS analiza uzorka fosamprenavira

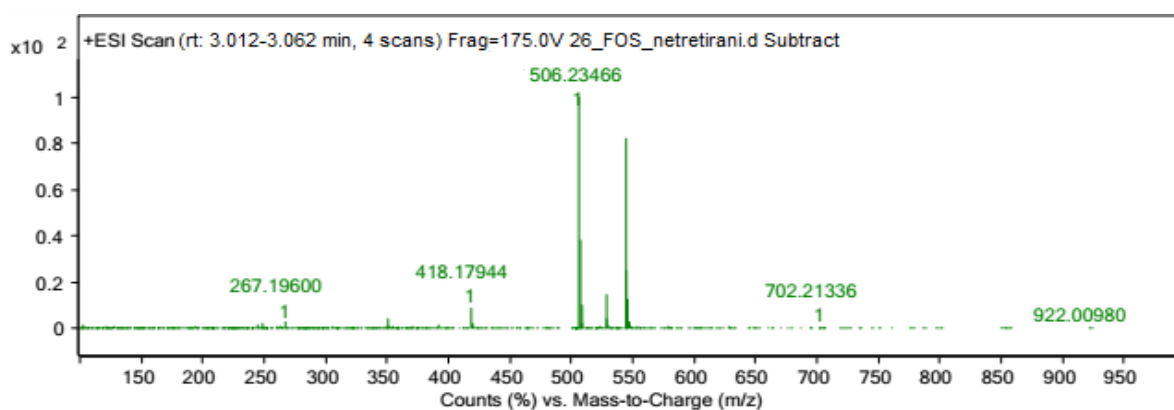
Nakon provjere odgovarajućih uvjeta razgradnje tekućinskom kromatografijom, cjelokupan sustav je prebačen na tekućinski kromatograf koji je povezan s masenim spektrometrom kako bi se odredile mase i identificirali razgradni produkti. Najprije je snimljen maseni spektar standarda fosamprenavira u koncentraciji od 0,005 mg/ml čime je potvrđena masa i da se radi upravo o tom kemijskom spoju što je prikazano na slici 13. Pomoću toga je i podešena metoda za MS analizu na način da glavni pik fosamprenavira, zbog njegove prevelike koncentracije u uzorcima koja mora biti takva da razgradni produkti koji u malim količinama nastaju budu vidljivi, ne odlazi u maseni spektrometar kod snimanja uzoraka podvrgnutih razgradnji kako se instrument ne bi onečistio i izgubio osjetljivost. Potom je snimljen netretirani uzorak fosamprenavira u kojem su pronađena 2 pika onečišćenja, maseni spektri tih onečišćenja su prikazana na slici 14 i 15. Slika 14 prikazuje onečišćenje s vremenom zadržavanja 2,266 minuta, a masa kojoj odgovara taj pik je 472,17, a slika 15 onečišćenje s vremenom zadržavanja 2,980 minuta kojemu odgovara masa 506,23.



Slika 13. Maseni spektar i potvrda mase fosamprenavira



Slika 14. Maseni spektar onečišćenja s vremenom zadržavanja 2,266 minuta



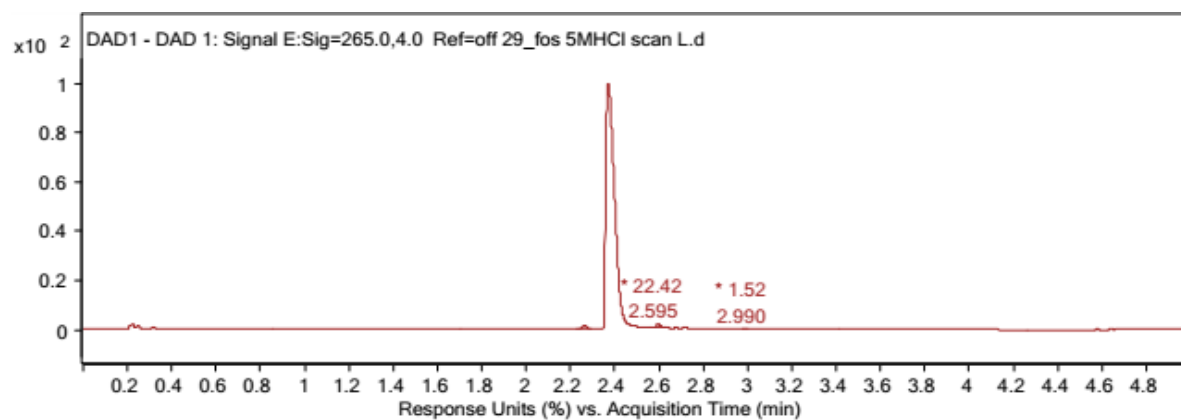
Slika 15. Maseni spektar onečišćenja s vremenom zadržavanja 2,980 minuta

Ova onečišćenja su prisutna u netretiranom uzorku te u svim razgrađenim uzorcima gdje su pri nekim uvjetima još dodatno nastali razgradnjom ili se sami razgradili.

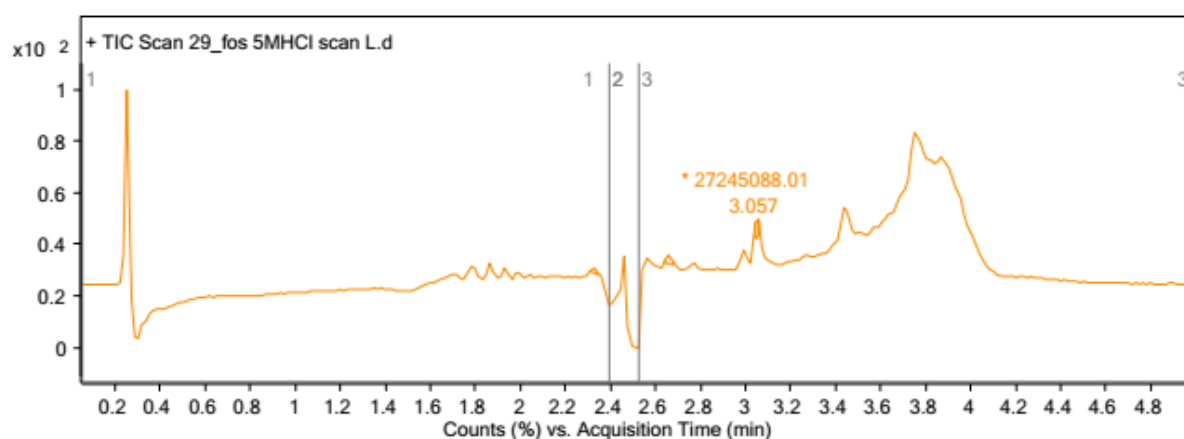
4.2.1. Uzorak razgrađen u kiselim uvjetima pomoću HCl

Uzorak je razgrađen pomoću 5 M HCl uz zagrijavanje 1 sat i potom analiziran masenom spektroskopijom. Razgradnjom su nastala 3 kemijska spoja, a snimljeni kromatogram prikazuje slika 16. Razgradni produkt s vremenom zadržavanja 2,595 minuta zapravo je nusprodukt reakcije s klorovodičnom kiselinom koja je korištena za razgradnju. Onečišćenje s vremenom zadržavanja 2,264 minute odgovara onečišćenju prisutnom i u netretiranom uzorku, ali u nešto većim količinama, dakle dodatno je nastalo pod ovim uvjetima razgradnje uzorka. Treće onečišćenje s vremenom zadržavanja 2,990 minuta prisutno je u količinama kao u netretiranom uzorku. Slika 17 prikazuje kromatogram ukupne ionske struje, TIC (engl. Total Ion Current), odnosno sve ione koji su detektirani analizom, a snimljeni maseni spektri

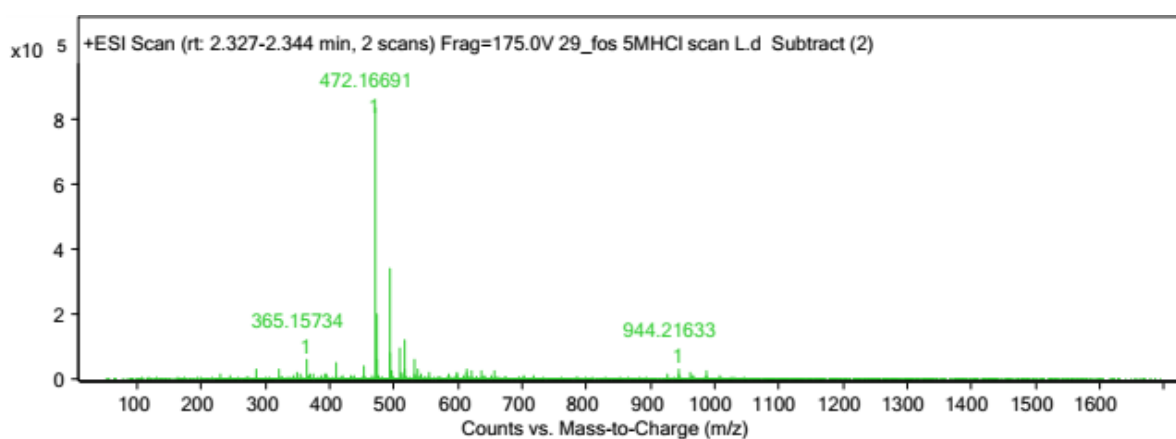
razgradnih produkata su prikazani na slikama 18, 19 i 20 s najintenzivnijim pikovima koji odgovaraju masama nastalih spojeva.



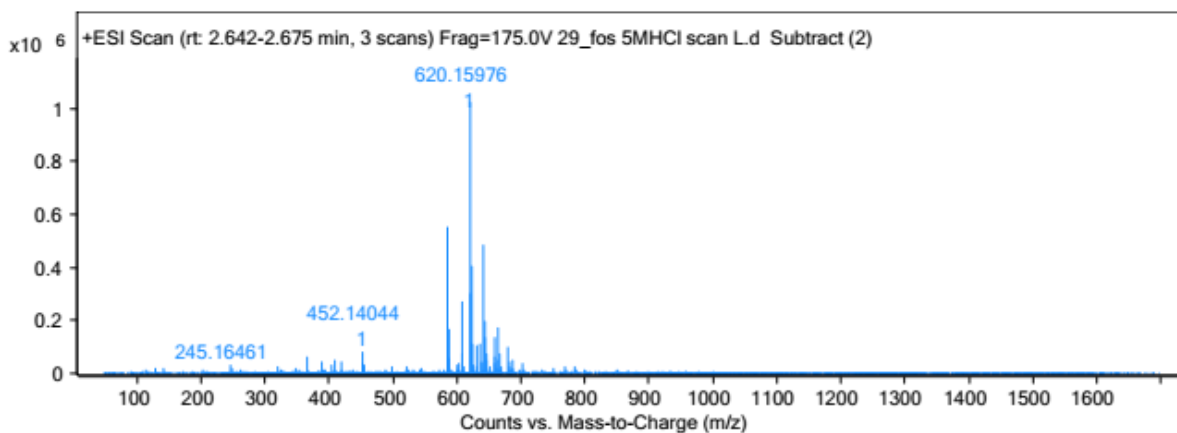
Slika 16. Kromatogram uzorka razgrađenog s 5 M HCl tijekom sat vremena na 80 °C



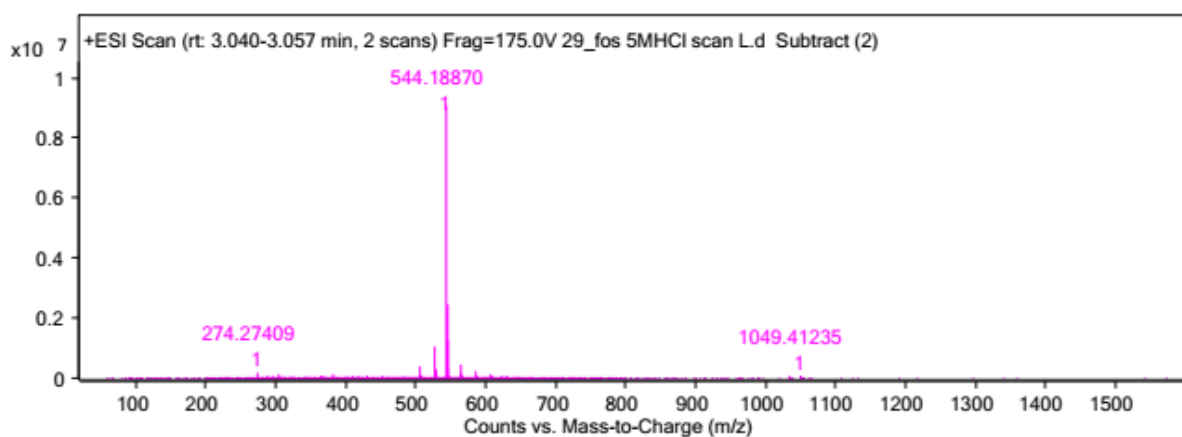
Slika 17. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka razgrađenog kiselom razgradnjom



Slika 18. Maseni spektar razgradnog produkata s vremenom zadržavanja 2,264 minute



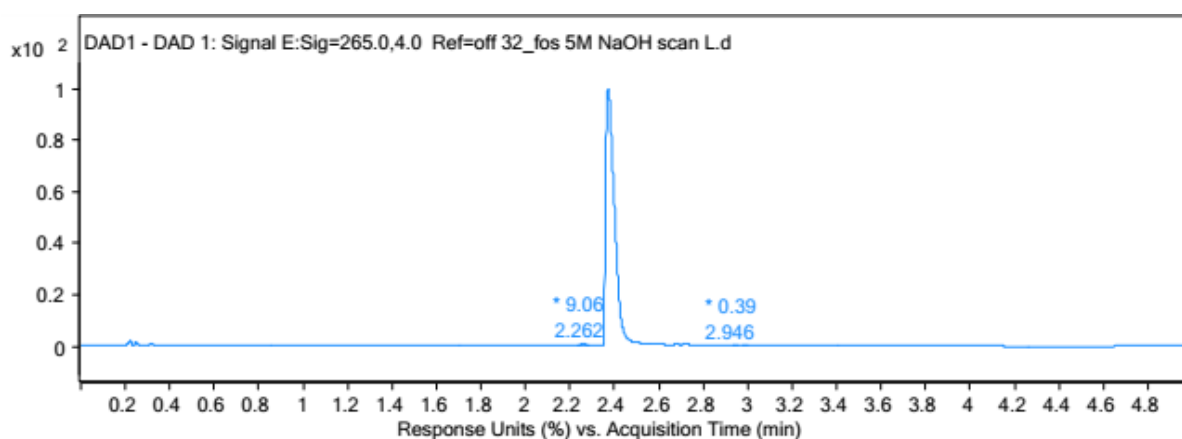
Slika 19. Maseni spektar onečišćenja s vremenom zadržavanja 2,595 minuta



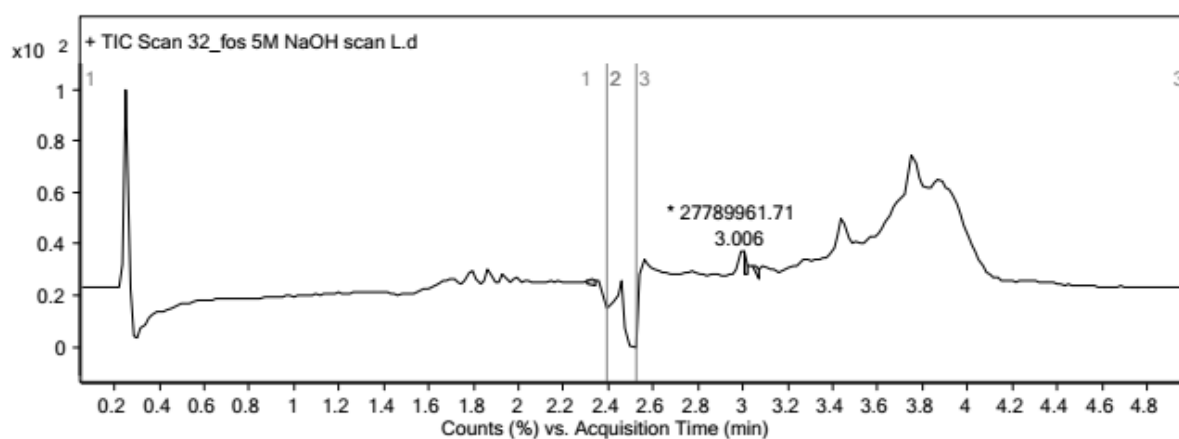
Slika 20. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,990 minuta

4.2.2. Uzorak razgrađen u lužnatim uvjetima pomoću NaOH

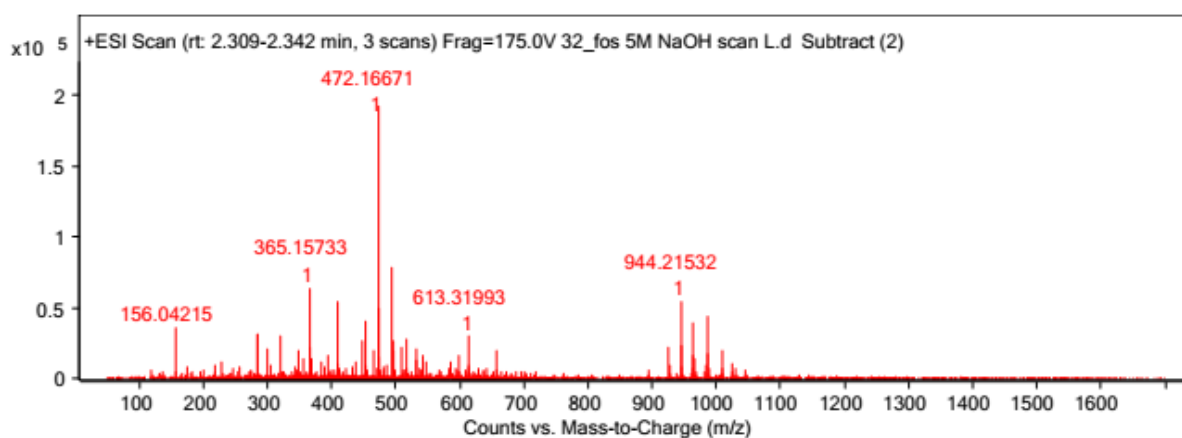
Nakon razgradnje s 5 M NaOH tijekom 1 sata uz zagrijavanje, analiza masenom spektroskopijom potvrdila je nastanak 3 kemijska spoja, od kojih je jedan s vremenom zadržavanja 2,946 minute novonastao razgradnjom. Iako je na masenom spektru na slici 24 prikazan najintenzivniji pik mase 456,14, on zapravo odgovara spoju mase 418,19 koji je značajnije prisutan kao adukt s kalijem koji nastaje ionizacijom, što odgovara i po masi. Drugi spoj vremena zadržavanja 2,262 minute je poznat iz netretiranog uzorka, samo što ga nastaje značajno više baš kao i pri kiselim uvjetima razgradnje. Njegov maseni spektar je prikazan na slici 24, a isti takav slučaj je i s trećim spojem vremena zadržavanja 2,988 minuta kojemu odgovara maseni spektar na slici 25. Kromatogram fosamprenavira i njegovih razgradnih produkata nakon bazične hidrolize, kao i pripadajuća vremena zadržavanja, prikazani su na slici 21, a kromatogram ukupne ionske struje na slici 22.



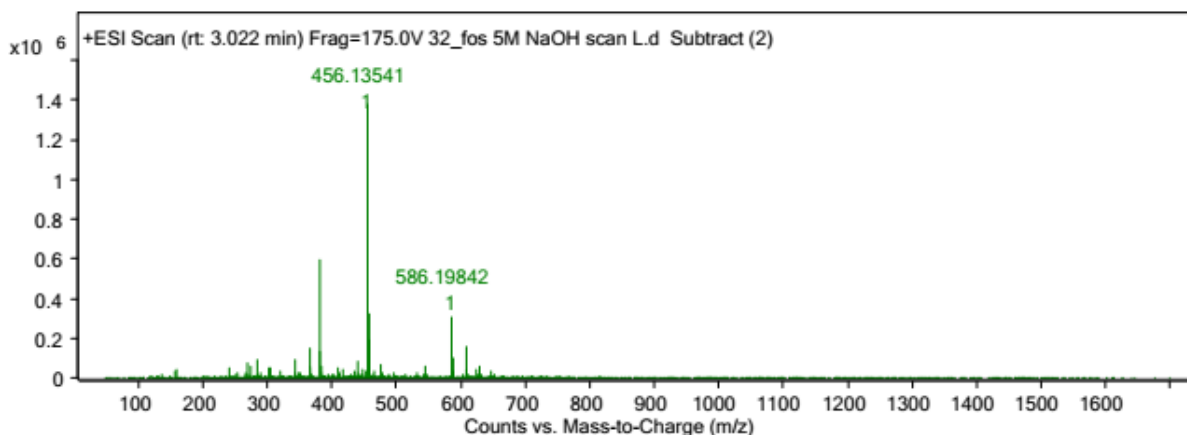
Slika 21. Kromatogram uzorka razgrađenog s 5 M NaOH sat vremena na 80 °C



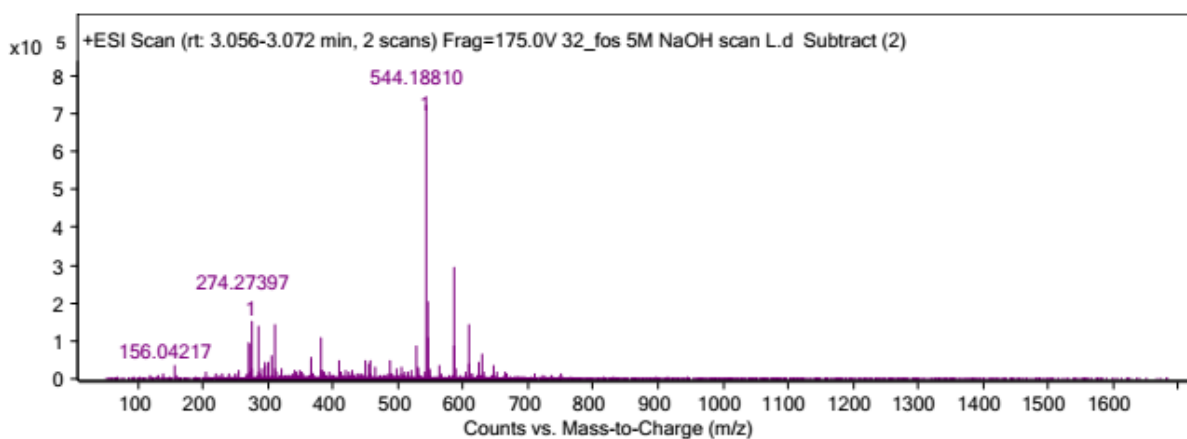
Slika 22. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka nakon bazične razgradnje



Slika 19. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,262 minute



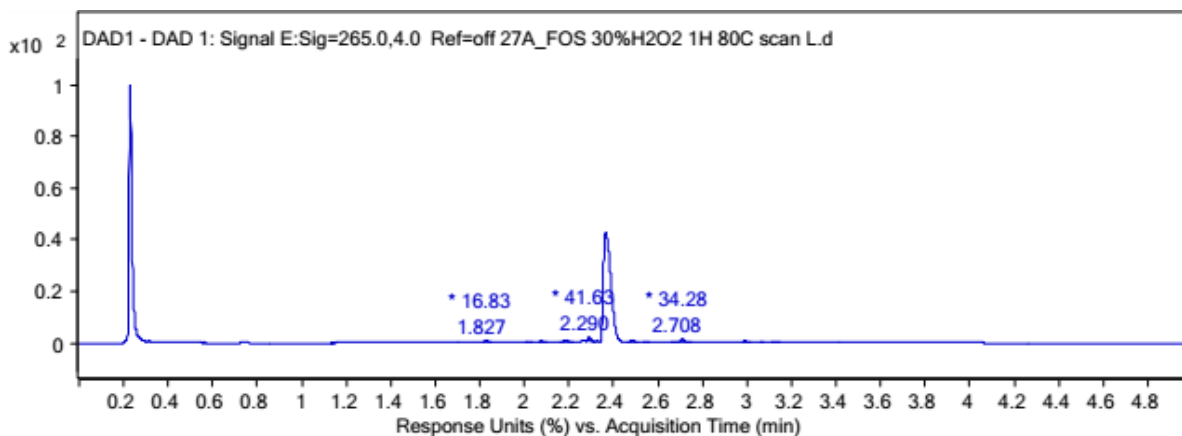
Slika 24. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,946 minuta



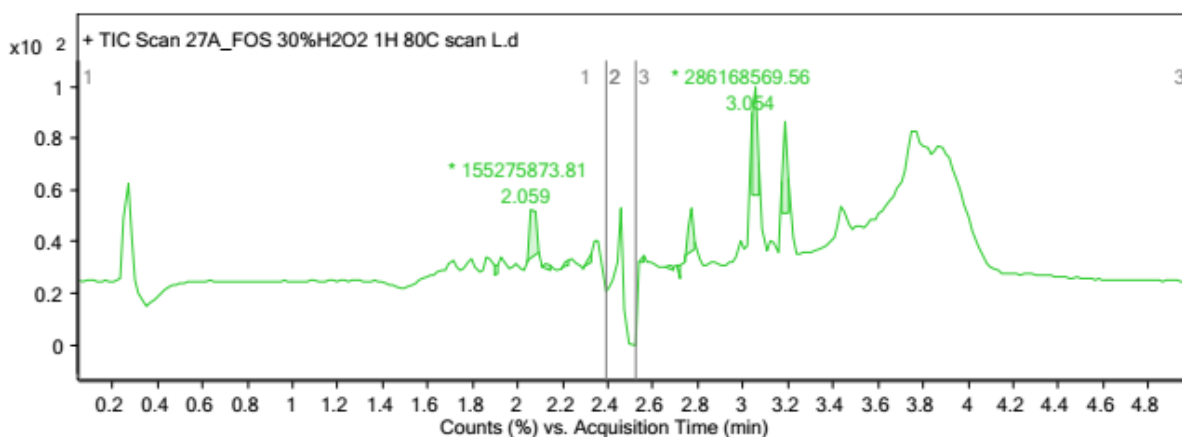
Slika 20. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,988 minuta

4.2.3. Uzorak razgrađen u oksidacijskim uvjetima pomoću H₂O₂

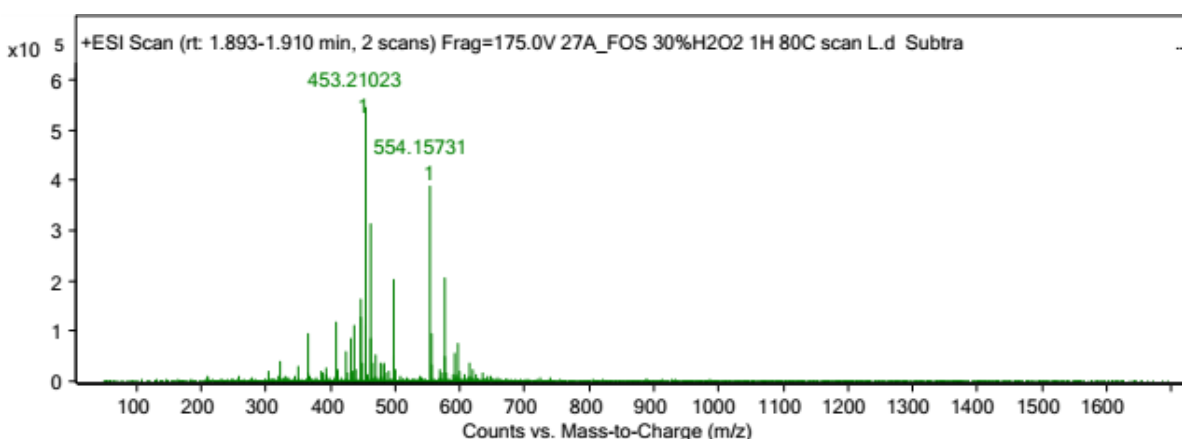
Razgradnjom uzorka u oksidacijskim uvjetima s 30 %-tnim H₂O₂ uz zagrijavanje na 80 °C tijekom jednog sata nastalo je najviše razgradnih produkata, a uz to su također prisutni i razgradni produkti koji su detektirani i u netretiranom uzorku. Kromatogram fosamprenavira i njegovih razgradnih produkata na temelju čega su izvučeni maseni spektri prikazan je na slici 21, a TIC kromatogram je na slici 22. Maseni spektri nastalih razgradnih produkata prikazani su na slikama 23-32. Jedan od najznačajnijih razgradnih produkata koji je nastao u vrlo velikim količinama je mase 431,19 čiji je maseni spektar prikazan na slici 24, a njegov nastanak se poklapa s predviđanjem te je poznat u literaturi.



Slika 21. Kromatogram uzorka razgrađenog oksidacijom s 30 %-tnim H₂O₂ tijekom jednog sata uz zagrijavanje na 80 °C



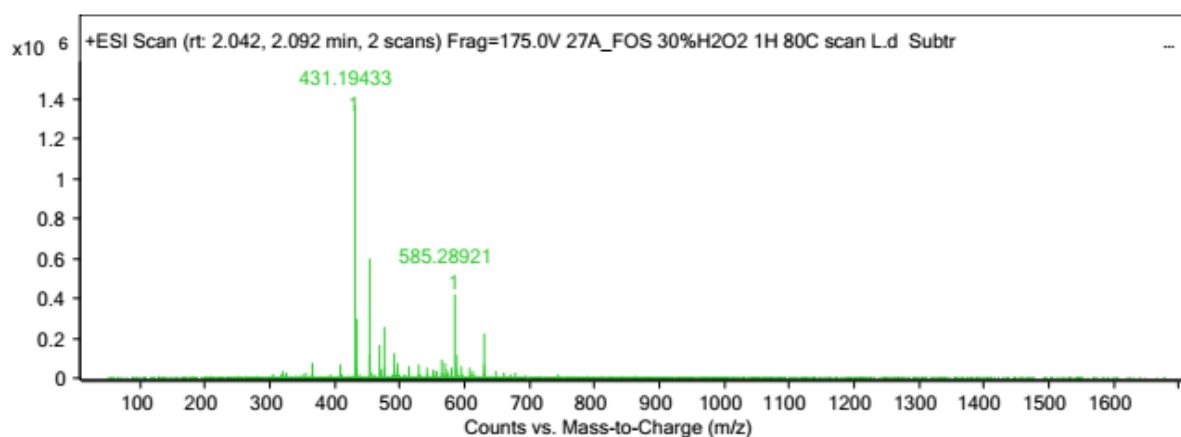
Slika 22. Kromatogram ukupne ionske struje oksidacijski razgrađenog uzorka



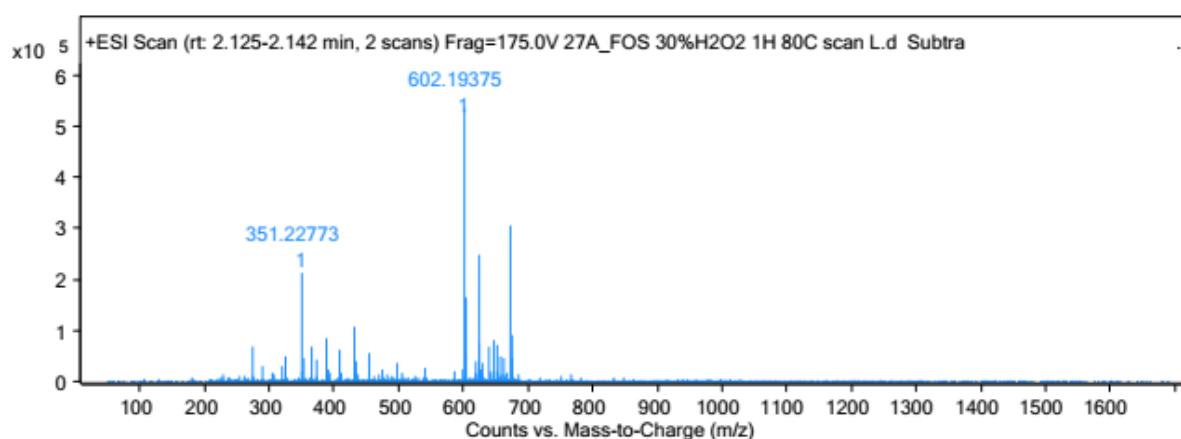
Slika 23. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 1,827 minuta

Iako je najintenzivnija masa u spektru 453,21, ta masa je prisutna i u spektru diluenta stoga se ne uzima u obzir kao novonastali razgradni produkt, već slika 23 masenog spektra prikazuje

masu 554,16 što odgovara $[M+K]^+$ ionu razgradnog produkta stvarne mase 516,15, čija je predložena struktura kasnije u tekstu.

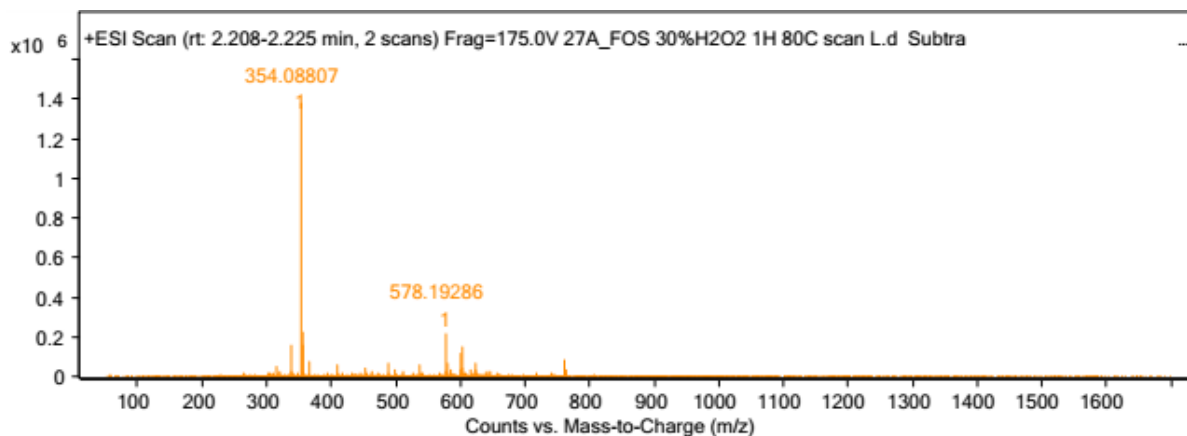


Slika 24. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,016 minuta



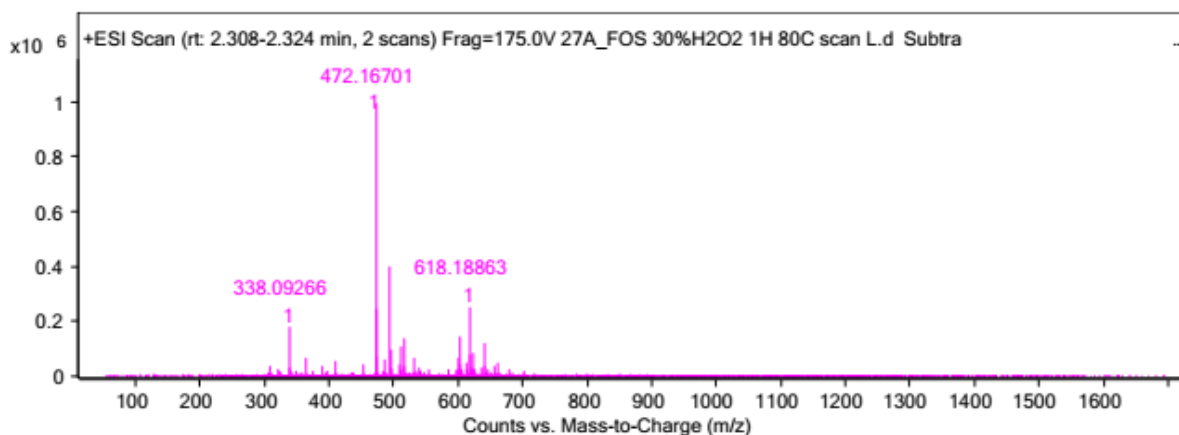
Slika 25. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,074 minute

Maseni spektar prikazan na slici 25 prikazuje najintenzivniji pik mase 602,19 koja odgovara masi onečišćenja vremena zadržavanja 2,074 minute koje se formira nastankom hidroksilamina na jednoj amino skupini fosamprenavira.

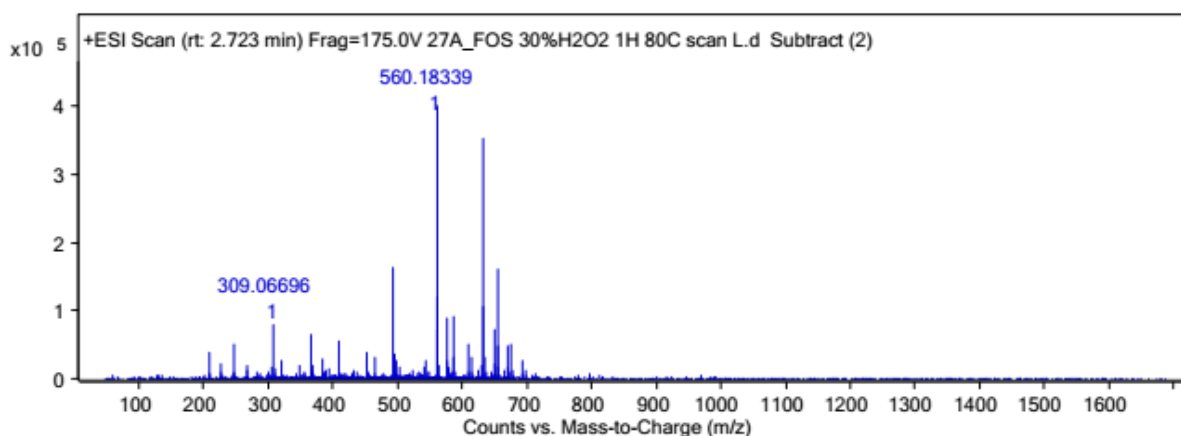


Slika 26. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,185 minuta

Na slici 26 je prikazan maseni spektar kojemu najintenzivniji pik odgovara m/z vrijednosti iona $[M+K]^+=354,09$, međutim spoj koji je nastao razgradnjom je stvarne mase 316,11, a njegova pripadajuća predložena struktura je objašnjena kasnije u tekstu (slika 59).

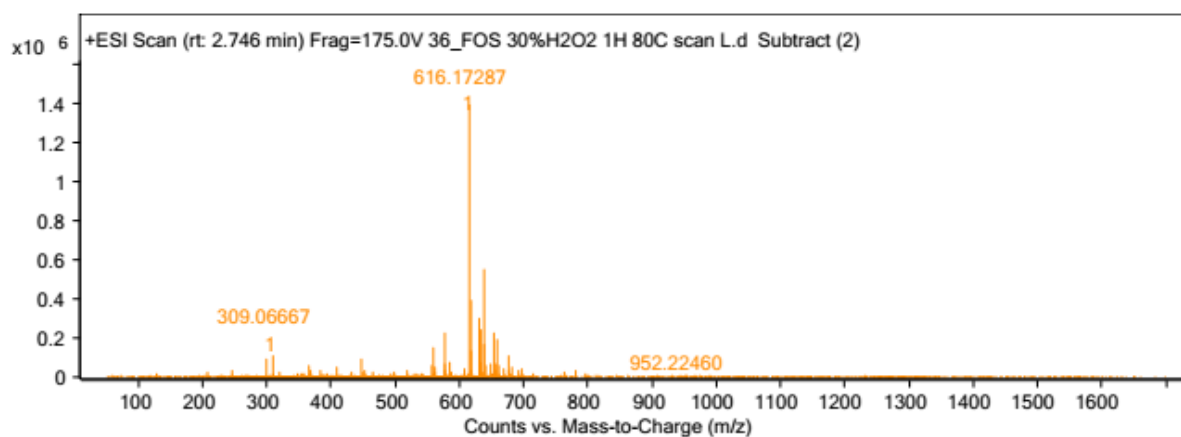


Slika 27. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,290 minuta



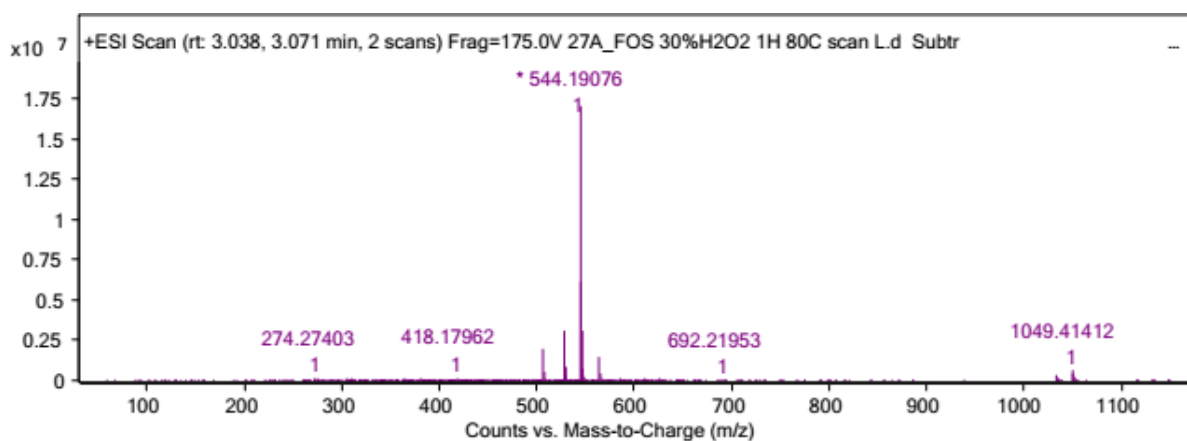
Slika 28. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,673 minute

Maseni spektar na slici 28 prikazuje masu najintezivnijeg pika koja iznosi 560,18, a pretpostavljena struktura spoja nastalog oksidacijom koja odgovara toj masi je objašnjena kasnije u tekstu (slika 63).

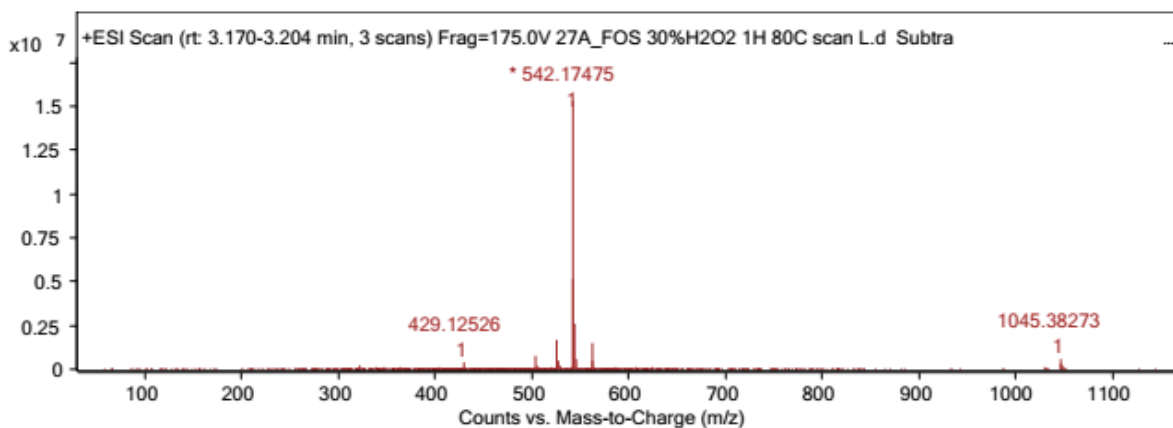


Slika 29. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,708 minuta

Najintezivniji pik na slici 29 prikazuje onečišćenje mase 616,17 koje nastaje oksidacijom amino skupine fosamprenavira.

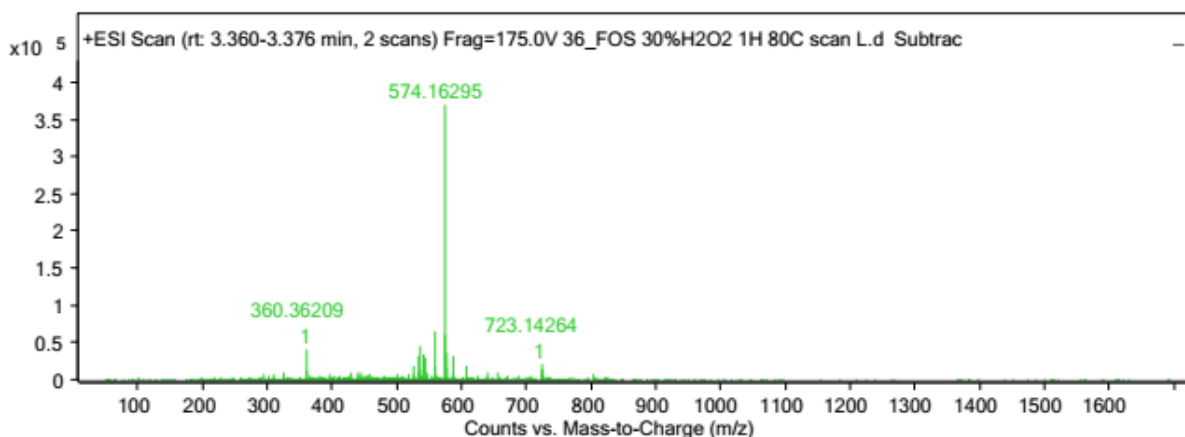


Slika 30. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,988 minute



Slika 31. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 3,127 minuta

Maseni spektar na slici 31 prikazuje masu 542,17 što odgovara $[M+K]^+$ ionu razgradnog produkta mase 504,22 koji je nastao oksidacijom hidroksilne skupine razgradnog produkta mase 506,23.



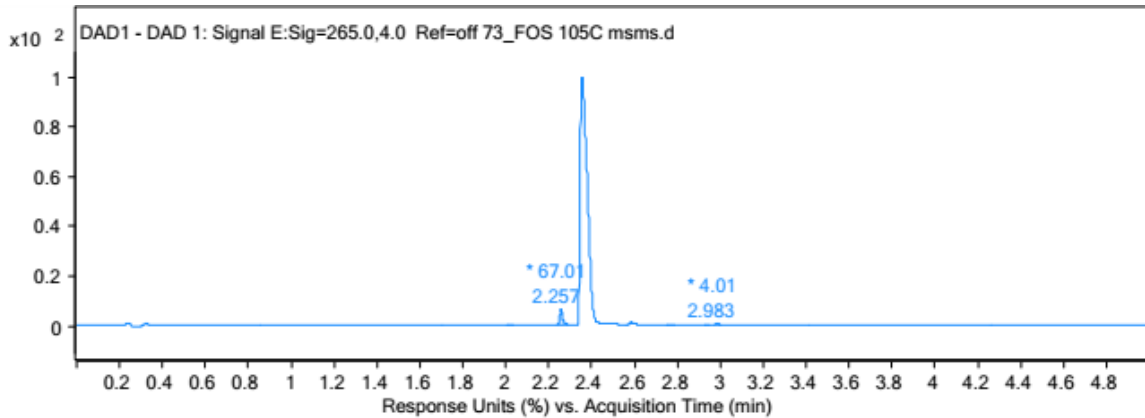
Slika 32. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 3,212 minute

Iako maseni spektar prikazuje najintenzivniji pik mase 574,16, on odgovara produktu mase 536,21 koji je nastao oksidacijom amino skupine.

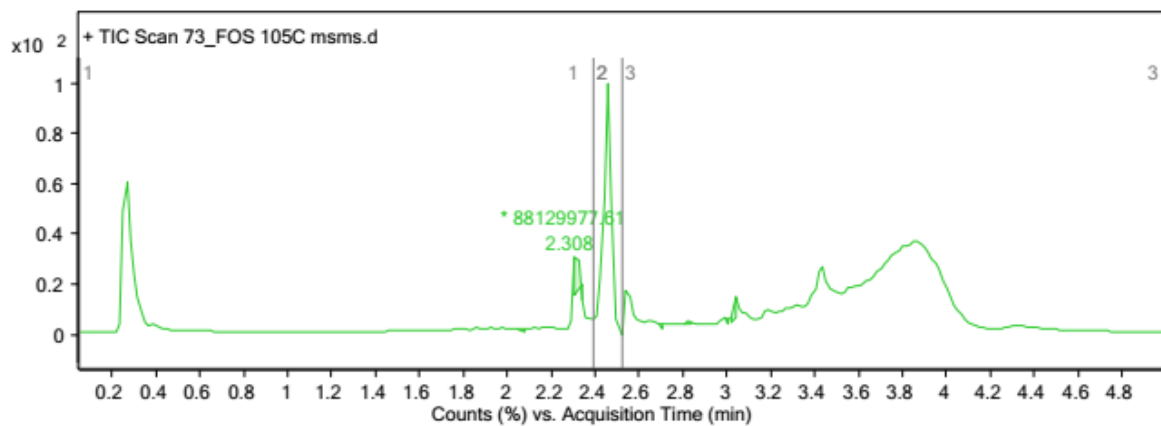
4.2.4. Uzorak razgrađen pod utjecajem topline na 105 °C tijekom 48 sati

Toplinska razgradnja uzorka provedena je ostavivši uzorak 2 dana u sušioniku zagrijanom na 105 °C, nakon čega je analiziran tekućinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektroskopijom pri čemu je utvrđeno i identificirano nekoliko razgradnih produkata. Kromatogram razgrađenog uzorka fosamprenavira prikazan je na slici 33, a kromatogram

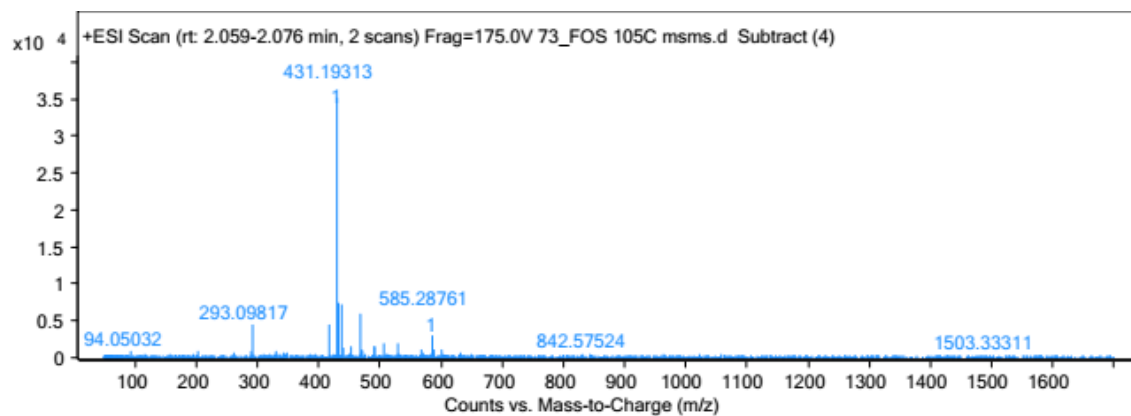
ukupne ionske struje na slici 34. Maseni spektri nastalih razgradnih produkata u tim uvjetima prikazani su na slikama 37-41. Slika 37 prikazuje najintenzivniji pik razgradnog produkta mase 431,19 koji je isto tako nastao u oksidativnim uvjetima i predviđanjem Zeneth programa. Nastali su također i produkti masa 472,17 i 506,23 koji su poznati još iz netretiranog uzorka, a njihovi spektri se nalaze na slikama 38 i 41.



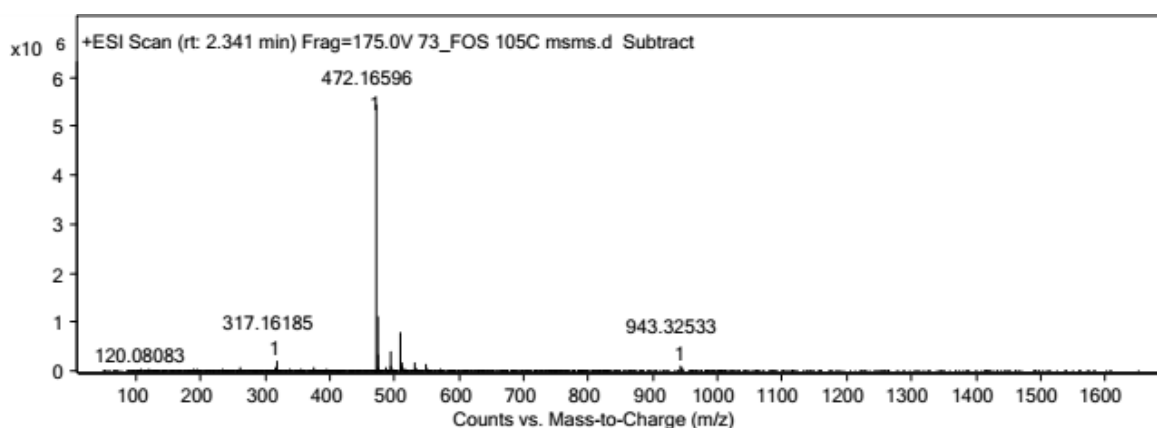
Slika 35. Kromatogram uzorka fosamprenavira nakon toplinske razgradnje



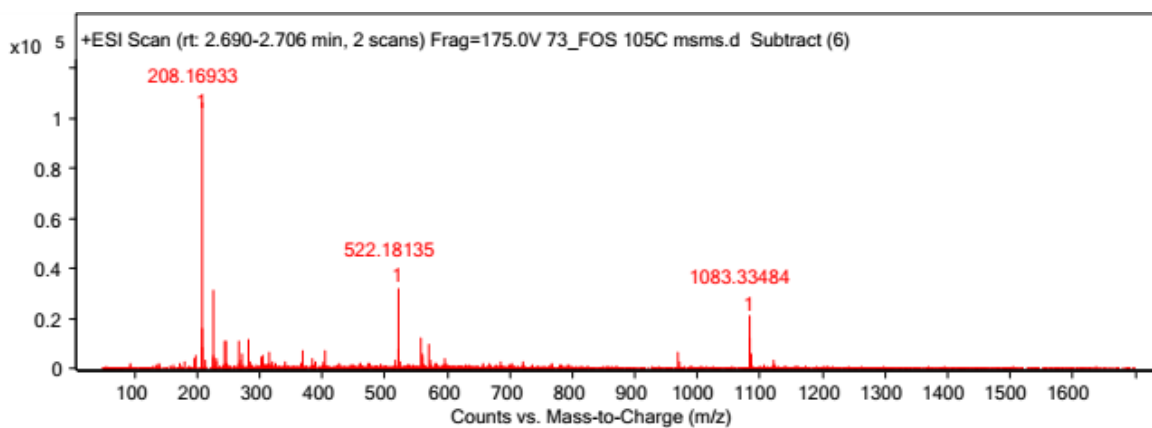
Slika 36. Kromatogram ukupne ionske struje toplinski razgrađenog uzorka



Slika 37. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,017 minuta

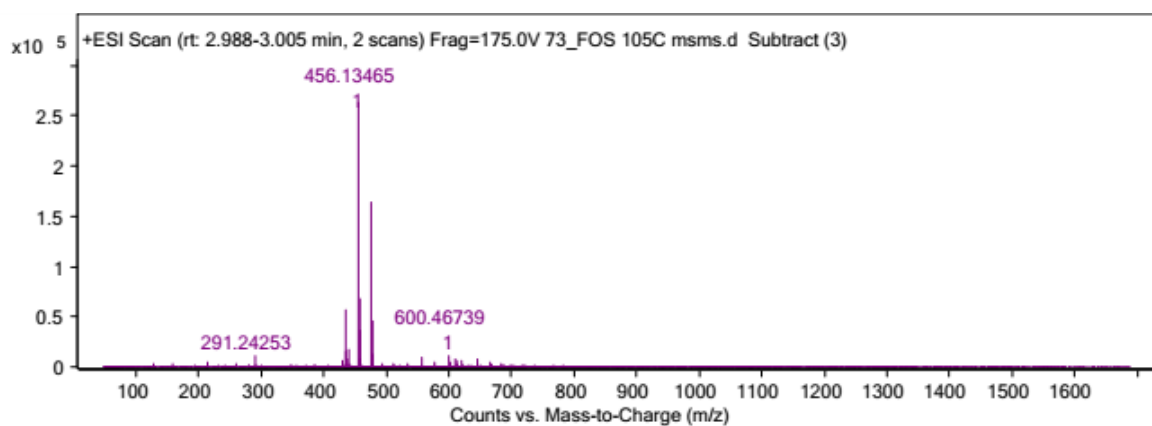


Slika 38. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,257 minuta



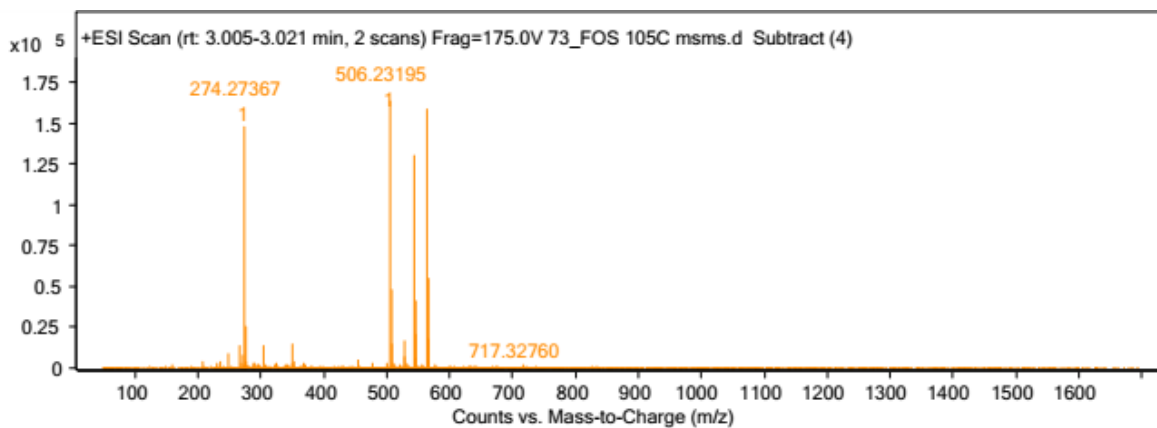
Slika 39. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,584 minute

Slika 39 prikazuje maseni spektar razgradnog produkta mase 522,18 nastalog oksidacijom amino skupine i otvaranjem peteročlanog prstena u strukturi fosamprenavira, njegova predložena struktura objašnjena je kasnije u tekstu (slika 67).



Slika 40. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,939 minuta

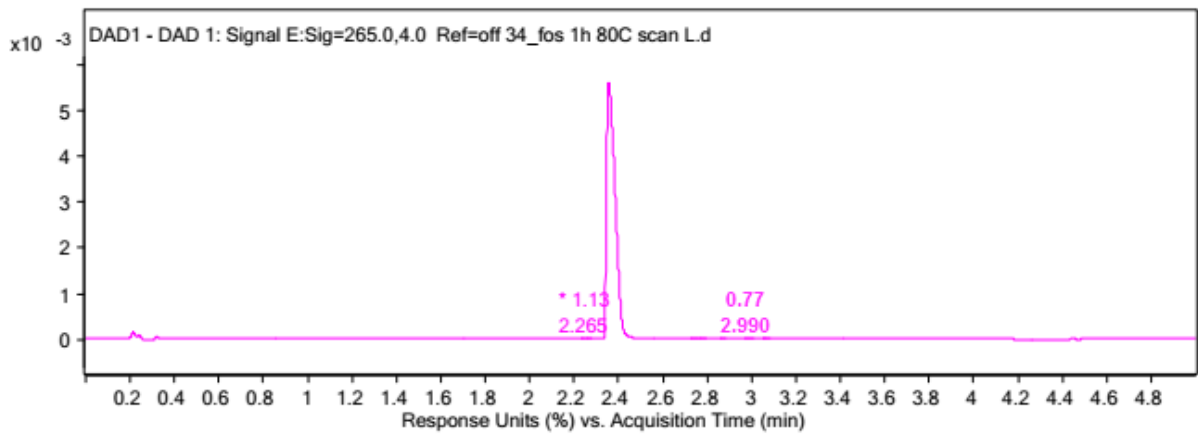
Masa 456,13 prikazana kao najintenzivniji pik na slici 40 odgovara $[M+K]^+$ ionu razgradnog produkta mase 418,18 koji je poznat u literaturi sa svojom pripadajućom strukturom.



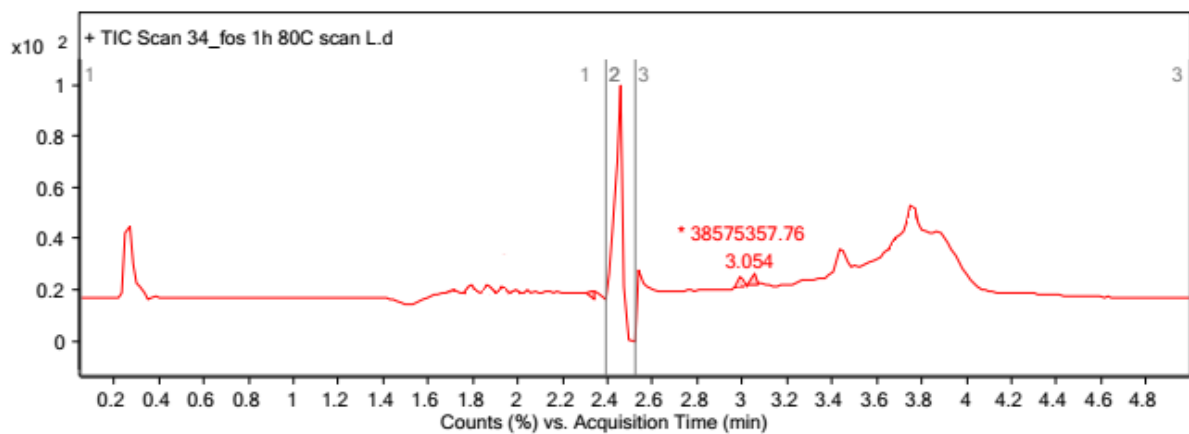
Slika 41. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,983 minute

4.2.5. Uzorak razgrađen zagrijavanjem na 80 °C tijekom jednog sata

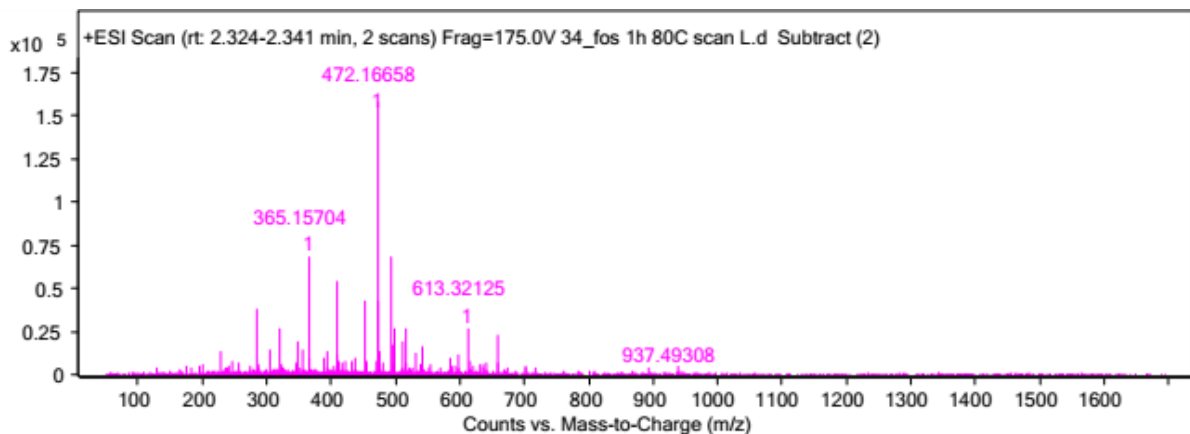
Uzorak je podvrgnut još jednoj vrsti toplinske razgradnje tako što je zagrijavan na 80 °C tijekom jednog sata, pri tome su nastala 3 razgradna produkta koja su analizirana masenom spektroskopijom. Kromatogram toplinski razgrađenog uzorka je na slici 42, a kromatogram ukupne ionske struje na slici 43. Dva razgradna produkta su identična kao i u netretiranom uzorku, prvo s vremenom zadržavanja 2,265 minuta čiji je maseni spektar prikazan na slici 44, te drugo s vremenom zadržavanja 2,990 minuta i odgovarajućim spektrom masa prikazanom na slici 45. Uz to nastalo je jedno novo onečišćenje vremena zadržavanja 3,067 minuta, a njegov maseni spektar prikazuje slika 46. To onečišćenje mase 323,16 poznato je u literaturi te na taj način identificirano i povezano sa svojom strukturom.



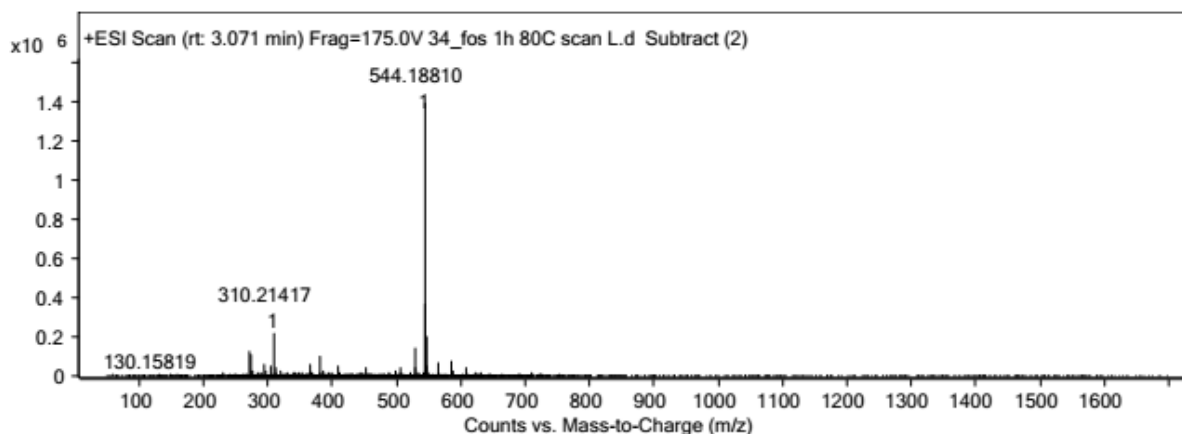
Slika 42. Kromatogram uzorka razgrađenog toplinom na 80 °C tijekom jednog sata



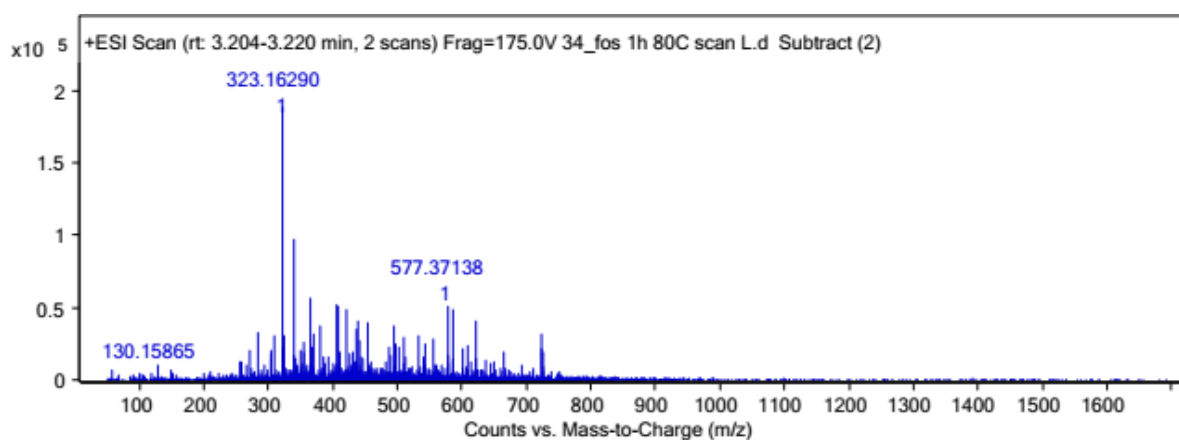
Slika 43. Kromatogram ukupne ionske struje toplinski razgrađenog uzorka tijekom 1 h



Slika 44. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,265 minuta



Slika 45. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,990 minuta

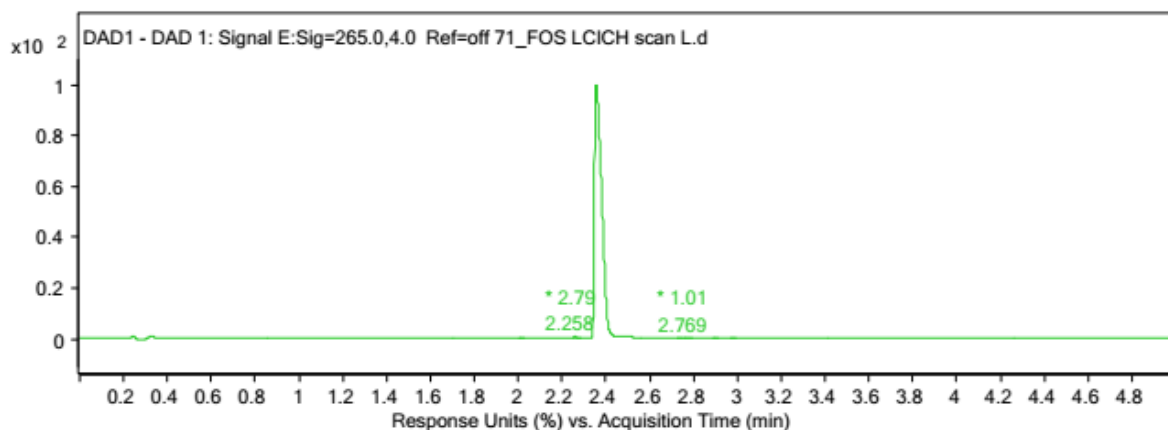


Slika 46. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 3,067 minuta

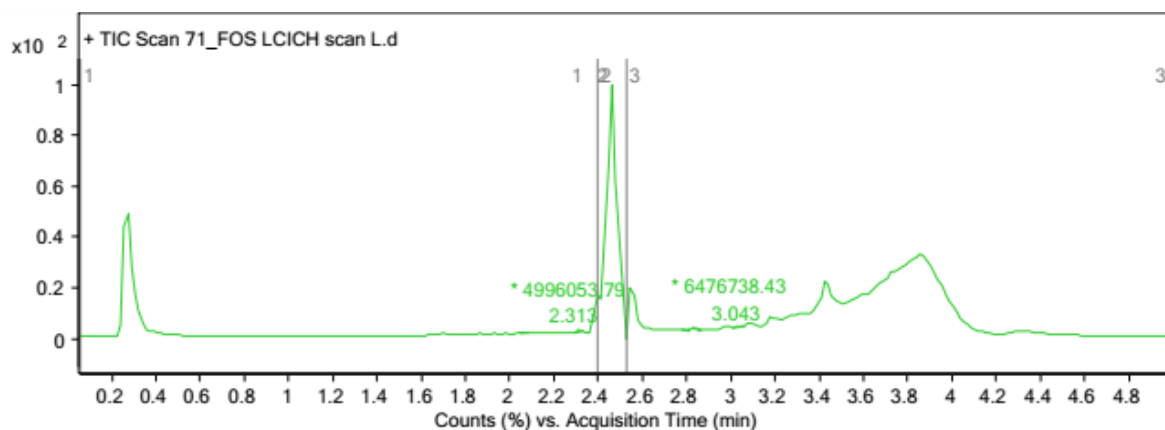
4.2.6. Uzorak razgrađen utjecajem svjetlosti tijekom 24 sata

Fotolitička razgradnja uzorka provedena je izlaganjem jednom ciklusu svjetlosti u trajanju od 24 sata, nakon čega je provedena analiza tekućinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektroskopijom kako bi se utvrdili razgradni produkti nastali svjetlosnom razgradnjom. Tom analizom dobiveni rezultati pokazuju formiranje 3 razgradna produkta koja su jednaka onima dobivenim prisilnom razgradnjom pod drugim gore navedenim uvjetima i jednog novog i do sad nepoznatog. Kromatogram svjetlošću razgrađenog uzorka je prikazan na slici 47, a kromatogram ukupne ionske struje je na slici 48. Maseni spektri nastalih razgradnih produkata u tim uvjetima prikazani su na slikama 49-52. Slike 50 i 52 prikazuju razgradne produkte koji se javljaju u svim analiziranim uzorcima pa tako i u netretiranom, odnosno njihovi maseni spektri odgovaraju masama 472,17 i 506,23. Treći razgradni produkt nastao pri ovim uvjetima je spoj mase 431,19, maseni spektar koji pokazuje tu masu

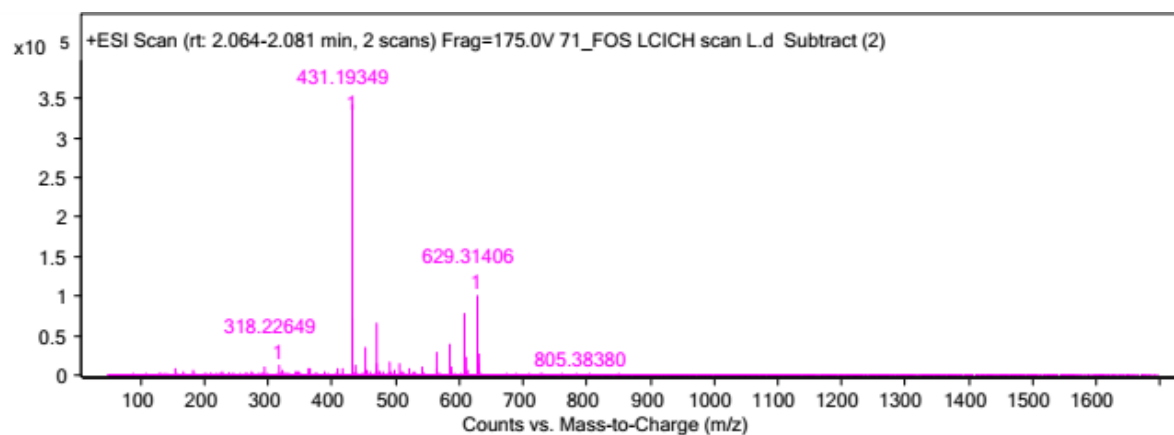
najintenzivnijeg pika je na slici 49, dok je na slici 51 prikazan novi razgradni produkt mase 572,22.



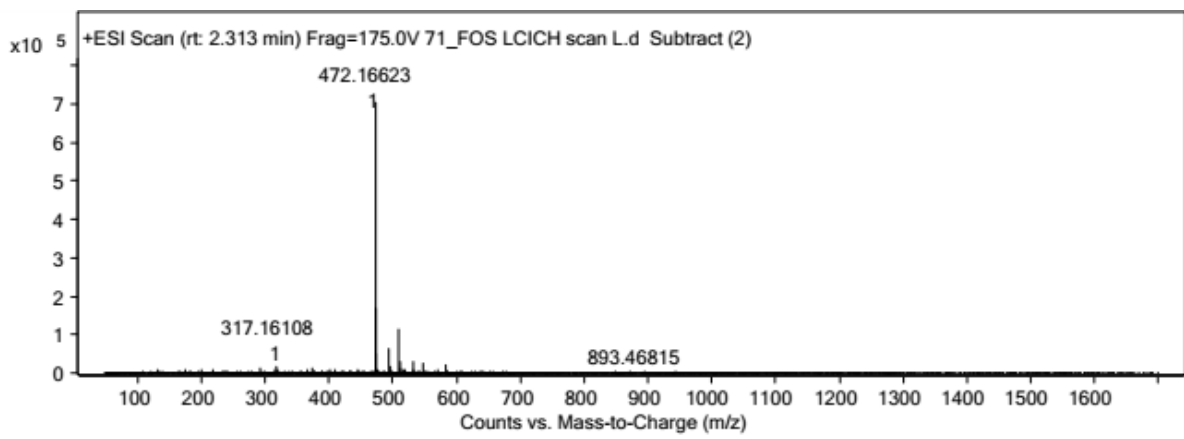
Slika 47. Kromatogram fosamprenavira i njegovih razgradnih produkata dobivenih fotolitičkom razgradnjom tijekom 24 sata



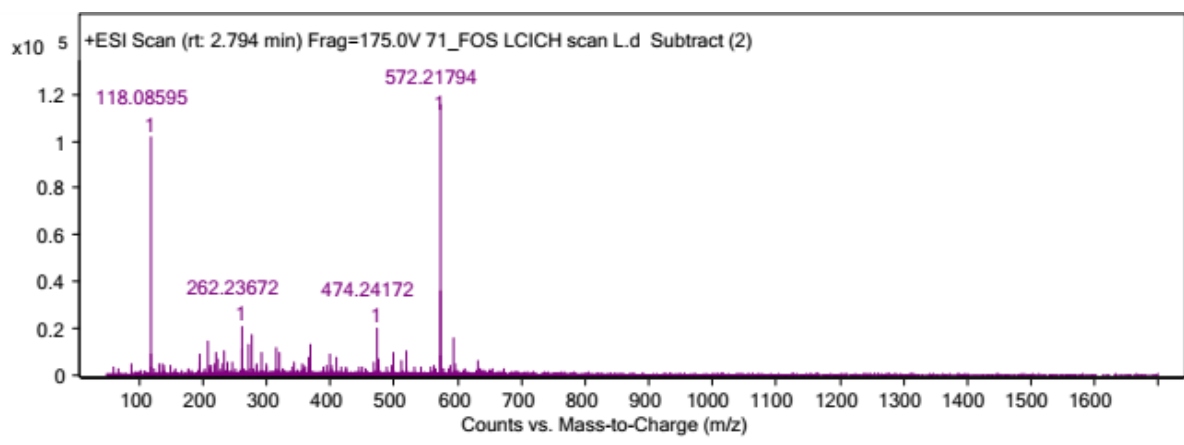
Slika 48. Kromatogram ukupne ionske struje fotolitički razgrađenog uzorka fosamprenavira



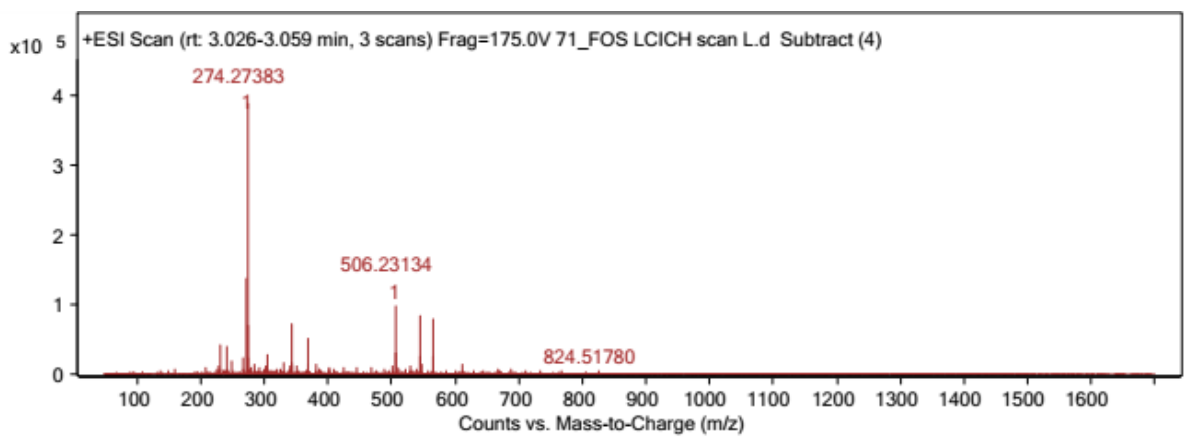
Slika 49. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,013 minute



Slika 50. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,258 minuta



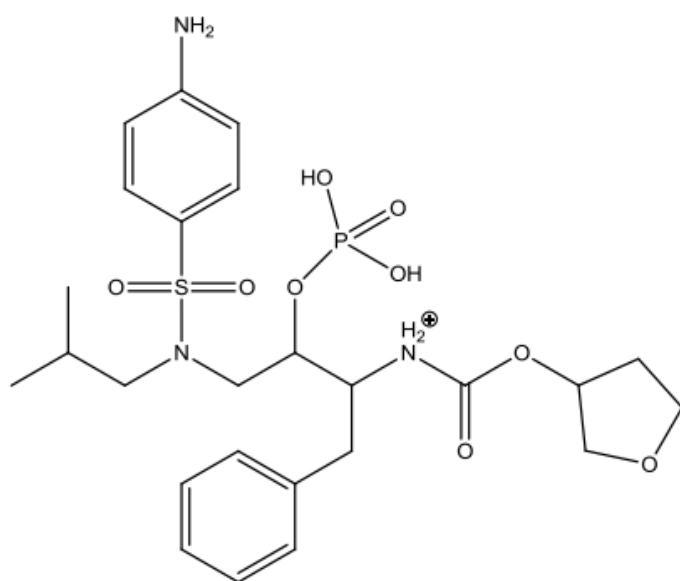
Slika 51. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,734 minute



Slika 52. Maseni spektar razgradnog produkta s vremenom zadržavanja 2,983 minute

4.3. Određivanje struktura razgradnih produkata

Strukture fosamprenavira i razgradnih produkata crtane su u programu Chemdraw. Pri određivanju pretpostavljenih struktura korištene su informacije dobivene iz masenih spektara prikazanih u prethodnim poglavljima, dostupne literature te uz pomoć samog programa koji računa masu nacrtanih struktura. Slika 53 prikazuje strukturu fosamprenavira kao pozitivno ioniziranu molekulu koja nastaje prilikom korištenja pozitivne elektrosprej ionizacije.



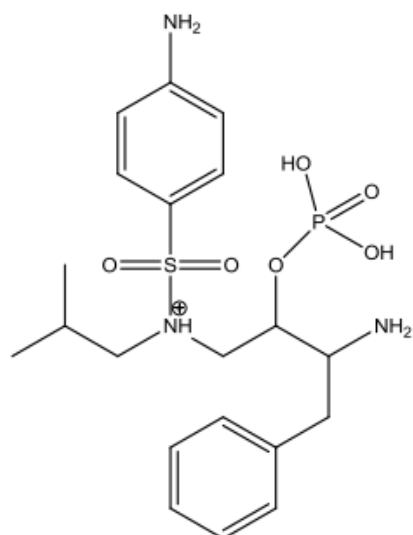
Chemical Formula: C₂₅H₃₇N₃O₉PS⁺

Exact Mass: 586,19826

Molecular Weight: 586,61419

Slika 53. Struktura ioniziranog fosamprenavira

Dva su razgradna produkta zajednička prisilno razgrađenim i analiziranim uzorcima pri svim provedenim uvjetima, a također su prisutna i u netretiranom uzorku te predviđena Zeneth programom. U literaturi je poznat mehanizam njihovog nastanka te stoga ovdje nije naveden, već je samo potvrđeno kako nastaju i bitna su za analizu kvalitete i stabilnosti fosamprenavira. Prvi od njih je spoj mase 472,17 nastao cijepanjem karbamatnog estera fosamprenavira, a njegova struktura je prikazana na slici 54 kao ionizirana molekula.



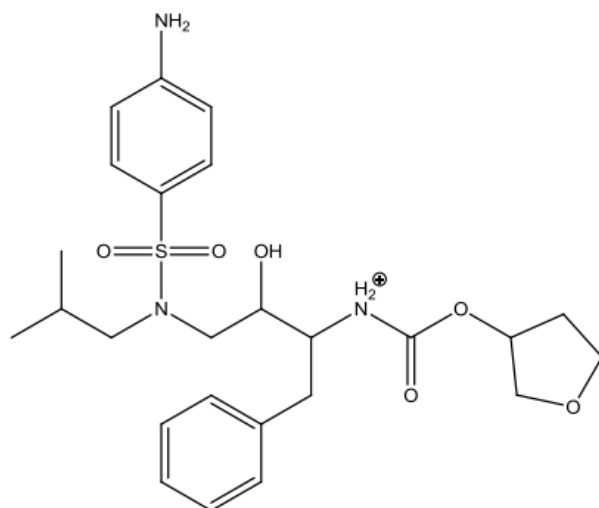
Chemical Formula: $C_{20}H_{31}N_3O_6PS^+$

Exact Mass: 472,16657

Molecular Weight: 472,51485

Slika 54. Razgradni produkt fosamprenavira nastao hidrolizom karbamatnog estera

Drugi razgradni produkt mase 506,23 je vjerojatno najlogičniji razgradni produkt koji se pronalazi tijekom analize budući da ta masa odgovara gubitku fosfata u strukturi fosamprenavira, odnosno pretvaranju prolijeka u aktivni lijek amprenavir, a njegova struktura prikazana na slici 55.



Chemical Formula: $C_{25}H_{36}N_3O_6S^+$

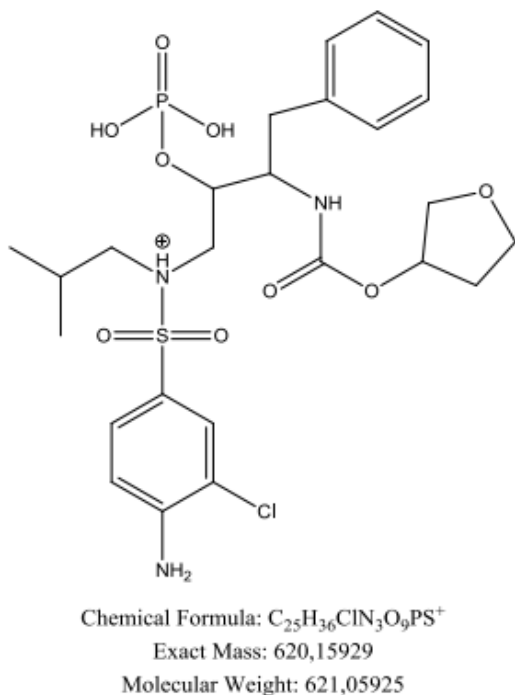
Exact Mass: 506,23193

Molecular Weight: 506,63429

Slika 55. Struktura amprenavira kao razgradnog produkta i aktivnog oblika lijeka fosamprenavira

4.3.1. Razgradnja fosamprenavira u kiselim uvjetima

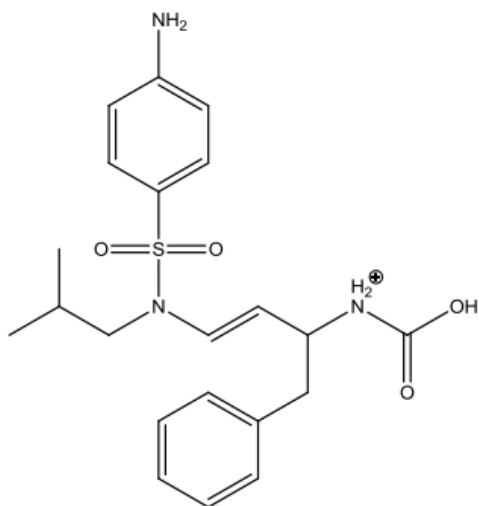
Osim masa gore navedenih razgradnih produkata pri kiselim uvjetima nastaje još i produkt mase 620,16 koji je svojstven samo tim uvjetima razgradnje i najvjerojatnije pripada spoju koji je nastao reakcijom fosamprenavira s klorovodičnom kiselinom tijekom razgradnje pri čemu se atom klora ugradio u strukturu. Predložena struktura tog razgradnog produkta prikazana je na slici 56.



Slika 56. Struktura novonastalog razgradnog produkta pri kiselim uvjetima razgradnje

4.3.2. Razgradnja fosamprenavira u bazičnim uvjetima

U bazičnim uvjetima razgradnje nastao je razgradni produkt poznat u literaturi, m/z vrijednosti 418,18 koji nastaje gubitkom tetrahidrofurana hidrolizom estera te fosfata. Njegova struktura je prikazana na slici 57.



Chemical Formula: $C_{21}H_{28}N_3O_4S^+$

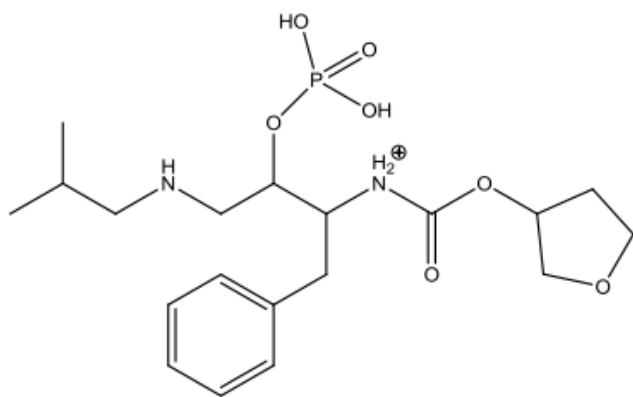
Exact Mass: 418,17950

Molecular Weight: 418,52917

Slika 57. Razgradni produkt najzastupljeniji pri razgradnji u bazičnim uvjetima

4.3.3. Razgradnja fosamprenavira oksidacijom

Oksidacijom fosamprenavira se stvorilo najviše različitih razgradnih produkata što se moglo i očekivati s obzirom na mnogobrojne skupine u molekuli koje bi mogle oksidirati. Nastali su produkti masa: 516,15, 431,19, 602,19, 316,11, 472,17, 616,17, 560,18, 506,23, 504,22, 536,21, od kojih su neki poznati u dostupnoj literaturi gdje je opisana fragmentacija fosamprenavira, dok su neki potpuno novi te bi ih trebalo dodatno analizirati drugim i dodatnim tehnikama kako bi se nedvojbeno potvrdila njihova struktura koje je ovdje predložena. Razgradni produkt mase 431,19 je već opisan u literaturi i njegova struktura se nalazi na slici 58, isto tako na temelju tih dostupnih znanja se pretpostavila struktura produkta mase 316,11 koja je prikazana na slici 59.

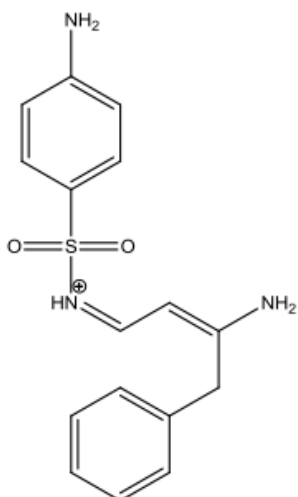


Chemical Formula: $C_{19}H_{32}N_2O_7P^+$

Exact Mass: 431,19416

Molecular Weight: 431,43979

Slika 58. Razgradni produkt nastao hidrolizom sulfonamida fosamprenavira



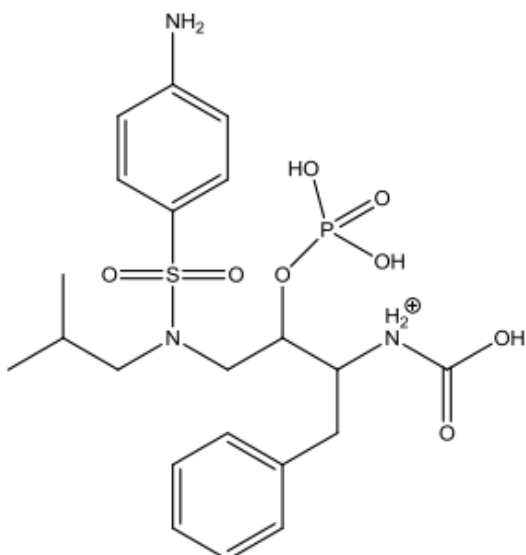
Chemical Formula: $C_{16}H_{18}N_3O_2S^+$

Exact Mass: 316,11142

Molecular Weight: 316,39747

Slika 59. Struktura razgradnog produkta nastalog pri oksidacijskim uvjetima gubitkom postraničnih lanaca na dušikovom atomu i fosfata

Oksidacijom je nastao i jedan produkt koji nije poznat u literaturi, ali je predviđen Zeneth računalnim programom te je na taj način pretpostavljena njegova struktura i prikazana je na slici 60. Radi se o razgradnom produktu mase 516,15 koji je nastao hidrolizom karbamatnog estera fosamprenavira.



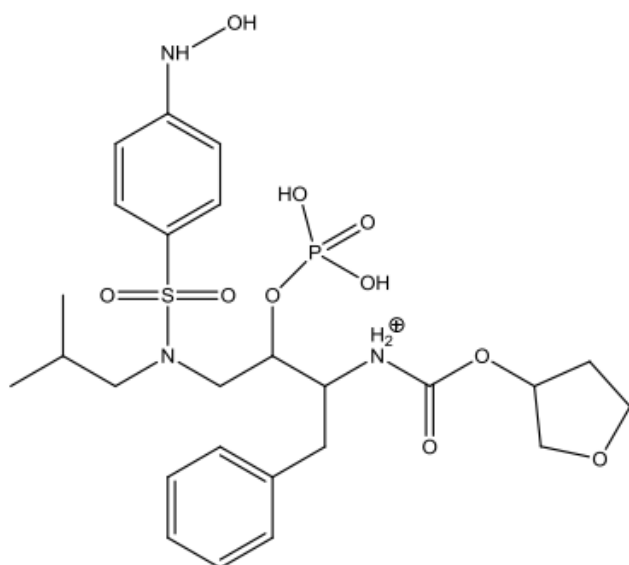
Chemical Formula: $C_{21}H_{31}N_3O_8PS^+$

Exact Mass: 516,15640

Molecular Weight: 516,52435

Slika 60. Razgradni produkt nastao hidrolizom karbamatnog estera

U prisustvu H_2O_2 došlo je do oksidacije amino skupine na benzenskom prstenu te nađena masa 602,19 odgovara nastanku hidroksilamina fosamprenavira čija je struktura predložena na slici 61.



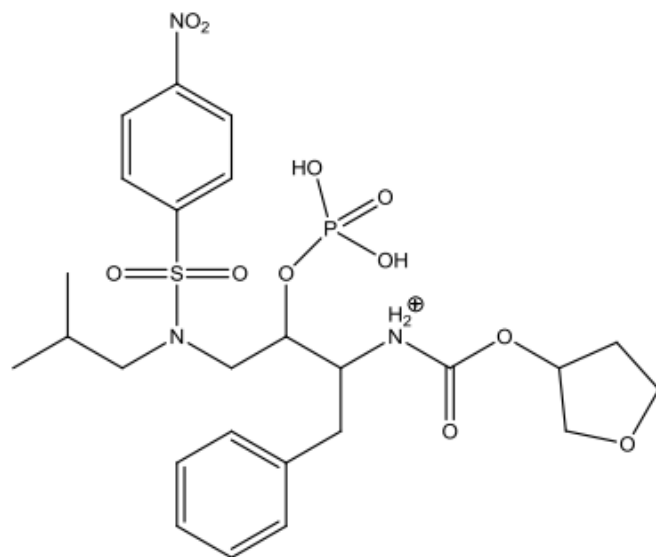
Chemical Formula: $C_{25}H_{37}N_3O_{10}PS^+$

Exact Mass: 602,19318

Molecular Weight: 602,61359

Slika 61. Struktura razgradnog produkta nastalog formiranjem hidroksilamin fosamprenavira

Isto tako osim formiranja hidroksilamina, ta amino skupina se oksidira u nitro skupinu te je novonastao razgradni produkt mase 616,17 pretpostavljene strukture prikazane na slici 62.



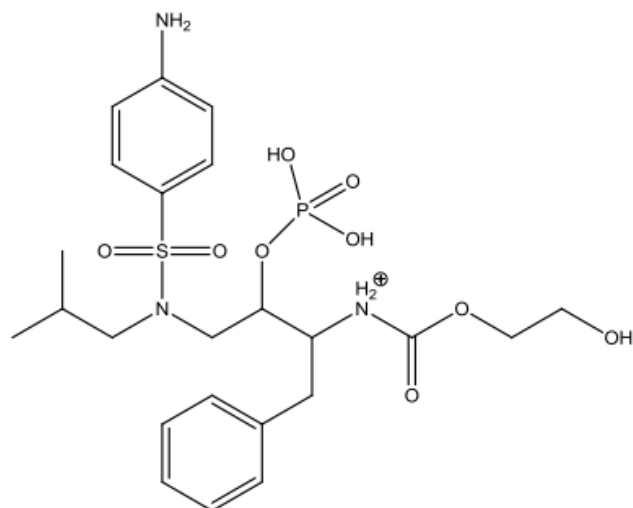
Chemical Formula: C₂₅H₃₅N₃O₁₁PS⁺

Exact Mass: 616,17244

Molecular Weight: 616,59711

Slika 62. Nitro-razgradni produkt fosamprenavira

Još jedan nepoznati i novonastali razgradni produkt je onaj mase 560,18 koji je najvjerojatnije nastao pucanjem veze peteročlanog prstena i odcjepljivanjem etilne skupine s kisika u postraničnom lancu koji je dobiven otvaranjem prstena, a njegova predložena struktura se nalazi na slici 63.



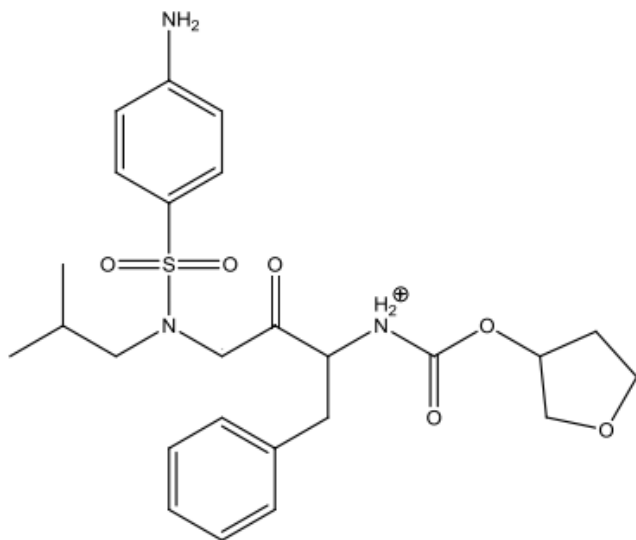
Chemical Formula: C₂₃H₃₅N₃O₉PS⁺

Exact Mass: 560,18261

Molecular Weight: 560,57691

Slika 63. Razgradni produkt nastao otvaranjem prstena u fosamprenaviru

Razgradni produkt mase 504,22 odgovara nastanku spoja koji je prilikom gubitka fosfata izgubio i jednu molekulu vode te se formirao keton, njegova pretpostavljena struktura je na slici 64.



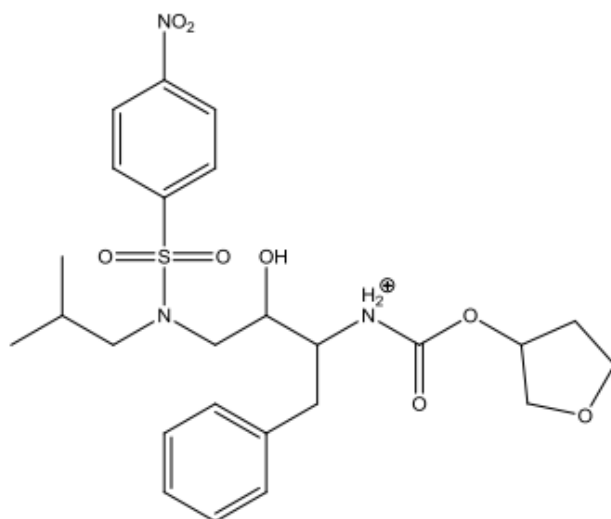
Chemical Formula: $C_{25}H_{34}N_3O_6S^+$

Exact Mass: 504,21628

Molecular Weight: 504,61841

Slika 64. Struktura ketona nastalog razgradnjom i gubitkom fosfata

Prolijek fosamprenavira i ujedno jedan od razgradnih produkata koji je nastao pri svim uvjetima razgradnje također se oksidirao te je amino skupina amprenavira prešla u nitro skupinu prilikom izlaganja oksidacijskom sredstvu. Predložena struktura razgradnog produkta mase 536,21 koji je tako nastao je na slici 65 i također nije poznata u literaturi pa je potrebna dodatna potvrda i identifikacija tog razgradnog produkta.



Chemical Formula: $C_{25}H_{34}N_3O_8S^+$

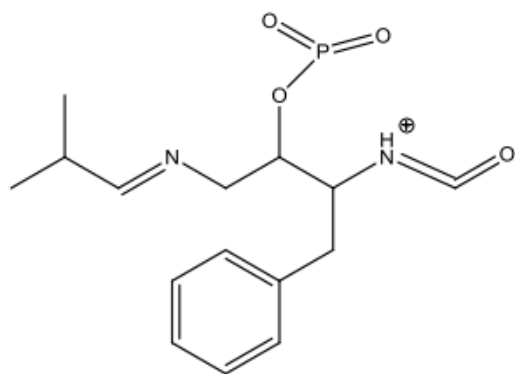
Exact Mass: 536,20611

Molecular Weight: 536,61721

Slika 65. Struktura razgradnog produkta amprenavira

4.3.4. Toplinska razgradnja fosamprenavira

Toplinska razgradnja fosamprenavira provedena je na 2 različita načina, pri zagrijavanju uzorka na 80 °C tijekom jednog sata nastao je razgradni produkt mase 323,16 koji je poznat u literaturi i njegova struktura je prikazana na slici 66. Pri nešto snažnijim uvjetima razgradnje, gdje je uzorak izložen temperaturi od 105 °C tijekom 48 sati, nastala su još 3 dodatna razgradna produkta. Dva su produkta već opisana i poznata u literaturi, jedan je produkt mase 431,19 koji je nastao i pri oksidaciji uzorka te je njegova struktura prikazana na slici 58, dok je drugi mase 418,18 nastao i pri bazičnim uvjetima razgradnje čija se struktura nalazi na slici 57. Uz njih je nastao i još jedan razgradni produkt mase 522,18, do sad nepoznat u literaturi pa je za njega predložena struktura na slici 67, koja odgovara strukturi spoja iz kojega se sintetizira fosamprenavir pregradnjom i stvaranjem prstena, stoga najvjerojatnije odgovara procesnom onečišćenju.

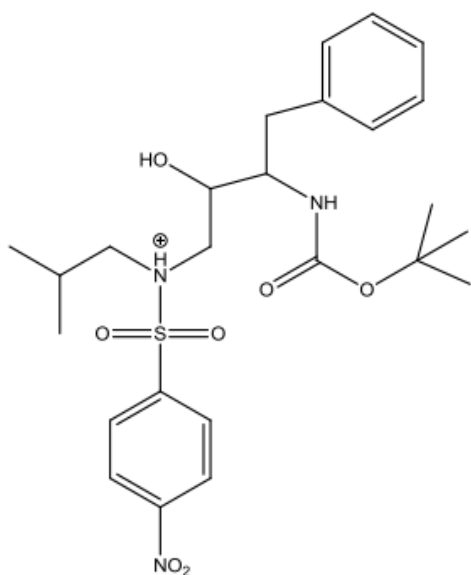


Chemical Formula: $C_{15}H_{20}N_2O_4P^+$

Exact Mass: 323,11552

Molecular Weight: 323,30351

Slika 66. Razgradni produkt nastao zagrijavanjem uzorka pri 80 °C 1 sat



Chemical Formula: $C_{25}H_{36}N_3O_7S^+$

Exact Mass: 522,22685

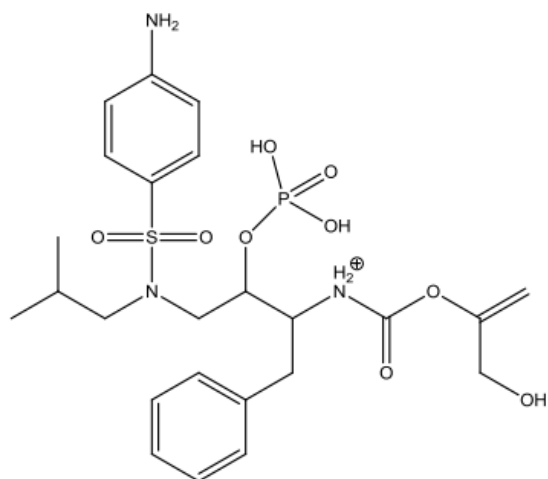
Molecular Weight: 522,63369

Slika 67. Procesno onečišćenje fosamprenavira

4.3.5. Fotolitička razgradnja fosamprenavira

Pod utjecajem svjetlosti fosamprenavir se razgradio na 4 razgradna produkta masa: 431,19, 472,17, 572,22 i 506,23. Razgradni produkti masa 472,17 i 506,23 odgovaraju i po vremenu zadržavanja i po masama gore opisanim te su njihove predložene strukture prikazane na slikama 54 i 55. U većim količinama je nastao razgradni produkt mase 431,19 koji je također nastao i pri oksidativnim uvjetima te toplinskom razgradnjom u sušioniku tijekom 48 sati, a

njegova struktura je prikazana na slici 58. Produkt koji nije nastao niti pri jednim uvjetima osim pod utjecajem svjetlosti je razgradni produkt mase 572,22. Predložena struktura ovog razgradnog produkta, koji je nastao otvaranjem peteročlanog prstena, prikazana je na slici 68. Budući da nije poznata u literaturi, niti predviđena računalnim programom, da bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da se radi baš o toj strukturi potrebne su daljnje analize tandemskom masenom spektroskopijom kako bi se na temelju dobivenih fragmenata mogla potvrditi data struktura.



Chemical Formula: C₂₄H₃₅N₃O₉PS⁺

Exact Mass: 572,18261

Molecular Weight: 572,58761

Slika 68. Razgradni produkt nastao fotolizom fosamprenavira

5. ZAKLJUČCI

1) Fosamprenavir se raspada pod utjecajem svjetlosti i topline te kiselom i bazičnom hidrolizom i u oksidirajućim uvjetima.

2) Zeneth računalni program je predvidio neke od dobivenih razgradnih produkata, ali i neke koji nisu pronađeni razgradnjom kao što su primjerice spojevi mase 391,19, 360,15, 350,22, 435,18, 173,01 što potvrđuje da se teorijski može predvidjeti puno više razgradnih produkata nego što oni nastaju eksperimentalno.

3) Pri svim uvjetima razgradnje nastali su razgradni produkti mase 472,17 i 506,23 u većim ili manjim količinama ovisno o uvjetima, već su poznati u literaturi te su tako i identificirani.

4) Najviše razgradnih produkata nastalo je prilikom razgradnje u oksidacijskim uvjetima, što upućuje da je fosamprenavir najosjetljiviji upravo na oksidaciju. Pretpostavljene su strukture svih nastalih razgradnih produkata, a najviše je nastalo produkta mase 472,17, 506,23, 504,22, i 616,17.

5) Svjetlosnom razgradnjom je nastao razgradni produkt mase 572,22 do sad nepoznat u literaturi te mu je predložena struktura koju treba potvrditi MS/MS tehnikom.

6) Toplinskom razgradnjom je značajno nastalo produkta mase 522,18 kojemu je predložena struktura kao procesnog onečišćenja fosamprenavira iz kojeg je sintetiziran.

7) Svi uzorci su analizirani novom i brzom metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti u kojoj su svi razgradni produkti bili dobro vidljivi i razdvojeni, a u kombinaciji s MS-om omogućila je analizu razgradnih produkata uz uštedu vremena, kemikalija i novca.

8) Iako je u literaturi poznat čitav put razgradnje fosamprenavira korištenjem LC-MS i NMR analitičkih tehnika, ovdje je pokazano koji su vjerojatniji razgradni produkti koji bi se mogli naći u gotovom proizvodu i tijekom skladištenja, a pronađena su još neka dodatna moguća onečišćenja koja bi trebalo daljnjim analizama potvrditi.

Impurities in New Drug Substances, 2006a, International Conference on Harmonisation, Q1A(R2)

Impurities in New Drug Substances, 2006a, International Conference on Harmonisation, Q3A(R2)

Impurities in New Drug Products, 2006b, International Conference on Harmonisation, Q3B(R2)

Impurities in New Drug Substances, 2006a, International Conference on Harmonisation, Q3C(R6)

Kazakevich Y, LoBrutto R. Introduction. U: HPLC for Pharmaceutical Scientists, New Jersey, Wiley, 2007, str. 3-25.

Kleinman MH, Baertschi SW, Alsante KM, Reid DL, Mowery MD, Shimanovich R, Foti C, Smith WK, Reynolds DW, Nefliu M, Ott MA. In Silico Prediction of Pharmaceutical Degradation Pathways: A Benchmarking Study. *Mol Pharm*, 2014, str. 4179–4188.

Parasuraman S, Rao A, Balamurugan S, Muralidharan S, Jayaraj Kumar K, Vijayan V. An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation. *Pharm Methods*, 2014, str. 47-55.

Rasmussen HT. Method development. U: Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. Ahuja S, Scypinski S, urednici, San Diego, Academic Press, 2001, str. 345-374.

Shaikh T, Hussain S. Ultra high performance liquid chromatography (UPLC): A new trend in analysis. *World J Pharm Res*, 2016, str. 387-394.

Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*, 2006, str. 489–504.

Singh DK, Sahu A, Wani AA, Bharatam PV, Kotimoole CN, Batkulwar KB, Deshpande AY, Giri S, Singh S. Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations. 10: LC-

HRMS, LC-MSn, LC-NMR and NMR characterization of fosamprenavir degradation products and in silico determination of their ADMET properties. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, str. 165-178.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. High-Performance Liquid Chromatography. U: Fundamentals of Analytical Chemistry, deveto izdanje, Belmont, USA, Brooks/Cole, 2014, str. 912-935.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Mass spectrometry. U: Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th Edition, Belmont, USA, Brooks/Cole, 2014, str. 802-817.

Snyder Lloyd R., Kirkland Joseph J., Glajch Joseph L., Practical HPLC method development str. 233-291.

Telzir SPC, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/telzir-epar-product-information_en_pristupljeno_10.03.2021.

Watson DG, Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists, Churchill Livingstone, 1999, str. 167-170., 237-240.

Završnik D, Bečić F, Murić L, Muratović S, Medić Šarić M. Ciklus razmnožavanja HIV-a i mjesta djelovanja antiretrovirusnih lijekova. *Farmaceutski glasnik*, 2005, str. 49 – 66.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati razgradne produkte fosamprenavira brzom metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenom spektroskopijom te pokazati koji su vjerojatniji razgradni produkti koji će nastati tijekom razgradnje i čuvanja lijeka uz pomoć dostupnog znanja, literature te predviđanja Zeneth računalnog programa.

Uzorci fosamprenavira podvrgnuti su razgradnji pri različitim uvjetima: u 5 M HCl, u 5 M NaOH, u 30 %-tnom H₂O₂, izlaganjem svjetlosti tijekom 24 sata, zagrijavanjem jedan sat na 80 °C te 48 sati na 105 °C. Najprije su na uzorcima primijenjeni nešto blaži uvjeti razgradnje te su analizirani tekućinskom kromatografijom kako bi se provjerilo da je došlo do razgradnje zaključivši da uvjete treba podesiti, pa su potom uzorci na gore navedenim jačim uvjetima analizirani masenom spektroskopijom. Razgradni produkti su ionizirani pozitivnim načinom ionizacije, a nastali ioni su razdvajani po omjeru mase i naboja. Dobiveni su kromatogrami i maseni spektri razgradnih produkata koji su prikazani u ovom radu te su povezani sa strukturama svih razgradnih produkata. Neke od struktura su poznate u literaturi, neke su predviđene Zeneth računalnim programom, a neke do sad nepoznate su predložene i zahtijevaju dodatnu potvrdu daljnim analizama. Sve strukture su nacrtane u programu Chemdraw i prikazane zajedno s molekulskom masom koju računa sam program.

Fosamprenavir se najviše razgradio u oksidacijskim uvjetima razgradnje gdje je nastalo nekoliko novih i nepoznatih produkata masa: 516,15, 602,19, 316,11, 616,17, 560,18, 504,22, 536,21. Razgradnji fosamprenavira s klorovodičnom kiselinom je svojstven nastanak produkta mase 620,16, dok je bazičnom hidrolizom nastao produkt mase 418,18 koji nastaje i zagrijavanjem, gdje je još nastao i jedan novi razgradni produkt mase 522,18. Iz literature poznat razgradni produkt mase 431,19 nastaje oksidacijom, zagrijavanjem te razgradnjom pod utjecajem svjetlosti, s tim da svjetlost uzrokuje formiranje i produkta mase 572,22. Pri svim uvjetima razgradnje nastali su razgradni produkti mase 472,17 i 506,23 poznati u literaturi i predviđeni računalnim programom te su u malim količinama prisutni i u nerazgrađenom uzorku fosamprenavira.

The aim of this study was to analyze the degradation products of fosamprenavir using a fast method of ultra high performance liquid chromatography associated with mass spectroscopy and to show which are more likely degradation products that will arise during the drug decomposition and storage using available knowledge, literature and prediction by the Zeneth software.

Fosamprenavir samples were degraded under different conditions: in 5 M HCl, in 5 M NaOH, in 30 % H₂O₂, exposure to light for 24 hours, heating for one hour at 80 °C, and 48 hours at 105 °C. Slightly milder decomposition conditions were first applied to the samples and such samples were analyzed by liquid chromatography to verify that decomposition occurred, thus concluding that the conditions should be adjusted, and then the samples were analyzed by mass spectroscopy on the above stronger conditions. The degradation products are ionized by the positive way of ionization and ions are separated by mass-to-charge ratio. Chromatograms and mass spectra of degradation products have been obtained which are presented in this paper, and are connected with the structures of all degradation products. Some of the structures are known in the literature, some have been predicted by the Zeneth software, and some so far unknown are proposed and require additional confirmation by further analysis. All structures are drawn in the Chemdraw program and shown together with the molecular mass calculated by the program itself.

Fosamprenavir degraded the most in oxidative degradation conditions where several new and unknown mass products were formed: 516.15, 602.19, 316.11, 616.17, 560.18, 504.22, 536.21. Degradation of fosamprenavir with hydrochloric acid is inherent in the formation of a product with a mass of 620.16, while basic hydrolysis has resulted in a product of mass 418.18 which is also formed by heating, where a new degradation product with a mass of 522.18 was formed too. The degradation product of mass 431.19 known from the literature is formed by oxidation, heating and decomposition under the light exposure, which also causing the formation of product of mass 572.22. Degradation products of masses 472.17 and 506.23 were created under all conditions of decomposition, also have been known in the literature, provided by a software and are present in small quantities even in the undegraded sample of fosamprenavir.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRISILNA RAZGRADNJA FOSAMPRENAVIRA I ANALIZA RAZGRADNIH PRODUKATA LC-MS TEHNIKOM

Laura Gubić

SAŽETAK

Razgradni produkti fosamprenavira analizirani su brzom metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenom spektrometrijom. Uzorci fosamprenavira podvrgnuti su razgradnji pri različitim uvjetima: u 5 M HCl, u 5 M NaOH, u 30 %-tnom H₂O₂, izlaganjem svjetlosti tijekom 24 sata, zagrijavanjem 1 sat na 80 °C te 48 sati na 105 °C. Analizom tekućinskom kromatografijom su se provjerili uvjeti i je li došlo do odgovarajućeg stupnja razgradnje te zaključivši da uvjete treba podesiti uzorci su na gore navedenim jačim uvjetima analizirani masenom spektroskopijom. Razgradni produkti su ionizirani pozitivnim načinom ionizacije, a nastali ioni su razdvajani po omjeru mase i naboja. Dobiveni su kromatogrami i maseni spektri razgradnih produkata te su povezani sa strukturama svih razgradnih produkata. Neke od struktura su poznate u literaturi, neke su predviđene Zeneth računalnim programom, a neke do sad nepoznate su predložene i zahtijevaju dodatnu potvrdu daljnim analizama. Sve strukture su nacrtane u programu Chemdraw i prikazane zajedno s molekulskom masom koju računa sam program. Fosamprenavir se najviše razgradio u oksidativnim uvjetima gdje je nastalo nekoliko novih i nepoznatih produkata masa: 516,15, 602,19, 316,11, 616,17, 560,18, 504,22, 536,21. Razgradnji s HCl je svojstven nastanak produkta mase 620,16, a bazičnom hidrolizom je nastao produkt mase 418,18. Pri svim uvjetima razgradnje nastali su produkti masa 472,17 i 506,23 poznati u literaturi te prisutni i u netretiranom uzorku fosamprenavira.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 65 stranica, 68 grafičkih prikaza, 4 tablice i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fosamprenavir, prisilna razgradnja, masena spektrometrija, LC-MS

Mentor: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biljana Nigović**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ana Mornar Turk, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Kornelija Lasić, vanjski suradnik, Teva api I&R analitika

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytics and drugs control
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

FORCED DEGRADATION STUDY OF FOSAMPRENAVIR AND THE ANALYSIS OF ITS DEGRADATION PRODUCTS USING LC-MS TECHNIQUE

Laura Gubić

SUMMARY

The degradation products of fosamprenavir were analyzed using a fast method of ultra-high performance liquid chromatography associated with mass spectrometry. Fosamprenavir samples were degraded under different conditions: in 5 M HCl, in 5 M NaOH, in 30 % H₂O₂, exposure to light for 24 hours, heating for 1 hour at 80 °C and 48 hours at 105 °C. Liquid chromatographic analysis was used to verify the conditions and an adequate degree of degradation, thus concluding that the conditions should be adjusted, so the samples were analyzed by mass spectroscopy under the above-mentioned stronger conditions. The degradation products were ionized by the positive ionization method and the ions were separated by mass-to-charge ratio. Chromatograms and mass spectra of degradation products have been obtained and connected with the structures of all degradation products. Some of the structures are known in the literature, some have been predicted by the Zeneth software, and some so far unknown are proposed and require additional confirmation by further analysis. All structures are drawn in the Chemdraw program and shown together with the molecular mass calculated by the program itself. Fosamprenavir degraded the most in oxidative degradation conditions where several new and unknown mass products were formed: 516.15, 602.19, 316.11, 616.17, 560.18, 504.22, 536.21. Degradation of fosamprenavir with HCl has resulted in the formation of a product with a mass of 620.16, while basic hydrolysis has resulted in a product mass of 418.18. Products of masses 472.17 and 506.23 were produced under all conditions, known in the literature and present in an untreated sample of fosamprenavir.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 65 pages, 68 figures, 4 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Fosamprenavir, forced degradation, mass spectrometry, LC-MS

Mentor: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Mornar Turk, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kornelija Lasić, Ph.D. *External Associate*, Teva api R&D Analytics

The thesis was accepted: June 2021.

