

# Identifikacija, strukturna karakterizacija i određivanje palbocikliba primjenom HPLC-DAD-MS/MS metode

---

Ivanušić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:753310>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivana Ivanušić

Identifikacija, strukturna karakterizacija i  
određivanje palbocikliba primjenom HPLC-DAD-  
MS/MS metode

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvale:

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na strpljenju i povjerenju kojeg mi je iskazala te za sve savjete i riječi ohrabrenja koje mi je s osmjehom na licu uputila tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, Ivanu i Ljubici, i teti Đurđi na neprekidnoj podršci, razumijevanju i čokoladama. Sa mnom ste iščekivali rezultate svakog ispita, nije nam bilo lako. Hvala vam što ste vjerovali u mene!

## SADRŽAJ

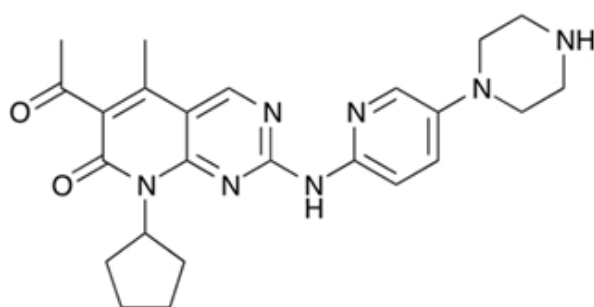
<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. PALBOCIKLIB .....	1
1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA .....	4
1.2.1. Detektori .....	6
1.3. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA .....	8
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	11
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Uzorak i standard .....	12
3.1.2. Otapala i kemikalije .....	12
3.1.3. Radni instrumenti i pribor .....	12
3.1.4. Programski paketi .....	13
3.2. METODE .....	13
3.2.1. Priprema otopine standarda .....	13
3.2.2. Priprema otopine uzorka .....	13
3.2.3. Priprema mobilne faze .....	13
3.2.4. Provjera koncentracije otopina UV-Vis spektrofotometrijom .....	14
3.2.5. Izrada kalibracijske serije otopina standarda .....	14
3.2.6. Kromatografski uvjeti .....	14
3.2.7. Uvjeti za masenu spektrometriju .....	15
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	16
4.1. PROVJERA KONCENTRACIJA OTOPINA UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJOM..	16
4.2. ANALIZA STANDARDA .....	17
4.3. ANALIZA UZORKA I USPOREDBA REZULTATA .....	24
4.4. ODREĐIVANJE PALBOCIKLIBA U UZORKU .....	28
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	30
<b>6. LITERATURA</b> .....	31
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	33
7.1. SAŽETAK .....	33
7.2. SUMMARY .....	34
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA</b> .....	35

# 1. UVOD

## 1.1. PALBOCIKLIB

Palbociklib (Ibrance®) je novi lijek za liječenje karcinoma dojke razvijen od tvrtke Pfizer Inc. Indiciran je za liječenje ER-pozitivnog (pozitivnog na estrogenske receptore) i HER2-negativnog raka dojke (negativnog na receptore humanog epidermalnog faktora rasta 2). Koristi se u kombinaciji s letrozolom (inhibitor aromataze) za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastazirajućeg raka dojke kod postmenopausalnih žena ili u kombinaciji s fulvestrantom kod žena s progresijom bolesti nakon endokrine terapije ([www.pfizer.com](http://www.pfizer.com)). U SAD-u je odobren 2015. godine ubrzanim postupkom Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), a u Hrvatskoj je odobren u rujnu 2016. godine centraliziranim postupkom davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet za sve zemlje članice Europske unije temeljem stručne ocjene Europske agencije za lijekove ([www.ema.europa.eu/ema/](http://www.ema.europa.eu/ema/)).

Molekulska formula palbocikliba je  $C_{24}H_{29}N_7O_2$ , a molarna masa je 447,54 g/mol. Kemijsko ime palbocikliba je 6-acetil-8-ciklopentil-5-metil-2- {[5-(piperazin-1-il)piridin-2-il]amino} pirido [2,3-d]pirimidin-7(8H)-on, a struktura je prikazana na slici 1.



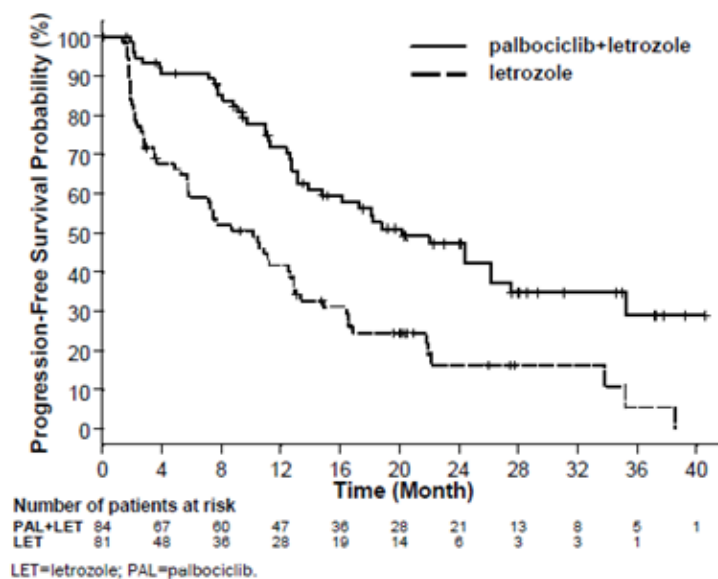
Slika 1. Kemijska struktura palbocikliba

Palbociklib je žut do narančast prah s pKa 7,4 (sekundarni piperazinski dušik) i 3,9 (piridinski dušik). Kod pH 4 i niže, palbociklib je visoko topljiv spoj, a iznad pH 4 topljivost mu se značajno smanjuje ([www.pfizer.com](http://www.pfizer.com)).

Mehanizam djelovanja je selektivna i reverzibilna inhibicija ciklin-ovisnih kinaza 4 i 6 (CDK4 i CDK6) koje igraju ključnu ulogu u regulaciji rasta i proliferacije stanica raka. U stanicama karcinoma dojke koji su ER-pozitivni, aktivnost CDK4 i CDK6 je povećana što pomaže nekontroliranoj proliferaciji stanica raka. Blokiranjem CDK4 i CDK6, palbociklib usporava rast i proliferaciju ER-pozitivnih stanica raka dojke ([www.pfizer.com](http://www.pfizer.com)).

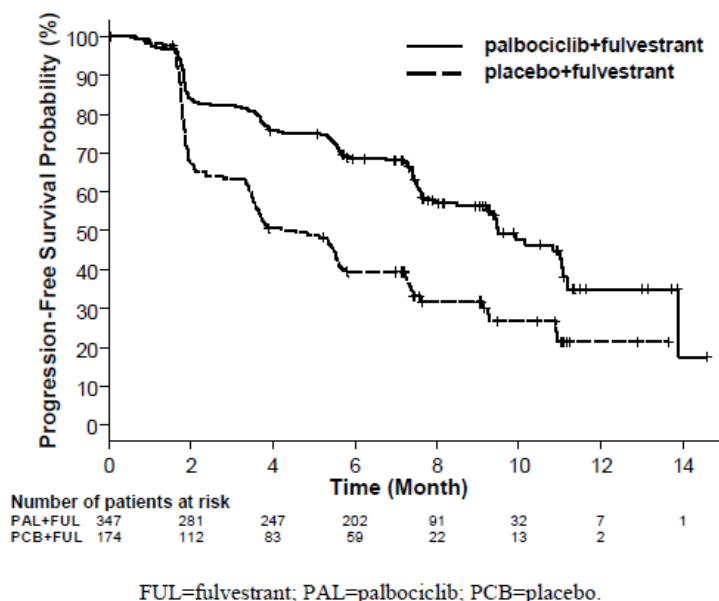
Dvije glavne kliničke studije III. faze (PALOMA 2 i 3) pokazale su da palbociklib u kombinaciji s letrozolom ili fulvestrantom značajno produžuje vrijeme preživljenja bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*, PFS).

Studija PALOMA 2 uključivala je 666 žena u postmenopauzi čiji se rak dojke počeo širiti i koje još nisu bile liječene od raka. Primale su palbociklib i letrozol ili placebo i letrozol. Žene koje su primale palbociklib i letrozol živjele su prosječno 24,8 mjeseci bez pogoršanja bolesti u usporedbi sa 14,5 mjeseci za žene koje su uzimale placebo i letrozol ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Na slici 2 prikazane su krivulje koje prikazuju odnos vremena (mjeseci) i vjerojatnosti preživljenja bez progresije bolesti koje su proizašle iz studije PALOMA 2.



Slika 2. Kaplan-Meier krivulje PSF-a - palbociklib i letrozol (studija PALOMA 2)

Studija PALOMA 3 je obuhvaćala 521 ženu sa metastatskim rakom dojke koji se pogoršao nakon hormonske terapije. One su uzimale palbociklib i fulvestrant ili placebo i fulvestrant. Žene koje su uzimale palbociklib uz fulvestrant živjele su u prosjeku 11,2 mjeseci bez pogoršanja bolesti u usporedbi s 4,6 mjeseci za žene koje su uzimale placebo i fulvestrant ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Na slici 3 prikazana je ovisnost vremena u mjesecima i vjerojatnost preživljenja bez progresije bolesti.



Slika 3. Kaplan-Meier krivulje PFS-a - palbociklib i fulvestrant (studija PALOMA 3)

Palbociklib se uzima oralnim putem, biodostupnost mu je 46%, a na tržištu je dostupan u obliku kapsula od 75 mg, 100 mg i 125 mg. Metabolizira se preko CYP3A i SULT2A1 enzima i eliminira iz tijela uglavnom u obliku metabolita preko fecesa (74,1%) i mokraće (17,5%).

Preporučena doza je 125 mg palbocikliba, jednom dnevno uz jelo, 21 dan za redom, a onda 7 dana pauze tijekom kojih se i dalje uzima letrozol ili fulvestrant. Najčešće nuspojave kod korištenja palbocikliba su: neutropenija, infekcije, leukopenija, umor, mučnina, stomatitis, anemija, alopecija i dijareja. Nuspojave se smanjuju ili nestaju smanjenjem doze palbocikliba (na 100 mg ili 75 mg) ili većom pauzom između ciklusa uzimanja palbocikliba.

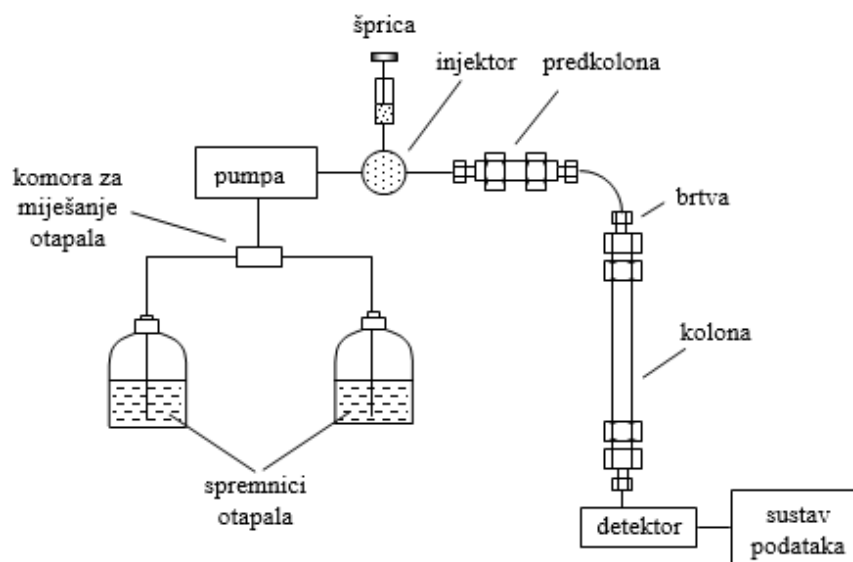
Studije rađene na životinjama, a i sam mehanizam djelovanja lijeka, ukazuju na mogućnost embrio-fetalne toksičnosti palbocikliba kod primjene na trudnim ženama. Zbog toga se ženama reproduktivne sposobnosti savjetuje korištenje odgovarajuće kontracepcije tijekom uzimanja palbocikliba i još najmanje tri tjedna nakon uzimanja zadnje doze (www.pfizer.com).

## 1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografske metode najčešće su primjenjivane metode u analitici i kontroli lijekova. One omogućavaju brzo i djelotvorno razdvajanje složenih smjesa te identifikaciju i kvantitativnu analizu odijeljenih sastojaka uzorka. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je kromatografska metoda odjeljivanja u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze (veličine 3-10  $\mu\text{m}$ ) noseći sastavnice uzorka (Ahuja, 2005). Molekule uzorka putuju niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između mobilne i stacionarne faze. Odijeljene sastavnice uzorka se najčešće dokazuju apsorpcijom u određenom UV području. U analitici i kontroli lijekova HPLC se široko primjenjuje u ispitivanju čistoće za kontroliranje srodnih onečišćenja i određivanje sadržaja aktivne sastavnice i pomoćnih tvari, a rjeđe za identifikaciju spojeva temeljem vremena zadržavanja ispitivane tvari ( $t_R$ ) (Kazekevich, 2007).

Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze (bira se prema karakteristikama ispitivanog analita), a može se temeljiti na razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te stereokemijskim interakcijama. Tekućinski kromatograf uključuje sustav za unošenje uzorka (1-200  $\mu\text{L}$ ), spremnike mobilne faze i sustav za obradu otapala koji osigurava da u mobilnoj fazi nema otopljenih plinova, crpku koja omogućava visoke tlakove (do 300 bara), kolonu (ponekad i pretkolonu) te detektor (Nigović, 2014a). Shematski prikaz kromatografa prikazan je na slici 4.





Slika 4. Shematski prikaz HPLC kromatografa

U tekućinskoj kromatografiji koriste se različite stacionarne faze. U kromatografiji obrnutih faza najčešće se upotrebljavaju nepolarne stacionarne faze oktadecilsilil i oktilsilil silikagel (kemijski modificirane površine silikagela – C18 i C8). U kromatografiji normalnih faza obično se primjenjuje nemodificirani silikagel kao polarna stacionarna faza (Nigović i sur., 2014b).

Mobilnu fazu najčešće čini smjesa otapala različite polarnosti. Kod kromatografije normalnih faza koriste se heksan, diklormetan, izopropanol ili metanol, a kod kromatografije obrnutih faza voda, acetonitril, metanol ili tetrahidrofuran (često se dodaje i pufer). Izbor optimalne mobilne faze važan je u ispitivanju profila čistoće lijeka. U kromatografskom postupku može se primijeniti izokratična elucija stalnim sastavom mobilne faze ili gradijentna elucija tijekom koje se mijenja sastav mobilne faze kako bi se u što kraćem vremenu osiguralo potpuno razdvajanje svih analita. Temperatura također utječe na vrijeme zadržavanja na način da se povećanjem temperature vrijeme zadržavanja analita skraćuje (Nigović, 2014a).

Kvantitativna analiza spojeva pomoću HPLC-a može se napraviti na nekoliko načina. Ako se koristi metoda s vanjskim standardom uspoređuje se površina pika ispitivane tvari s površinom pika poredbene otopine. Kod metode s unutrašnjim standardom sadržaj ispitivane tvari određuje se usporedbom omjera površine pika ispitivane tvari i unutrašnjeg standarda s omjerom površine pika poredbene tvari i unutrašnjeg standarda. U postupku kalibracije upotrebljava se koncentracijski niz poredbenih otopina. Kalibracijska krivulja dobiva se

mjerenjem niza poredbenih otopina različitih koncentracija za koje je odnos površine pikova i koncentracije linearan. Pomoću kalibracijske krivulje i izmjerene površine pika ispitivanje tvari izračuna se sadržaj ispitivane tvari (Nigović, 2014a).

### 1.2.1. Detektori

Nakon odjeljivanja na kromatografskoj koloni analiti se detektiraju pomoću različitih detektora. Neki od njih su: detektor niza dioda (engl. *Diode array UV detector*, DAD), elektrokemijski detektor (ECD), fluorescencijski detektor (FC) i detektor rasipanja svjetlosti uparivačem (engl. *Evaporative light-scattering detector*, ELSD).

#### DAD detektor

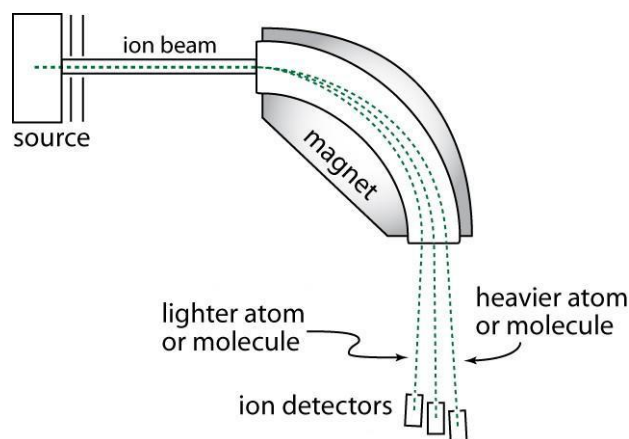
DAD detektor (detektor niza dioda) je najčešće korišten detektor, ali se može primjenjivati samo za analizu uzoraka čiji spojevi imaju kromofor. DAD snimi cijeli UV spektar svakog pika u kromatogramu (Nigović, 2014a).

#### Masena spektrometrija

Tekućinska kromatografija se često veže uz neku drugu tehniku pa dobijemo spregnute sustave kao što su LC/MS, LC/MS/MS ili LC/NMR. Ovdje ćemo detaljnije opisati masenu spektrometriju i vezani sustav LC/MS.

Masena spektrometrija je analitička tehnika kojom se određuje molekulska masa analita (i bilo kojeg fragmenta te molekule koji je nastao njenim cijepanjem) pretvarajući ga u nabijene ione. Za razliku od neutralnih spojeva, kretanje i smjer iona lako je manipulirati i detektirati (Dass, 2007).

Spektrometar mase je uređaj koji se sastoji od sustava za unošenje uzorka, ionizatora, analizatora mase i detektora (Slika 5). Metoda se temelji na ioniziranju molekula u visokom vakuumu pri čemu se ioni stvaraju u plinovitoj fazi, a potom se pomoću električnog ili magnetskog polja razdvajaju prema omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Detektor sakuplja i mjeri količinu iona (Nigović, 2014a; Dass, 2007).



Slika 5. Pojednostavljena shema masenog spektrografa

Ionizacija je proces kojim molekula ili atom dobiva negativni ili pozitivni naboj primanjem, odnosno gubitkom nositelja naboja. Dakle, u prvom koraku molekule ili atomi analita pretvaraju se u ione u plinovitom stanju. U drugom koraku slijedi razdvajanje molekulskih iona na temelju omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Na kraju, struja iona se mjeri, amplificira i prikazuje kao spektar mase. Sve se, osim nekih tehnika ionizacije, odvija u visokom vakuumu kako bi se ioni kretali slobodni od kolizija (Ekman i sur, 2009; Dass, 2007).

Ionizacija molekula provodi se djelovanjem snopa elektrona (engl. *Electron impact*, EI), kemijskom ionizacijom (engl. *Chemical ionization*, CI), elektrosprej ionizacijom (engl. *Electrospray ionization*, ESI), kemijskom ionizacijom kod atmosferskog tlaka (engl. *Atmospheric- pressure chemical ionisation*, APCI) ili matriksom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (engl. *Matrix- assisted laser desorption ionization*, MALDI). Najčešće se koristi ESI pri čemu uzorak iz kolone prolazi kroz usku kapilaru na čijem kraju djeluje visoki potencijal te se uzorak rasprši djelovanjem atmosferskog tlaka. Strujanjem dušika otapalo ispari, a kapljica se pretvara u ione u plinovitom stanju. Moguće je dobiti jednostruko ili višestruko nabijene ione, ovisno o broju skupina na molekuli koje se mogu ionizirati. Prilikom ionizacije može doći do fragmentacije molekule ili do nastanka različitih adukta sa molekulama i ionima otapala. Kod elektrosprej ionizacije uzorak analita otopljen je u polarnom, lako hlapljivom otapalu. S obzirom na to da se uzorak ionizira iz otopine, elektrosprej ionizatori često se povezuju sa tekućinskim metodama razdvajanja, kao što je tekućinska kromatografija. Kao rezultat dobivaju se LC-MS vezani sustavi (Nigović, 2014a; Dass, 2007).

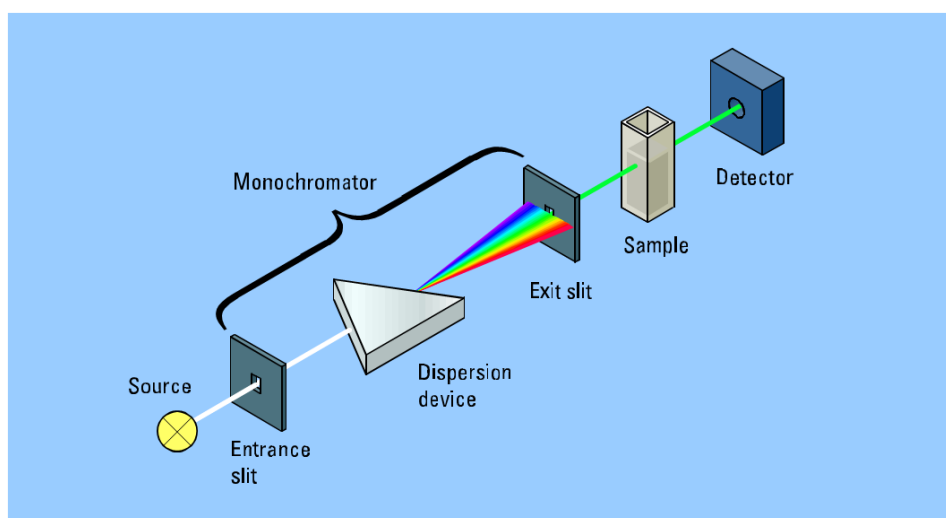
Ionizirani analiti se razdvoje u analizatoru koji razdvaja ione različitog omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Postoje različiti tipovi analizatora koji se razlikuju prema načinu rada, preciznosti i razlučivosti. Vrste analizatora za razdvajanje iona su magnetski analizator, kvadrupolni analizator masa, „stupica iona“ analizator (engl. ion trap) i analizator vremena leta (TOF). Analizator „stupica iona“ koristi trodimenzionalno električno polje i omogućava fragmentaciju molekule i tandem analize u vremenu ( $MS^n$  analize). Dvojna ili tandem spektrometrija mase u vremenu ( $MS/MS$ ,  $MS^n$ ) odnosi se na korištenje više stupnjeva fragmentacije i analize mase u jednom instrumentu. Na taj se način dobiva mogućnost odabira, razdvajanja i ponovne fragmentacije iona određene mase. Cilj je izdvajanje jednog iona iz smjese i njegova fragmentacija čime se dobiju dodatne informacije o strukturi molekule (Nigović, 2014a).

LC-MS sustav se u analitici lijekova koristi za istraživanje i razvoj lijekova, detekciju, identifikaciju, strukturnu karakterizaciju i kvantitativnu analizu onečišćenja u lijekovima, analizu lijekova i metabolita u biološkim tekućinama te u proteomici. Visoko je selektivna, osjetljiva i ima niske granice detekcije. Ne koristi se u rutinskoj kontroli kakvoće lijekova jer je maseni spektrometar relativno skup instrument i zahtjeva posebno obrazovanog stručnjaka (Nigović, 2014a).

### 1.3. UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJA

UV-Vis spektrofotometrija je analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju, ispitivanje čistoće i određivanje sadržaja aktivnih i pomoćnih ljekovitih tvari. Primjena UV-Vis spektrofotometrije u kvalitativnoj analizi lijekova temelji se na činjenici da energija osnovnog i pobuđenog stanja elektrona ovisi o strukturi molekule. Valna duljina pri kojoj molekula apsorbira ovisi o jakosti kojom su vezani njezini elektroni u nezasićenim funkcionalnim skupinama koje apsorbiraju u ultraljubičastom i vidljivom području. Spektar se dobiva kontinuiranim mijenjanjem valne duljine u području od 200 nm do 400 nm za ultraljubičasto, odnosno od 400 nm do 800 nm za vidljivo područje, te usporednim bilježenjem intenziteta izlazne zrake. Takav će spektar imati jedan ili više apsorpcijskih maksimuma koji odgovaraju pojedinim prijelazima elektrona u pobuđeno stanje (Nigović i sur., 2014b).

Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor zračenja (deuterijeva lampa za ultraljubičasto područje i živina odnosno volframova lampa za vidljivo područje), monokromator (služi za disperziju svjetlosti koja će se dalje odjeliti na prorezima pukotine, može biti prizma ili rešetka s ulaznom i izlaznom pukotinom), nosač uzorka i odgovarajući detektor zračenja. (Slika 6). Ispravnost instrumenta ispituje se kalibracijom skale valnih duljina i apsorbancije (Nigović, 2014a).



Slika 6. Pojednostavljen prikaz Uv-Vis spektrofotometra

Ukoliko nije drugačije propisano, izmjeri se apsorbancija otopine na propisanoj valnoj duljini, u kiveti debljine sloja 1 cm i na temperaturi od  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Apsorbancija ispitivane otopine mjeri se (ukoliko nije drugačije propisano) u odnosu prema slijepom uzorku, istom otapalu ili smjesi otapala. Otapala za UV spektrofotometriju trebaju biti čista, kako bi se izbjegao utjecaj onečišćenja na apsorbanciju ispitivane otopine. Koncentracija ispitivane otopine treba biti takva da izmjerena apsorbancija u kiveti debljine sloja 1 cm bude između 0,5 i 1,5, ovisno o karakteristikama mjernog instrumenta. U apsorpcijskom se spektru na ordinatu nanose vrijednosti apsorbancije ili funkcije apsorbancije, a na apscisu odgovarajuće vrijednosti valne duljine ili funkcije valne duljine.

UV-Vis spektrofotometrija nije specifična metoda za ispitivanje identiteta. Apsorpcijska krivulja pokazuje nekoliko minimuma i maksimuma pa UV spektar ne može biti jedini kriterij za identifikaciju. Poredbene tvari obično se ne upotrebljavaju u postupku identifikacije, već se potvrda identiteta farmaceutske sirovine provodi usporedbom valne duljine maksimuma apsorpcije ( $\lambda_{\max}$ ) ili specifične apsorpcije ( $A^{1\%}_{1\text{cm}}$ ) ispitivane tvari s propisanim vrijednostima u monografiji (Nigović i sur., 2014b).

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja izvodi se izravnim mjerenjem apsorpcije farmaceutske tvari u ultraljubičastom i vidljivom području ili nakon provedene kemijske reakcije. Postupak određivanja sadržaja analita nakon derivatizacije odlikuje se nižim stupnjem točnosti. U najvećem broju farmakopejskih monografija kvantitativna analiza farmaceutskih tvari UV-Vis spektrofotometrijom temelji se na određivanju sadržaja pomoću specifične apsorpcije ispitivane tvari, a rjeđe na usporedbi apsorpcije ispitivane i poredbene otopine ili pomoću kalibracijske krivulje dobivene mjerenjem niza poredbenih otopina različitih koncentracija kod kojih je odnos između apsorpcije i koncentracije linearan (Nigović i sur., 2014b).

Apsorpcija svjetla u UV-Vis području može se upotrijebiti u ispitivanju čistoće farmaceutskih tvari ako ispitivano onečišćenje i farmaceutska tvar imaju apsorpcijski maksimum na različitim valnim duljinama ili različitu apsorpciju na istoj valnoj duljini (Perkampus, 2012).

Važne značajke ove metode u kvantitativnoj primjeni su široka primjenjivost, velika osjetljivost, umjerena ili velika selektivnost, prihvatljiva točnost (relativna pogreška određivanja koncentracije pojavljuje se u području od 1 do 5%) i jednostavnost (Nigović i sur., 2014b).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rak dojke je najčešća vrsta karcinoma u žena diljem svijeta i drugi najčešći rak u cijeloj populaciji, a svake je godine uzrok smrti čak pola milijuna ljudi (većinom žena). U Hrvatskoj je svake godine dijagnosticirano oko 2400 novih slučajeva raka dojke i uzrok je smrti 1000 žena godišnje. Najčešći tip raka dojke je ER-pozitivni, HER2-negativni rak dojke (74% slučajeva) koji ujedno ima i najbolju prognozu ako liječenje počne dovoljno rano ([www.who.int](http://www.who.int)).

Palbociklib je novi lijek odobren za liječenje upravo tog tipa raka dojke, a koristi se u kombinaciji s letrozolom ili fulvestrantom. Palbociklib predstavlja značajni napredak u terapiji karcinoma dojke jer dokazano produkuje vrijeme preživljenja oboljelih žena bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*) ([www.pfizer.com](http://www.pfizer.com)).

Cilj ovog rada je identifikacija, strukturna karakterizacija i određivanje palbocikliba u uzorku aktivne ljekovite tvari pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenim spektrometrom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak i standard

- Uzorak - palbociklib, 2,5mg (MedChem Express, Sollentuna, Švedska)
- Standard - palbociklib HCL, 5mg (Selleck Chemicals, Houston, TX, SAD)

##### 3.1.2. Otapala i kemikalije

- Acetonitril za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Mravlja kiselina 98-100%, p.a. čistoće (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Dimetilsulfoksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Ultračista deionizirana voda provodljivosti 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$
- Helij čistoće za kromatografiju (Messer, Gumpoldskirchen, Austrija)

##### 3.1.3. Radni instrumenti i pribor

- analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Ealdbrom, Njemačka)
- kolona za tekućinsku kromatografiju Symmetry C18 dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, SAD)
- stakleni sustav za filtriranje pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji (Sartorius, Goettingen, Njemačka)
- spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, Waldbrom, Njemačka)
- sustav za pročišćavanje vode Waterpro (Labconco, Kansas City, MI, SAD)
- generator dušika NM30LA (Peak Scientific, Renfrewshire, UK)
- mikropipeta 100-1000  $\mu\text{m}$  (Rainin, Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- bočice za uzorkovanje (1,5 mL) sustavom za tekućinsku kromatografiju (Agilent Technologies, Waldbrom, Njemačka)



### 3.1.4. Programski paketi

- Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- HP845 UV-Visible Chemstation System Rev. A. 07.02 (Agilent Technologies, Mulgrave, SAD)
- Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, SAD)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema otopine standarda

Otopina standarda je pripravljena vaganjem 0,9 mg standarda palbocikliba u odmjernoj tikvici od 5 mL i nadopunjavanjem tikvice do oznake s dimetilsulfoksidom (DMSO). Tako pripravljenoj otopini koncentracija je 0,18 mg/mL. Otopina se čuva na sobnoj temperaturi jer je dovoljno stabilna, a ledište dimetilsulfoksida je 18,5°C. Za HPLC analizu otopina standarda je dodatno razrijeđena do masene koncentracije 0,05 mg/mL.

### 3.2.2. Priprema otopine uzorka

Otopina uzorka pripravljena je vaganjem 0,7 mg uzorka palbocikliba u odmjernoj tikvici od 5 mL i nadopunjavanjem tikvice do oznake s DMSO. Koncentracija tako pripravljene otopine je 0,14 mg/mL. Otopina uzorka se čuva na sobnoj temperaturi kao i otopina standarda. Otopina je dodatno razrijeđena za HPLC analizu na 0,05 mg/mL.

### 3.2.3. Priprema otapala mobilne faze

Otapalo A čini acetonitril i 0,1% HCOOH (mravlja kiselina), a pripravljeno je u odmjernoj tikvici od 250 mL pipetiranjem 250 µL mravlje kiseline i nadopunjavanjem tikvice acetonitriplom do oznake.

Otapalo B čini voda i 0,1% HCOOH, a pripravljeno je u odmjernoj tikvici od 250 mL pipetiranjem 250 µL mravlje kiseline i nadopunjavanjem tikvice ultračistom vodom do oznake.

### 3.2.4. Provjera koncentracije standarda i uzorka UV-VIS spektrofotometrijom

Zbog male odvage uzorka i standarda, koncentracija otopina je provjerena i ispravljena UV-Vis spektrofotometrijom. Za potrebe ovih mjerenja matične otopine uzorka i standarda su razrijeđene 10 puta s DMSO. Time smo dobili otopinu uzorka 2 s masenom koncentracijom 0,014 mg/mL i otopinu standarda 2 s masenom koncentracijom 0,018 mg/mL. Kao slijepa proba korišten je čisti dimetilsulfoksid, a mjerenje se provodilo na 355 nm.

### 3.2.5. Priprema kalibracijske serije otopina standarda

Serijski razrjeđenja napravljena je iz početne otopine standarda, čija masena koncentracija iznosi 0,18 mg/mL, razrjeđivanjem s dimetilsulfoksidom. Određeni volumeni otopine standarda i DMSO pipetirani su izravno u bočice za uzorkovanje i napravljeno je šest otopina sljedećih masenih koncentracija: 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,15 mg/mL.

### 3.2.6. Kromatografski uvjeti

Ispitivanje vremena zadržavanja palbocikliba provedeno je na Agilent 1100 kromatografskom sustavu i Waters Symmetry C18 koloni obrnutih faza, dimenzija 150 mm x 4,6 mm i veličine čestica 3,5  $\mu\text{m}$ . Valna duljina DAD detektora podešena je na 254 nm i 347 nm. Mobilna faza sastojala se od acetonitrila s 0,1% mravljom kiselinom kao eluenta A i ultračiste vode s 0,1% mravljom kiselinom kao eluenta B. Brzina protoka mobilne faze iznosila je 1 mL/min, temperatura kolone 25 °C, a volumen injektiranja 5  $\mu\text{L}$ . Gradijent se mijenjao tijekom optimizacije uvjeta (Tablica 1), a najboljim se pokazao gradijent 3 pa su s njime rađene daljnje analize.

Tablica 1. Ispitani gradijenti elucije kod HPLC analize

<b>br. gradijenta</b>	<b>min</b>	<b>% A (ACN + 0.1% HCOOH)</b>	<b>% B (voda + 0.1% HCOOH)</b>
<b>1</b>	0	10	90
	15	80	20
	25	10	90
<b>2</b>	0	10	90
	10	50	50
	15	10	90
<b>3</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>90</b>
	<b>5</b>	<b>30</b>	<b>70</b>
	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>90</b>

### 3.2.7. Uvjeti za masenu spektrometriju

Korišteni maseni spektrometar sastojao se od elektrosprej ionizatora (ESI) i analizatora stupica za ione. MS analiza provedena je uz elektrosprej ionizaciju u pozitivnom i negativnom načinu snimanja. Temperatura izvora iona podešena je na 350 °C, a napon na kapilari iznosio je + 3,5 kV. Dušik je korišten kao plin za sušenje i raspršivanje mobilne faze te su optimalni uvjeti ionizacije postignuti pri njegovom protoku od 10,0 L/min te tlaku 15 psi. Kao plin za koliziju korišten je helij. Maksimalno akumulacijsko vrijeme za ione bilo je 200 ms, a broj iona zadržanih u analizatoru (engl. *accumulation gain control target*, AGC target) podešen je na 30 000. Spektar snimanja masa iona bio je u rasponu od  $m/z$  100-600.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. PROVJERA KONCENTRACIJA OTOPINA UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIJOM

UV-Vis spektrofotometrom, na valnoj duljini 355 nm, izmjerena je apsorbancija otopina standarda i uzorka koje su pripravljene postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4. Izračunate su prave koncentracije otopina (Tablica 2) pomoću sljedećih formula:

$$A = \epsilon \times c \times l \quad \gamma = c \times M_w$$

- A je izmjerena apsorbancija na 355 nm
- $\epsilon$  je specifična apsorbancija palbocikliba koja na 355 nm iznosi 16751 L/mol cm
- c je molarna koncentracija otopine (mol/L)
- l je duljina puta, tj. debljina kivete i ona iznosi 1 cm
- molekulska masa ( $M_w$ ) palbocikliba je 447,53 g/mol
- $\gamma$  je masena koncentracija otopine

Tablica 2. Pretpostavljene i prave koncentracije otopina standarda i uzorka, pripravljene za UV-Vis analizu postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4., te izmjerene apsorbancije pri 355 nm

	$\gamma$ (otopine 2) /gL <sup>-1</sup>	A	c (otopine 2) /molL <sup>-1</sup>	$\gamma$ (otopine 2) /gL <sup>-1</sup> (prava)
<b>Standard</b>	0,018	0,69613	4,1558x10 <sup>-5</sup>	<b>0,01860</b>
<b>Uzorak</b>	0,014	0,69355	4,1403x10 <sup>-5</sup>	<b>0,01853</b>

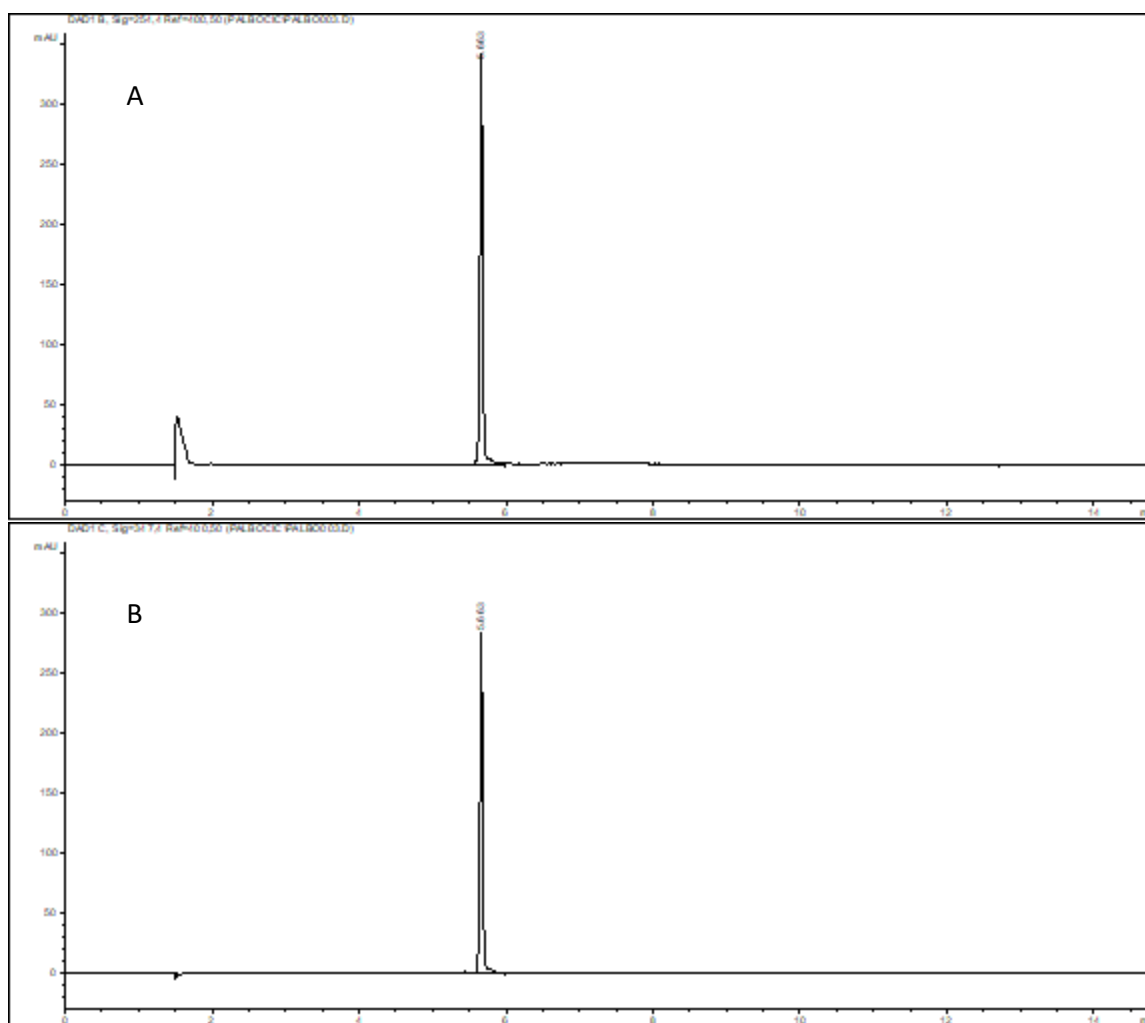
Ako je masena koncentracija otopine standarda za UV-Vis analizu 0,01860 g/L, to znači da je prava koncentracija matične otopine standarda 0,1860 g/L, a razrijeđena otopina pripravljena za HPLC analizu zapravo koncentracije 0,05171 g/L. Isto tako, prava masena koncentracija matične otopine uzorka je 0,1853 g/L, a koncentracija razrijeđene otopine uzorka za HPLC analizu je 0,06615 g/L.

Ispravljene masene koncentracije serije kalibracijskih otopina su: 0,001 g/L, 0,01 g/L, 0,041 g/L, 0,083 g/L, 0,103 g/L i 0,155 g/L.

## 4.2. ANALIZA STANDARDA

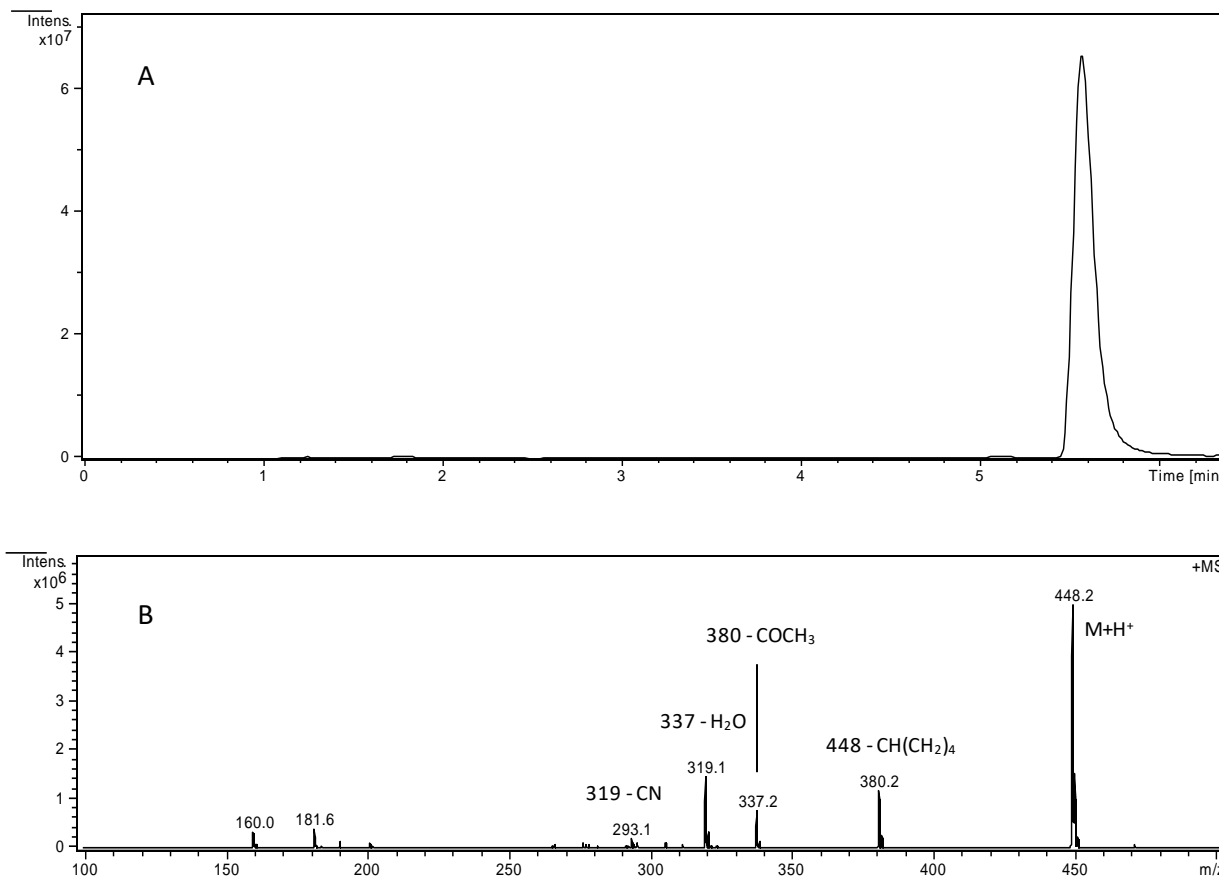
Provedbom HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> analize na otopini standarda (volumen injektiranja 5  $\mu$ L) dobivena su vremena zadržavanja palbocikliba, visina i površina pika te maseni spektar dobiven pozitivnom elektrosprej ionizacijom palbocikliba.

Vrijeme zadržavanja palbocikliba je 5,6 minuta, a kromatogrami dobiveni DAD detektorom mjereni na valnim duljinama 254 nm i 347 nm prikazani su na slici 7.



Slika 7. Kromatogram otopine standarda palbocikliba dobiven HPLC-DAD analizom, mjereno na valnim duljinama 254 (A) i 347 nm (B).

Kromatogram ukupne struje iona (engl. *total ion current*, TIC) dobiven HPLC-ESI-MS analizom i pripadajući maseni spektar dobiven dobiven elektrosprej ionizacijom otopine standarda palbocikliba u pozitivnom ionizacijskom načinu rada, prikazan je na slici 8.

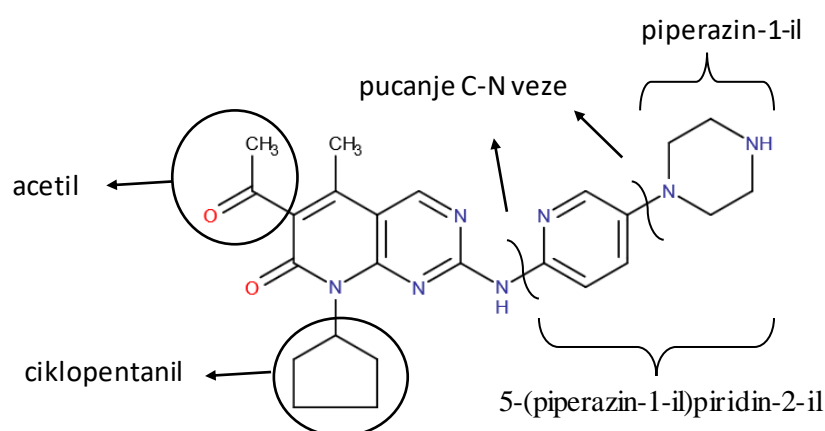


Slika 8. TIC kromatogram otopine standarda palbocikliba (A) i pripadajući ESI-MS spektar (B).

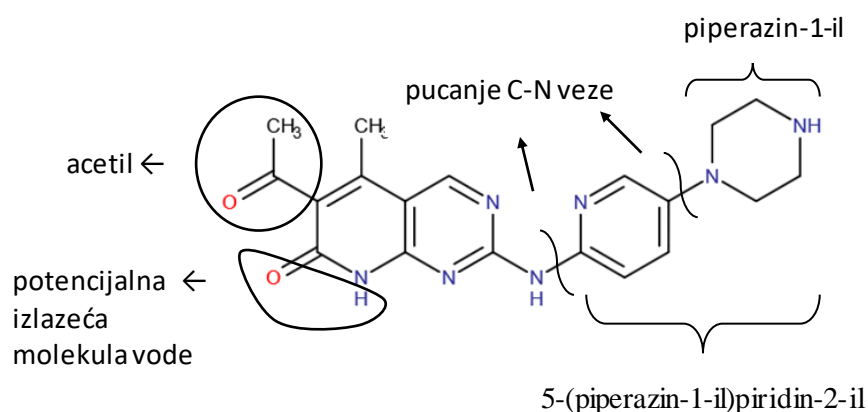
Na MS spektru moguće je zamijetiti da je vodeći ion  $m/z$  448 što odgovara molekulskom ionu palbocikliba  $[M+H]^+$  (Slika 9). Ostali pikovi, od kojih su najzastupljeniji  $m/z$  380, 337 i 319, predstavljaju protonirane fragmente molekule palbocikliba. Poznavajući strukturu i molekulsku masu palbocikliba ( $M_r = 447$ ) te na temelju postojeće literature (Ma i sur., 2016) mogu se pretpostaviti strukture dobivenih fragmenata. Fragment  $m/z$  380 nastane izlaskom ciklopentanila (69Da) iz molekule palbocikliba i podliježe laktam-laktim tautomerizaciji (Slika 10). Fragment  $m/z$  337 nastane izlaskom ciklopentanila i acetilne skupine (43Da), a fragment  $m/z$  319 mogao bi nastati izlaskom ciklopentanila, acetila i molekule vode (18Da) iz

molekule palbocikliba ili izlaskom piperazinila (85Da) i acetila. Fragment  $m/z$  293 mogao bi nastati izlaskom ciklopentanila, acetila, molekule vode i cijano skupine (26Da) iz molekule palbocikliba ili izlaskom piperazinila i ciklopentanila.

Ma i suradnici su u svom znanstvenom radu MS analizom palbocikliba dobili fragmente  $m/z$  448, 380, 362, 337, 323, 280 i 162. Osim molekulskog iona palbocikliba  $m/z$  448, zajednički su nam fragmenti  $m/z$  380 i  $m/z$  337. Razlike u ostalim fragmentima mogu se prepisati drugačijem analizatoru, budući da su Ma i suradnici koristili trostruki kvadrupolni analizator kao i različitim uvjetima masene spektrometrije (napon na kapilari, temperatura izvora iona, itd.) što dovodi do različite fragmentacije molekule (Ma i sur.,2016).

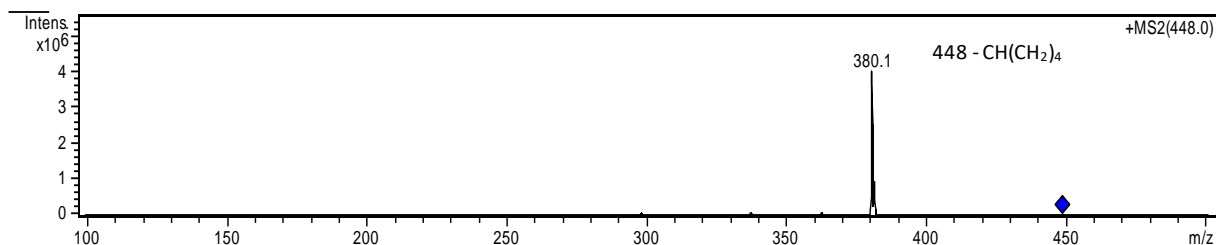


Slika 9. Molekula palbocikliba ( $M_r = 447$ ) i najčešće fragmentacije



Slika 10. Pretpostavljena struktura fragmenta 380 (laktamski tautomer).

Vodeći ion  $m/z$  448 iz prve MS analize otopine standarda palbocikliba je ponovno fragmentiran i snimljen je njegov MS<sup>2</sup> spektar prikazan na slici 11. Fragmentacijom iona  $m/z$  448 dobije se fragment  $m/z$  380 (Slika 10) koji se pojavljuje i u masenom spektru ukupne struje iona palbocikliba, a nastaje pucanjem C-N veze i izlaskom ciklopentanila (69Da) iz molekule palbocikliba.

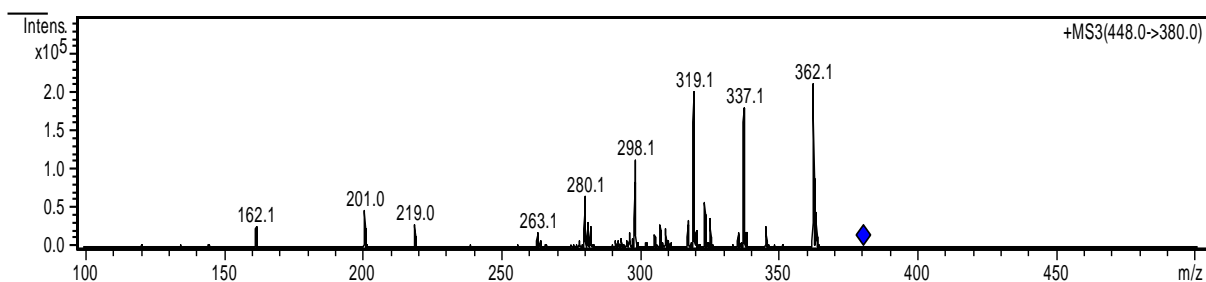


Slika 11. ESI-MS<sup>2</sup> spektar molekulskog iona  $m/z$  448 ( $M+H^+$ )

Kako bi se dobila što detaljnija strukturna karakterizacija, provedena je i ESI-MS<sup>3</sup> analiza. Ponovnom fragmentacijom glavnog fragmentnog iona  $m/z$  380 dobiven je ESI-MS<sup>3</sup> maseni spektar prikazan na slici 12. Dobiveni su produkti ioni  $m/z$  362, 337, 319, 298, 280, 219, 201 i 162. Fragmentni ion  $m/z$  362 nastaje izlaskom jedne molekule vode (dehidracijom) iz fragmenta  $m/z$  380. Fragment  $m/z$  337 nastaje izlaskom acetilne skupine, a fragment  $m/z$  319 nastaje izlaskom molekule vode i acetilne skupine iz fragmentnog iona  $m/z$  380. Fragment  $m/z$  298 može nastati izlaskom acetona (58Da) i cijano skupine, a fragment  $m/z$  280 može nastati izlaskom vode, acetona i cijano skupine iz fragmenta 380. Druga mogućnost je da fragment  $m/z$  280 nastaje izlaskom piperazina i metilne skupine (15Da) iz fragmenta  $m/z$  380. Fragmenti  $m/z$  162 (5-(piperazin-1-il)piridin-2-il) i  $m/z$  219 nastaju pucanjem C-N veze u središtu fragmentnog iona  $m/z$  380 (slika 10) dok fragment  $m/z$  201 nastaje izlaskom jedne molekule vode iz fragmenta  $m/z$  219 (dehidracija). Predložena shema fragmentacije prikazana je na slici 14.

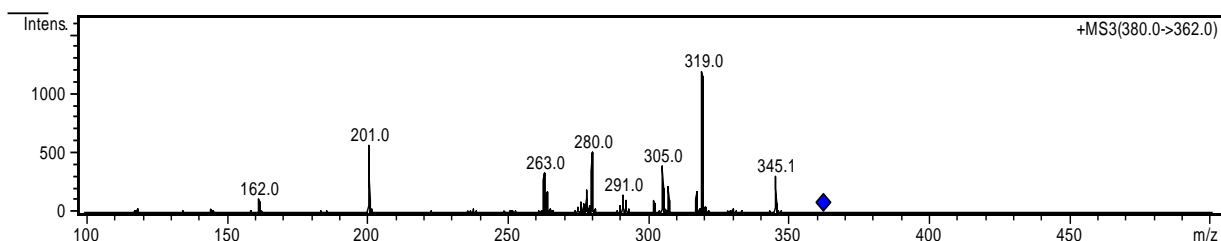
Fragmenti  $m/z$  362, 280 i 162, koji se nama pojavljuju u ESI-MS<sup>3</sup> analizi fragmenta  $m/z$  380, dobiveni su i u studiji Ma i suradnika, ali već u prvoj ESI-MS analizi palbocikliba (Ma i sur., 2016).





Slika 12. ESI-MS<sup>3</sup> spektar fragmentiranog iona  $m/z$  448  $\rightarrow$  380

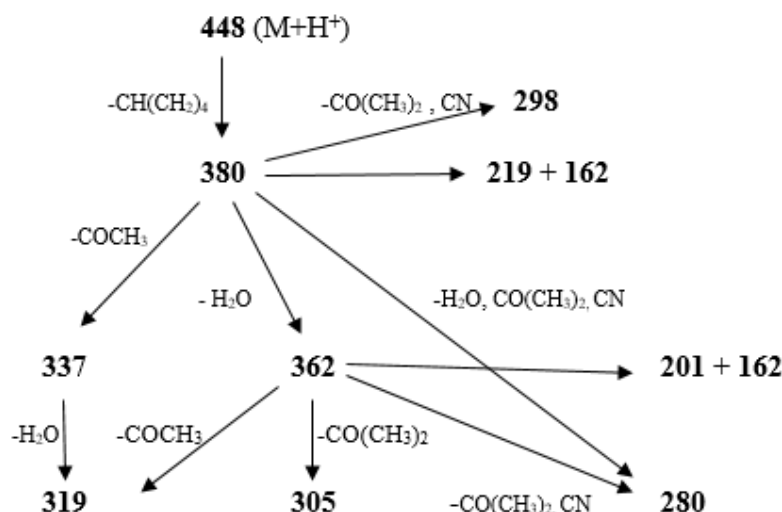
MS<sup>3</sup> analizom fragmentnog iona  $m/z$  380  $\rightarrow$  362 dobiva se spektar prikazan na slici 13. Vodeći ion je  $m/z$  319 koji nastaje izlaskom acetilne skupine iz fragmenta  $m/z$  362. Fragmentni ion  $m/z$  345 nastaje izlaskom jedne molekule vode iz fragmenta  $m/z$  362, procesom dehidracije. Manje zastupljen fragment  $m/z$  305 može nastati izlaskom acetona iz iona  $m/z$  362 ili izlaskom acetila i metilne skupine. Fragmentni ion  $m/z$  280 mogao bi nastati izlaskom acetona i cijano- skupine (-CN) iz fragmenta  $m/z$  362. Fragmenti  $m/z$  201 i 162 nastaju pucanjem C-N veze u sredini fragmenta  $m/z$  362.



Slika 13. ESI-MS<sup>3</sup> spektar fragmentiranog iona  $m/z$  380  $\rightarrow$  362

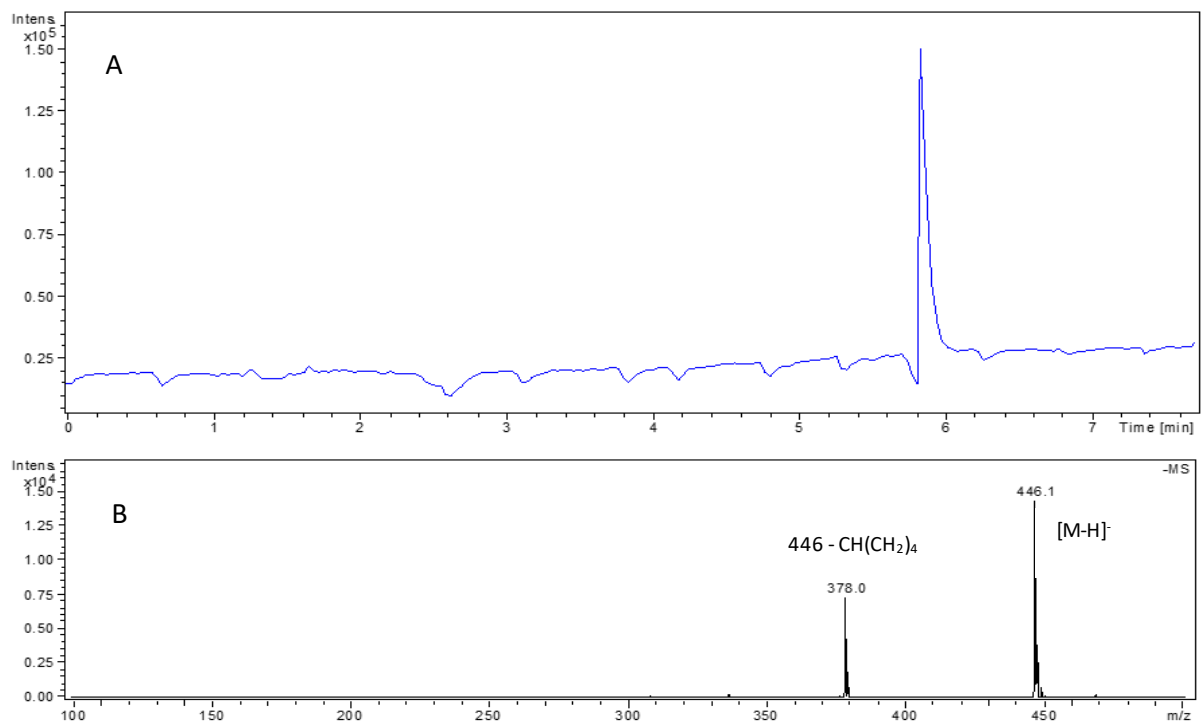
Predložena shema fragmentacije molekule palbocikliba i njegovih glavnih fragmenata prikazana je na slici 14. Najvažnije predložene izlazeće skupine kod fragmentacije molekule palbocikliba su ciklopentanil (69Da), acetil (43Da), molekula vode (18Da), piperazinil (85Da) i 5-(piperazin-1-il)piridin-2-il (162Da).

Ma i suradnici su u svom radu o strukturnoj karakterizaciji procesnih onečišćenja palbocikliba opisali fragmentaciju Onečišćenja A koje je strukturni izomer palbocikliba i MS analizom dobili su fragmente  $m/z$  448, 381, 349, 241, 229, 177, 88,8. Kao izlazne skupine predložili su ciklopentamil, piperazinil, acetil, metilnu skupinu te 3-(piperazin-1-il)piridin-2-il (Ma i sur., 2016). Primjećujemo da nam se većina predloženih izlazećih skupina poklapa, a ostale možemo prepisati razlikama u fragmentaciji izomera i različitim uvjetima analize.



Slika 14. Predložena shema fragmentacije palbocikliba u ESI-MS<sup>n</sup> analizi (pozitivan ionizacijski način snimanja)

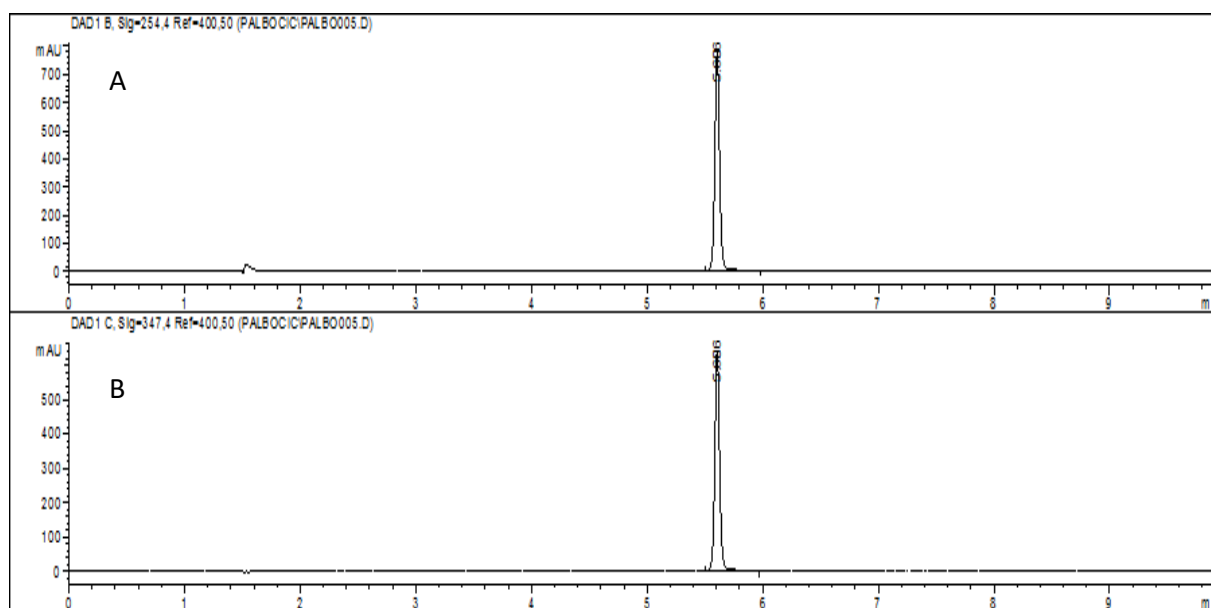
Provedena je i ESI-MS analiza palbocikliba iz otopine standarda u negativnom ionizacijskom načinu rada i dobiveni MS spektar prikazan je na slici 15. Vodeći ion je  $m/z$  446 što odgovara molekulskom ionu palbocikliba  $[M-H]^-$ . Osim njega, vidi se i ion  $m/z$  378 koji predstavlja deprotonirani oblik fragmenta  $m/z$  380 dobivenog MS analizom u pozitivnom načinu snimanja, prikazanog na slici 10.



Slika 15. (A) TIC kromatogram i (B) ESI-MS spektar standarda palbocikliba u negativnom ionizacijskom načinu rada

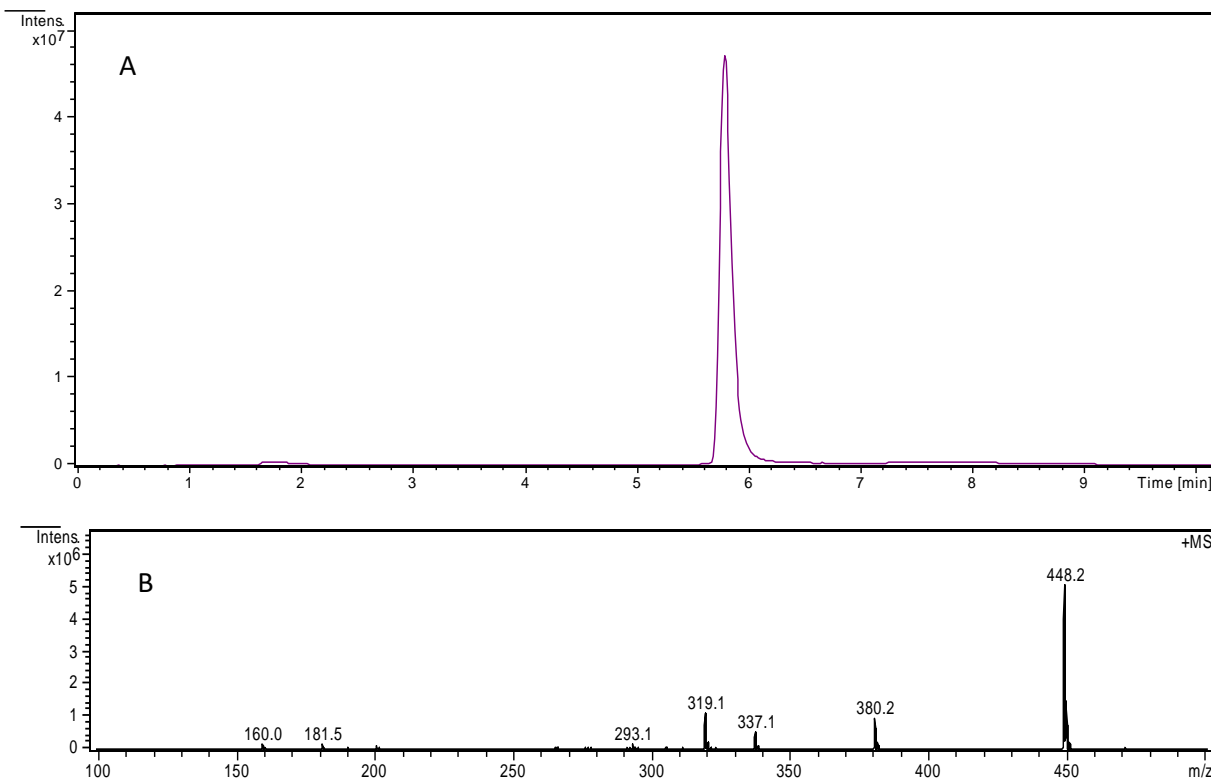
#### 4.3. ANALIZA UZORKA I USPOREDBA REZULTATA

Provedena je HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> analiza otopine uzorka (volumen injektiranja 5  $\mu$ L). Vrijeme zadržavanja pika je 5,6 minuta, što odgovara vremenu zadržavanja palbocikliba iz otopine standarda (Slika 7). Kromatogrami dobiveni DAD detektorom na valnim duljinama 254 nm i 347 nm prikazani su na slici 16.

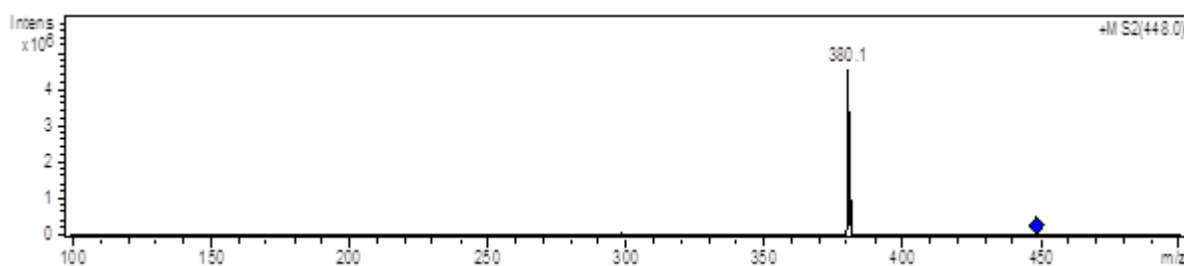


Slika 16. Kromatogrami uzorka palbocikliba izmjereni DAD detektorom na 2 valne duljine: 254 nm (A) i 347 nm (B)

TIC kromatogram i maseni spektar dobiven elektrosprej ionizacijom uzorka palbocikliba u pozitivnom ionizacijskom načinu rada prikazan je na slici 17. Vodeći ion je  $m/z$  448 što odgovara molekulskom ionu palbocikliba  $[M+H]^+$ . Ostali pikovi su  $m/z$  380, 337, 319, 293, 181 i 160 i oni predstavljaju protonirane fragmente molekule palbocikliba. Kako bi se provela strukturna karakterizacija, provedena je daljnja ESI-MS<sup>2</sup> analiza vodećeg iona. Fragmentacijom molekulskog iona  $m/z$  448 (MS<sup>2</sup>) dobiven je ionski fragment  $m/z$  380 (Slika 18), kao što je bio slučaj i kod otopine standarda. Maseni spektar uzorka u potpunosti odgovara masenom spektru standarda palbocikliba.

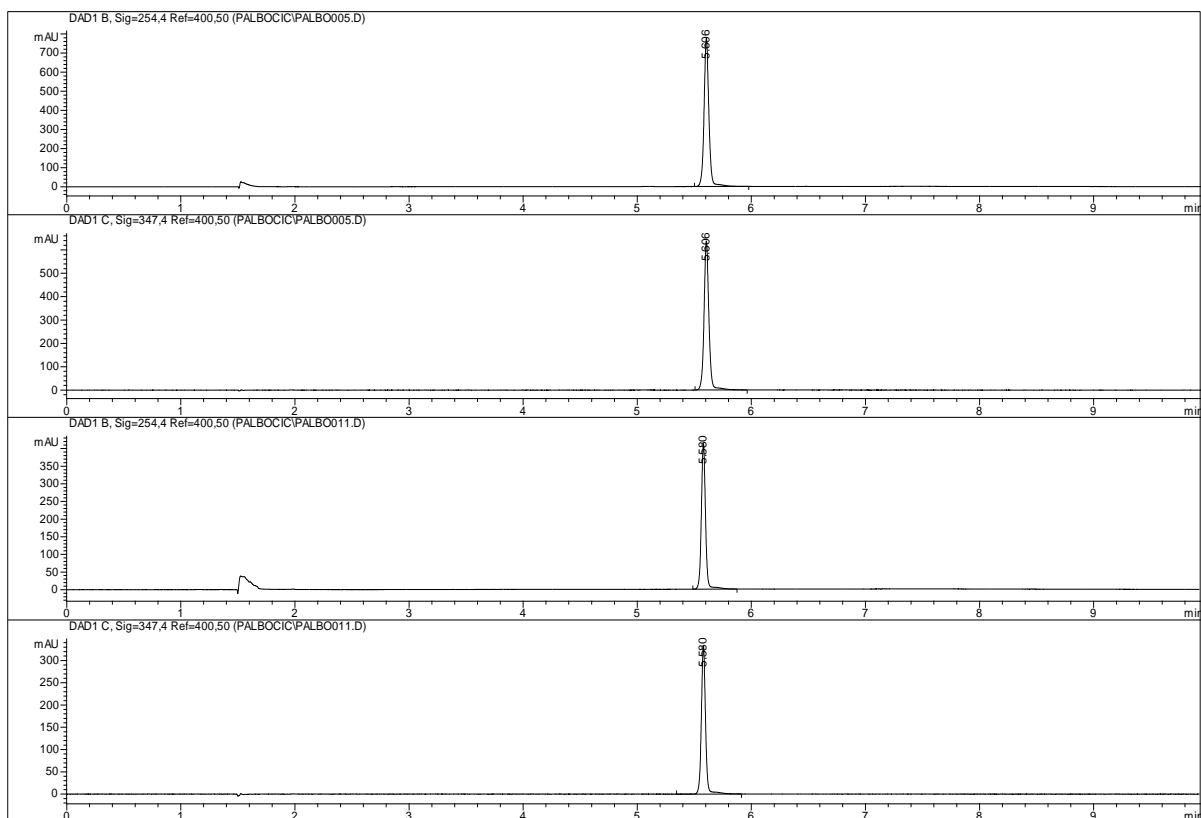


Slika 17. TIC (A) i ESI-MS (B) spektar uzorka palbocikliba

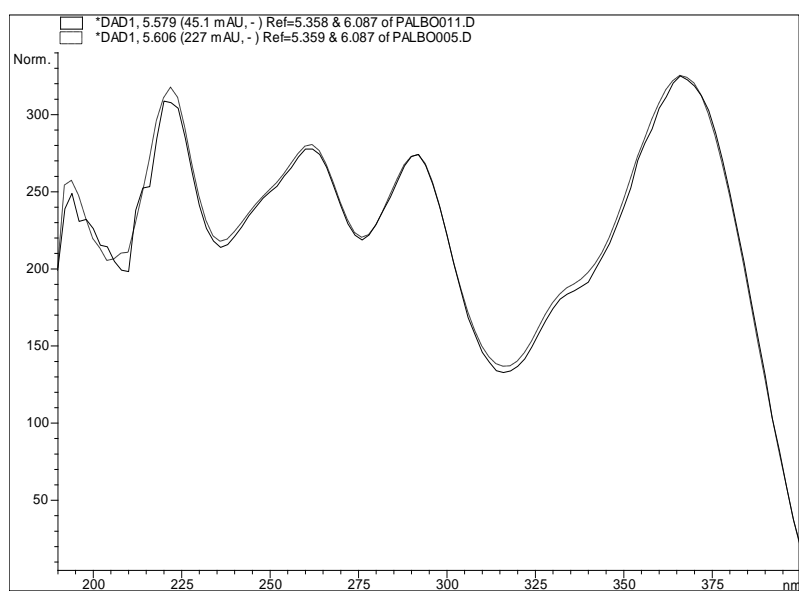


Slika 18. ESI-MS<sup>2</sup> spektar vodećeg iona m/z 448 iz otopine uzorka palbocikliba

Dobiveni kromatogrami otopina uzorka i standarda palbocikliba, izmjereni DAD detektorom na dvije valne duljine (254 nm i 347 nm) pokazuju isto vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) pika palbocikliba – 5,6 minuta (Slika 19). Snimljen je i cijeli UV-Vis spektar pika palbocikliba iz otopine uzorka, kao i standarda te je njihovo podudaranje prikazano na slici 20.

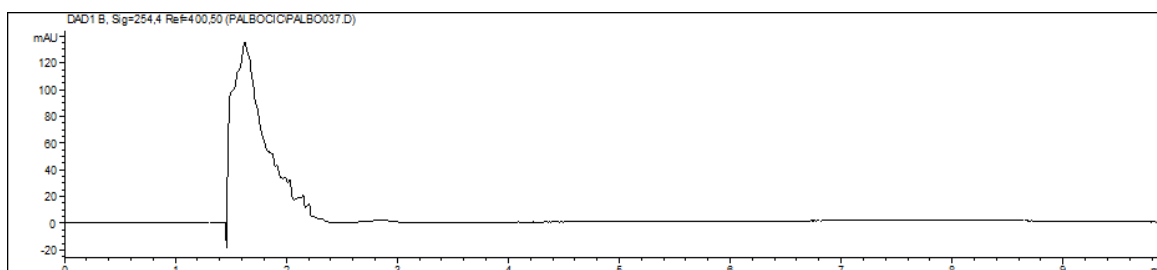


Slika 19. Usporedba uzorka i standarda palbocikliba na DAD detektoru na dvije valne duljine (254 nm i 347 nm)



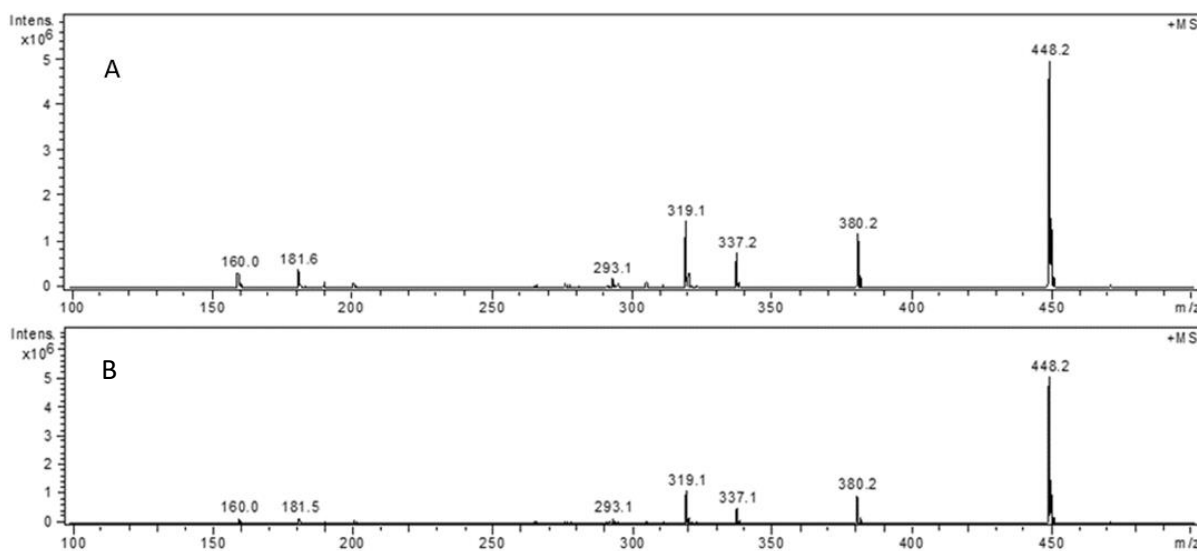
Slika 20. Podudaranje UV-Vis spektara otopina uzorka i standarda palbocikliba

Napravljena je HPLC-DAD analiza otapala dimetilsulfoksida (slijepa proba), a injektirano je 50  $\mu$ L DMSO. Na kromatogramu je vidljivo da nema nikakvih pikova nakon treće minute koji bi mogli interferirati sa pikovima palbocikliba ( $t_R = 5,6$  min) kod analize uzorka i standarda. HPLC-DAD kromatogram slijepa probe odnosno DMSO-a prikazan je na slici 21.



Slika 21. Kromatogram otapala DMSO (slijepa probe), volumen injektiranja 50  $\mu$ L

Podudaranje ESI-MS spektara pika palbocikliba iz otopine standarda i uzorka prikazano je na slici 22.



Slika 22. Usporedba MS spektara pika palbocikliba iz standarda (A) i iz uzorka (B)

#### 4.4. ODREĐIVANJE PALBOCIKLIBA U UZORKU

Za kvantitativno određivanje palbocikliba u uzorku korištena je metoda vanjskog standarda i napravljena je serija razrjeđenja otopine standarda postupkom opisanom u poglavlju 3.2.5. HPLC-DAD analizom tih otopina za svaku od njih dobivene su slijedeće vrijednosti: vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ), površina pika (AUC), visina i širina pika te simetrijski faktor pika ( $A_s$ ). Dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Serija razrjeđenja otopine standarda i vrijednosti dobivene HPLC-DAD analizom

br. otopine	$\gamma$ (gL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	AUC <sup>b</sup>	$t_R$ (min) <sup>c</sup>	visina pika	širina pika	$A_s$ <sup>d</sup>
1	<b>0,001</b>	<b>5,1</b>	5,586	2,1	0,0406	0,828
2	<b>0,010</b>	<b>54,6</b>	5,601	21,8	0,0418	1,016
3	<b>0,041</b>	<b>218,1</b>	5,608	88,2	0,0412	0,957
4	<b>0,083</b>	<b>422,6</b>	5,577	169,5	0,0415	1,071
5	<b>0,103</b>	<b>539,9</b>	5,576	212,6	0,0423	1,002
6	<b>0,155</b>	<b>794,2</b>	5,584	313	0,0423	0,975

<sup>a</sup> masena koncentracija ( $\gamma$ )

<sup>b</sup> površina pika (AUC)

<sup>c</sup> vrijeme zadržavanja ( $t_R$ )

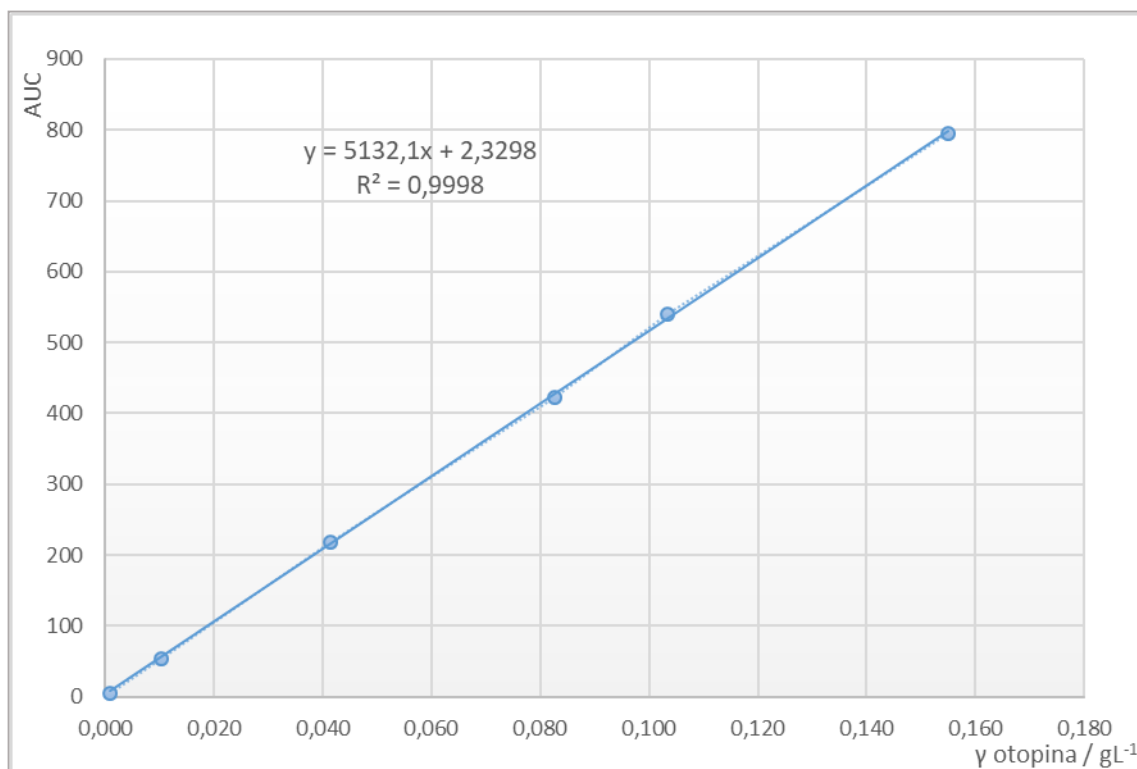
<sup>d</sup> simetrijski faktor pika ( $A_s$ )

Kalibracijski pravac (Slika 23) izrađen je pomoću poznatih koncentracija serije otopina standarda (os apscisa, X) i izmjerenih površina pikova (os ordinata, Y).

Dobivena je jednadžba pravca:

$$y = 5132,1x + 2,3298$$





Slika 23. Kalibracijski pravac dobiven iz serije razrjeđenja otopine standarda palbocikliba

Napravljene su tri analize otopine uzorka, masene koncentracije 0,066 g/L i dobivena je srednja vrijednost površine pika  $AUC = 380,7$ . Uvrštavanjem površine pika u jednadžbu pravca kao vrijednost  $y$ , dobije se masena koncentracija otopine uzorka  $x = 0,0737$  g/L.

Analitički prinos (engl. *recovery*,  $R$ ) iznosi 111,7%, a izračunat je prema formuli:

$$R(\%) = \frac{\gamma \text{ otopine uzorka (eksperimentalna)}}{\gamma \text{ otopine uzorka (teoretska)}} \times 100$$

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada je identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje palbocikliba u uzorku aktivne ljekovite tvari pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenim spektrometrom.

Usporedbom kromatograma standarda i uzorka palbocikliba, dobivenih HPLC-DAD tehnikom na dvije valne duljine (254 nm i 347 nm), primjećuje se isto vrijeme zadržavanja pika palbocikliba ( $t_R = 5,6$  min) u oba slučaja što navodi na zaključak da je u pitanju ista supstancija. Identitet je dodatno potvrđen usporedbom UV-Vis spektara i MS spektara otopine standarda i uzorka palbocikliba jer su dobiveni spektri jednaki. ESI-MS analizom otopine standarda kao i otopine uzorka palbocikliba u pozitivnom ionizacijskom načinu rada dobije se molekularni ion  $m/z$  448  $[M+H^+]$  kao dominantni ion u spektru. Ostali ioni vidljivi na MS spektru su  $m/z$  380, 337, 319, 293, 181 i 160, a dobiveni su fragmentacijom molekule palbocikliba prilikom elektrosprej ionizacije. ESI-MS analizom u negativnom ionizacijskom načinu rada dobiven je molekularni ion  $m/z$  446  $[M-H^+]$  i fragment  $m/z$  378 kod standarda i kod uzorka.

U svrhu strukturne karakterizacije rađene su daljnje ESI-MS analize dobivenih fragmenata palbocikliba. Napravljena je ESI-MS<sup>2</sup> analiza molekularnog iona  $m/z$  448 pri čemu je dobiven fragment  $m/z$  380. ESI-MS<sup>3</sup> analizom fragmenta  $m/z$  380 dobiveni su ioni  $m/z$  362, 337, 319, 298, 280, 219, 201 i 162, a napravljena je i ESI-MS<sup>n</sup> analiza fragmenta  $m/z$  362. Predložena je fragmentacijska shema i izlazeće skupine: ciklopentamil, acetil, piperazin-1-il, molekula vode i 5-(piperazin-1-il)piridin-2-il.

Za kvantitativno određivanje palbocikliba u uzorku korištena je metoda vanjskog standarda. Koncentracija otopina provjerena je pomoću UV-Vis spektrofotometrije. Pomoću poznatih koncentracija serije otopina standarda i izmjerenih površina pikova, izrađen je kalibracijski pravac i dobivena je jednadžba pravca preko koje je izračunata masena koncentracija otopine uzorka palbocikliba ( $\gamma = 0,0737$  g/L). Analitički prinos (engl. *recovery*) iznosi 111,7%.

## 6. LITERATURA

1. A Study of Palbociclib (PD-0332991) + Letrozole vs. Letrozole For 1st Line Treatment Of Postmenopausal Women With ER+/HER2- Advanced Breast Cancer (PALOMA-2), 2017., <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01740427?term=0332991+and+pfizer&rank=2>, pristupljeno 15. 5. 2017.
2. Ahuja S i Dong M. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. San Diego, Academic press, 2005.
3. Cancer – Fact sheet, 2017., <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, pristupljeno 2. 10. 2017.
4. Dass C. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2007.
5. Ekman R i sur. Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2009.
6. Ibrance (palbociclib) Prescribing Information, 3. izdanje, 2017., <http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=2191>, pristupljeno 12. 6. 2017.
7. Kazekevich Y i LoBrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey, John Wiley & Sons Inc., 2007.
8. Ma X, Liu L, Cao N, Zou Q, Xiong K, Ouyang P. Isolation and Structural Elucidation of Palbociclib's Eight Process-Related Impurities. Journal of AOAC International Vol. 99, No. 3, 2016, 638-648.
9. Meeting highlights from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 12-15 September 2016 (corrected), 2016., [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2016/09/news\\_detail\\_002599.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2016/09/news_detail_002599.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1), pristupljeno 15. 5. 2017.
10. Nigović B. Interna skripta za predavanja. Zagreb, 2014, predavanja: Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), Masena spektrometrija, Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija, Vezani sustavi u analitici lijekova.
11. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A i Sertić M. Analitika lijekova – praktikum. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 36, 37, 106, 125, 126 i 128.

12. Palbociclib Combined With Fulvestrant In Hormone Receptor+ HER2-Negative Metastatic Breast Cancer After Endocrine Failure (PALOMA-3), 2017., <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01942135>, pristupljeno 15. 5. 2017.
13. Perkampus H. Uv-Vis Spectroscopy and Its Applications. London, Springer Laboratory, 2012.
14. Watson D. Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1. SAŽETAK

Rak dojke je najčešća vrsta karcinoma u žena diljem svijeta i drugi najčešći rak u cijeloj populaciji, a svake je godine uzrok smrti čak pola milijuna ljudi (većinom žena). Najčešći tip raka dojke je ER-pozitivni, HER2-negativni rak dojke (74% slučajeva) koji ujedno ima i najbolju prognozu ako liječenje počne na vrijeme.

Palbociklib je novi lijek (prvi u svojoj skupini) odobren za liječenje upravo tog tipa raka dojke, a koristi se u kombinaciji s letrozolom ili fulvestrantom. Selektivan je i reverzibilan inhibitor ciklin-ovisnih kinaza 4 i 6 te njihovom blokadom usporava rast i proliferaciju ER-pozitivnih stanica raka dojke. Palbociklib predstavlja značajni napredak u terapiji karcinoma dojke jer dokazano produžuje vrijeme preživljenja oboljelih žena bez progresije bolesti.

Ovim je radom uspješno identificiran, strukturno okarakteriziran i određen palbociklib u uzorku aktivne ljevovite tvari pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenim spektrometrom. Identificiran je preko vremena zadržavanja ( $t_R = 5,6$ min), UV-Vis spektra i ESI-MS<sup>n</sup> spektara, a za kvantitativno određivanje je korištena metoda vanjskog standarda.

## 7.2. SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and second most common cancer in entire population. Every year it is the cause of death of a half million people (mostly women). Most common type of cancer is ER-positive, HER2-negative breast cancer (74% of all cases) which also has the best prognosis when treated on time.

Palbociclib is a new drug (first in his class) approved as a treatment for that particular type of cancer and it is used in combination with letrozole or fulvestrant. It is a selective and reversible inhibitor of the cyclin-dependent kinases 4 and 6; therefore, it slows down the growth and proliferation of ER-positive breast cancer cells. Palbociclib represents a big breakthrough in breast cancer treatment because it prolongs the progression-free survival in women.

In this thesis, palbociclib was successfully identified, structurally elucidated and quantitatively determined from sample of active pharmaceutical ingredient using high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry. It was identified through retention time ( $t_R = 5,6$  min), UV-Vis spectrum and ESI-MS<sup>n</sup> spectra and quantitatively determined using a calibration curve method.

## 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

### IDENTIFIKACIJA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA I ODREĐIVANJE PALBOCIKLIBA PRIMJENOM HPLC-DAD-MS/MS METODE

Ivana Ivanušić

#### SAŽETAK

Rak dojke je najčešća vrsta karcinoma u žena diljem svijeta i drugi najčešći rak u cijeloj populaciji, a svake je godine uzrok smrti čak pola milijuna ljudi (većinom žena). Najčešći tip raka dojke je ER-pozitivni, HER2-negativni rak dojke (74% slučajeva) koji ujedno ima i najbolju prognozu ako liječenje počne na vrijeme.

Palbociklib je novi lijek (prvi u svojoj skupini) odobren za liječenje upravo tog tipa raka dojke, a koristi se u kombinaciji s letrozolom ili fulvestrantom. Selektivan je i reverzibilan inhibitor ciklin-ovisnih kinaza 4 i 6 te njihovom blokadom usporava rast i proliferaciju ER-pozitivnih stanica raka dojke. Palbociklib predstavlja značajni napredak u terapiji karcinoma dojke jer dokazano produkuje vrijeme preživljenja oboljelih žena bez progresije bolesti.

Ovim je radom uspješno identificiran, strukturno okarakteriziran i određen palbociklib u uzorku aktivne ljekovite tvari pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s masenim spektrometrom. Identificiran je preko vremena zadržavanja ( $t_R = 5,6$  min), UV-Vis spektra i ESI-MSn spektara, a za kvantitativno određivanje je korištena metoda vanjskog standarda.

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

Rad sadrži: 36 stranice, 23 grafičkih prikaza, 3 tablice i 14 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: palbociklib, HPLC-DAD-MS/MS, tekućinska kromatografija, masena spektrometrija

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

**Dr. sc. Slaven Crnković**, Ludwig-Boltzmann Institut f. Lungengefäßforschung, Graz, Austrija

Rad prihvaćen: listopad 2017.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### IDENTIFICATION, STRUCTURAL ELUCIDATION AND DETERMINATION OF PALBOCICLIB USING HPLC-DAD-MS/MS METHOD

Ivana Ivanušić

#### SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and second most common cancer in entire population. Every year it is the cause of death of a half million people (mostly women). Most common type of cancer is ER-positive, HER2-negative breast cancer (74% of all cases) which also has the best prognosis when treated on time.

Palbociclib is a new drug (first in his class) approved as a treatment for that particular type of cancer and it is used in combination with letrozole or fulvestrant. It is a selective and reversible inhibitor of the cyclin-dependent kinases 4 and 6; therefore, it slows down the growth and proliferation of ER-positive breast cancer cells. Palbociclib represents a big breakthrough in breast cancer treatment because it prolongs the progression-free survival in women.

In this thesis, palbociclib was successfully identified, structurally elucidated and quantitatively determined from sample of active pharmaceutical ingredient using high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry. It was identified through retention time ( $t_R = 5,6$  min), UV-Vis spectrum and ESI-MS<sup>n</sup> spectra and quantitatively determined using a calibration curve method.

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

Thesis includes: 36 pages, 23 figures, 3 tables and 14 references. Original is in Croatian language.

Keywords: palbociclib, HPLC-DAD-MS/MS, liquid chromatography, mass spectrometry

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Biljana Nigović, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Slaven Crnković, Ph.D.** Ludwig-Boltzmann Institut f. Lungengefäßforschung, Graz, Austria

The thesis was accepted: October 2017.