Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika

Milekić, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:605964

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Tamara Milekić

Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Industrijska farmacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je u Plivi Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj pod stručnim vodstvom dr. sc. Biserke Cetine-Čižmek, znanstvene savjetnice.

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr.sc. Biserki Cetini-Čižmek na ukazanoj prilici i povjerenju. Veliko hvala dr.sc. Sanji Radman na strpljenju, trudu, brojnim savjetima i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog rada. Hvala kolegama na odjelu za Analitiku oralnih doziranih jedinica na pomoći i vrijednim savjetima. Najveće hvala mojoj obitelji koja mi je pružila bezuvjetnu podršku kako tijekom studiranja, tako i u životu. Hvala Predragu na svom razumijevanju, podršci i ljubavi. Hvala dragim prijateljima što su uvijek bili uz mene.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Anthelmintici 1

1.2. Kromatografske tehnike odjeljivanja 6

1.2.1. Kromatografski parametri 7

1.2.2. Kvantitativna analiza 10

1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 12

1.3.1. Nepokretna faza 12

1.3.2. Pokretna faza 13

1.3.3. Tekućinski kromatograf 13

1.3.4. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti 14

1.3.5. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) 15

1.4. Kvaliteta ugrađena u dizajn 16

1.4.1. Razvoj analitičke metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn 16

1.5. Onečišćenja u lijekovima 18

1.5.1. Kontrola i vrste onečišćenja 18

1.6. Forsirana razgradnja 21

2. Obrazloženje teme 23

3. Materijali i metode 24

3.1. Materijali 24

3.2. Metode 25

3.2.1. Priprema temeljnih standardnih otopina i razrijeđenih otopina 25

3.2.2. Određivanje mrtvog volumena UPLC tekućinskog kromatografa 25

3.2.3. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje anthelmintika 26

3.2.4. Određivanje optimalne metode za odjeljivanje onečišćenja anthelmintika 26

3.2.5. Metoda za određivanje sadržaja za febantel/pirantel/prazikvantel 27

3.2.6. Metoda za određivanje onečišćenja za FEB/PIR/PRZ 27
3.2.7. Metoda za određivanje sadržaja za ALB/LEV 28
3.2.8. Metoda za određivanje onečišćenja za ALB/LEV 28
3.2.9. Forsirana razgradnja 29
4. Rezultati 31
4.1. Određivanje mrtvog volumena UPLC tekućinskog kromatografa 31
4.2. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje anthelmintika 31
4.3. Određivanje optimalne metode za odjeljivanje onečišćenja anthelmintika programskih paketom DryLab 33
4.3.1. DryLab eksperimenti za febantel/pirantel/prazikvantel 33
4.3.2. DryLab eksperimenti za albendazol/levamisol 35
4.4. Forsirana razgradnja 38
4.4.1. Eksperimenti forsirane razgradnje za febantel 38
4.4.2. Eksperimenti forsirane razgradnje za pirantel 41
4.4.3. Eksperimenti forsirane razgradnje za prazikvantel 45
4.4.4. Eksperimenti forsirane razgradnje za febantel/pirantel/prazikvantel 47
4.4.5. Eksperimenti forsirane razgradnje za albendazol 51
4.4.6. Eksperimenti forsirane razgradnje za levamisol 53
4.4.7. Eksperimenti forsirane razgradnje za albendazol/levamisol 56
4.5. Metode za febantel/pirantel/prazikvantel 58
4.5.1. Definiranje metode za određivanje sadržaja za febantel/pirantel/prazikvantel 58
4.5.2. Definiranje metode za određivanje onečišćenja za febantel/pirantel/prazikvantel 59
4.6. Metode za albendazol/levamisol 61
4.6.1. Definiranje metode za određivanje sadržaja za albendazol/levamisol 61
4.6.2. Definiranje metode za određivanje onečišćenja za albendazol/levamisol 62
5. Rasprava 65

5.1. Priprava temeljnih standardnih i razrijeđenih otopina 65
5.2. Određivanje optimalnog pH uz pomoć programskog paketa Marvin Beans 65
5.3. Određivanje optimalne metode uz pomoć programskog paketa DryLab 66
5.3.1. DryLab predviđanja za febantel/pirantel/prazikvantel 66
5.3.2. DryLab predviđanja za albendazol/levamisol 67
5.4. Evaluacija razvijenih metoda na temelju rezultata forsirane razgradnje 67
5.4.1. Tumačenje forsirane razgradnje za febantel 68
5.4.2. Tumačenje forsirane razgradnje za pirantel 68
5.4.3. Tumačenje forsirane razgradnje za prazikvantel 69
5.4.4. Tumačenje forsirane razgradnje za febantel/pirantel/prazikvantel 69
5.4.5. Tumačenje forsirane razgradnje za albendazol 70
5.4.6. Tumačenje forsirane razgradnje za levamisol 70
5.4.7. Tumačenje forsirane razgradnje za albendazol/levamisol 71
5.5. Metode za određivanje sadržaja i onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela 72
5.6. Metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja albendazola/levamisola 72
5.7. Kvantitativna analiza onečišćenja i promjene u metodama za određivanje onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela i albendazola/levamisola 73
6. Zaključci 74
7. Literatura 75
8. Sažetak/Summary 78

1. Uvod

1.1. Anthelmintici

Anthelmintici se koriste u liječenju crijevnih nametnika u ljudi i životinja. Čine najveću skupinu veterinarskih farmaceutika po količini proizvodnje i po vrijednosti. U poljoprivredi se koriste kao insekticidi (protiv insekata) i akaricidi (protiv grinja). U novije vrijeme sve je veća primjena anthelmintika kao antitumorskih lijekova (Radman, 2014).

Anthelmintici se dijele prema kemijskoj strukturi, a podjela je prikazana u Tablici 1. Strukture anthelmintika korištenih u ovom radu i njihovih specificiranih onečišćenja prikazane su na Slikama 1-5, a njihove preporučene dnevne doze u Tablici 2.

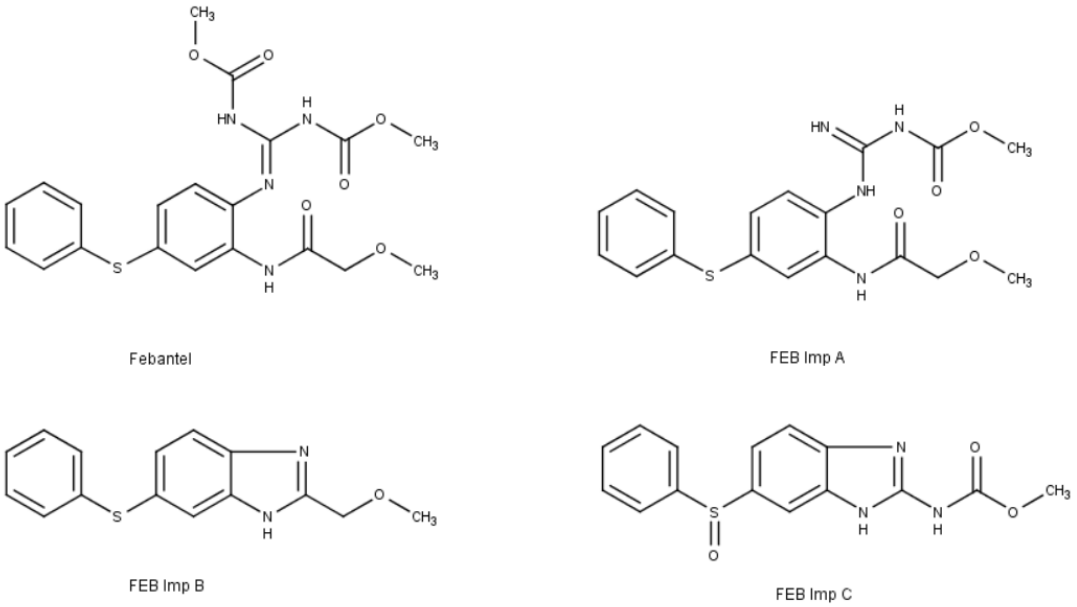
Benzimidazoli su selektivno toksični anthelmintici koji se vežu na β-tubulin parazita i inhibiraju polimerizaciju tubulina i stvaranje mikrotubula čime narušavaju funkciju diobenog vretena. Na taj način uzrokuju smrt stanica koje se ubrzano dijele. Ispitivanja su pokazala njihov potencijal u liječenju raka debelog crijeva (Pourgholami i sur., 2005; Nygren i sur., 2013) i raka dojke (Ehteda i sur., 2013; Hou i sur., 2015). Levamisol, pripadnik skupine imidazotiazola, aktivni S-izomer tetramisola, osim kao anthelmintik koristi se i kao djelotvoran imunomodulator u liječenju raka debelog crijeva, raka vrata i glave te melanoma (http://www.rxmed.com) u kombinaciji s drugim kemoterapeuticima. Kao imunomodulator potiče staničnu imunost, aktivira makrofage i T limfocite (Sadigh-Eteghad i sur., 2011). Niklozamid, iz skupine salicilanilida, pokazuje potencijalni antiproliferativni učinak na tumorske stanice solidnih tumora: raka glave i vrata, raka pluća, prostate, debelog crijeva i jajnika (Ye i sur., 2014).

Tablica 1: *Podjela anthelmintika prema kemijskoj strukturi (Horvat i sur., 2012)*

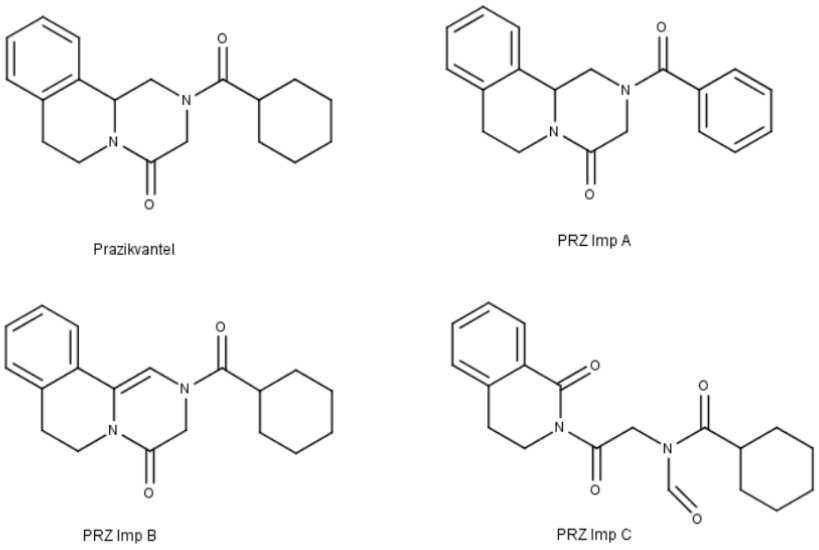
benzimidazoli	albendazol, kambendazol, fenbendazol, flubendazol, luksbendazol, mebendazol, netobimin, oksfendazol, oksibendazol, triklabendazol, tiabendazol
difenilsulfidi	bitionol, febantel
imidazotiazoli	levamisol
heksahidropirazini	dietilkarbamazin, piperazin, prazikvantel
makrociklički laktoni	abamektin, doramektin, eprinomektin, ivermektin, moksidektin, selamektin
salicilanilidi	klosantel, niklozamid, niklozamid monohidrat, niklozamid etanolamin, nikolozamid piperazin, oksiklozanid, rafoksanid
trahidropirimidini	morantel, morantel tartarat, pirantel pamoat
ostali	suramin, niklofolan, fenotiazin

Tablica 2: *Preporučene dnevne doze febantela, pirantel pamoata, prazikvantela, albendazola i levamisola (www.drugs.com)*

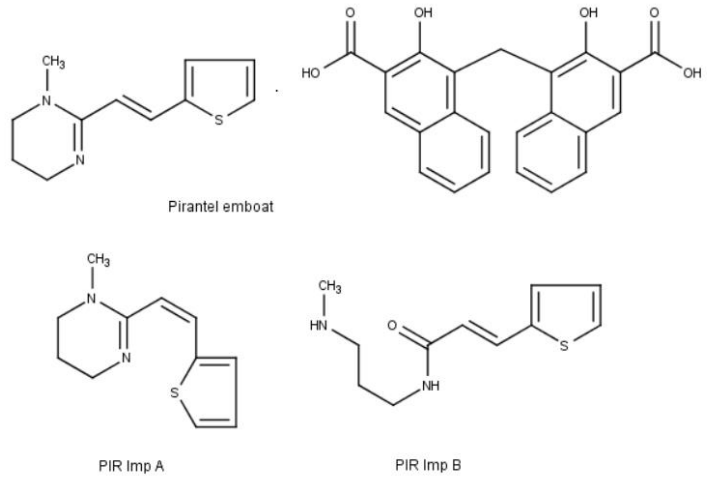
	Preporučene dnevne doze
Febantel	1050 mg
Pirantel pamoat	1008 mg
Prazikvantel	350 mg
Albendazol	800 mg
Levamisol	150 mg



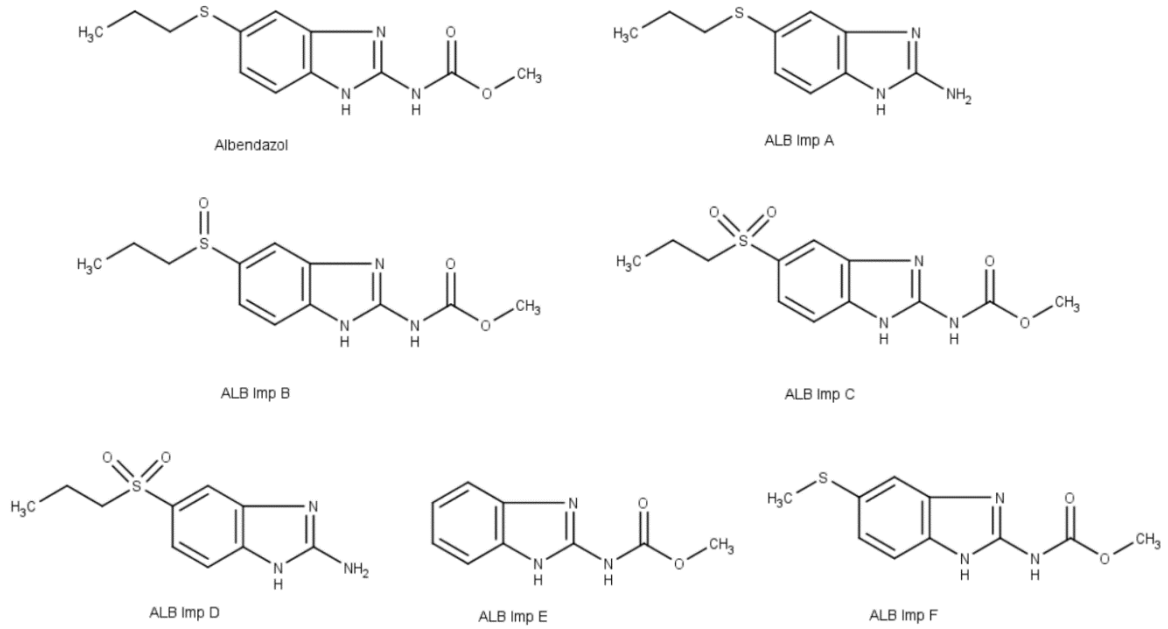
Slika 1: *Strukture febantela i njegovih specificiranih onečišćenja (Council of Europe, 2013a)*



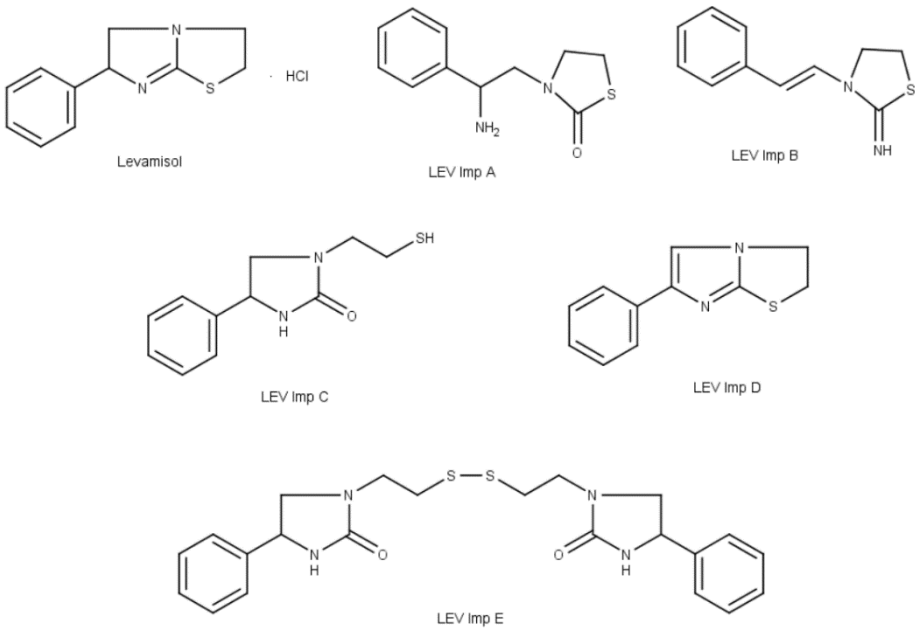
Slika 2: *Strukture prazikvantela i njegovih specificiranih onečišćenja (Council of Europe, 2013b)*



Slika 3: *Strukture pirantel pamoata i specificiranih onečišćenja pirantela (Council of Europe, 2013c)*



Slika 4: *Strukture albendazola i njegovih specificiranih onečišćenja (Council of Europe, 2013d)*



Slika 5: *Strukture levamisola i njegovih specificiranih onečišćenja (Council of Europe, 2013e)*

1.2. Kromatografske tehnike odjeljivanja

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna dok se druga kreće u određenom smjeru (pokretna faza) (Cerjan-Stefanović i sur., 1999). Kromatografske tehnike su najčešće korištene tehnike u analitici lijekova. Primjenjuju se za odjeljivanje, identifikaciju i određivanje sadržaja.

Kromatografsko odjeljivanje temelji se na adsorpciji, razdjeljenju, ionskoj izmjeni ili razlici fizikalno-kemijskih svojstava molekule poput veličine, mase, konfiguracije i drugih. Uzorak otopljen u pokretnoj fazi koja je tekućina, plin ili superkritični fluid kreće se preko nepokretne faze koja je krutina, tekućina nanesena na krutinu ili gel, a može biti u koloni ili na plohi. Dakle, kromatografski postupci odjeljivanja temelje se na razdiobi između nepokretne faze velike površine i pokretne faze koja prelazi preko nepokretne faze (Luterotti, 2002).

Tablica 3: *Podjela kolonskih kromatografija prema fizikalnom stanju pokretne faze (Skoog i sur., 2014)*

Metoda	Nepokretna faza	Razdioba
Pokretna faza – PLIN		
plin-tekućina	tekućina adsorbirana ili vezana na čvrsti nosač	razdjeljenje
plin-krutina	krutina	adsorpcija
Pokretna faza – TEKUĆINA		
tekućina-tekućina	tekućina adsorbirana ili vezana na čvrsti nosač	razdjeljenje
tekućina-krutina	krutina	adsorpcija
ionska izmjena	ionski izmjenjivač	ionska izmjena
odjeljivanje prema veličini molekula	tekućina unutar pora čvrstog polimera	razlika veličine
afinitet	specifični ligand vezan na čvrsti nosač	razdjeljenje
Pokretna faza – SUPERKRITIČNA TEKUĆINA		
-	krutina sa ili bez vezanog organskog spoja ili tekućina vezana na nosač	razdjeljenje

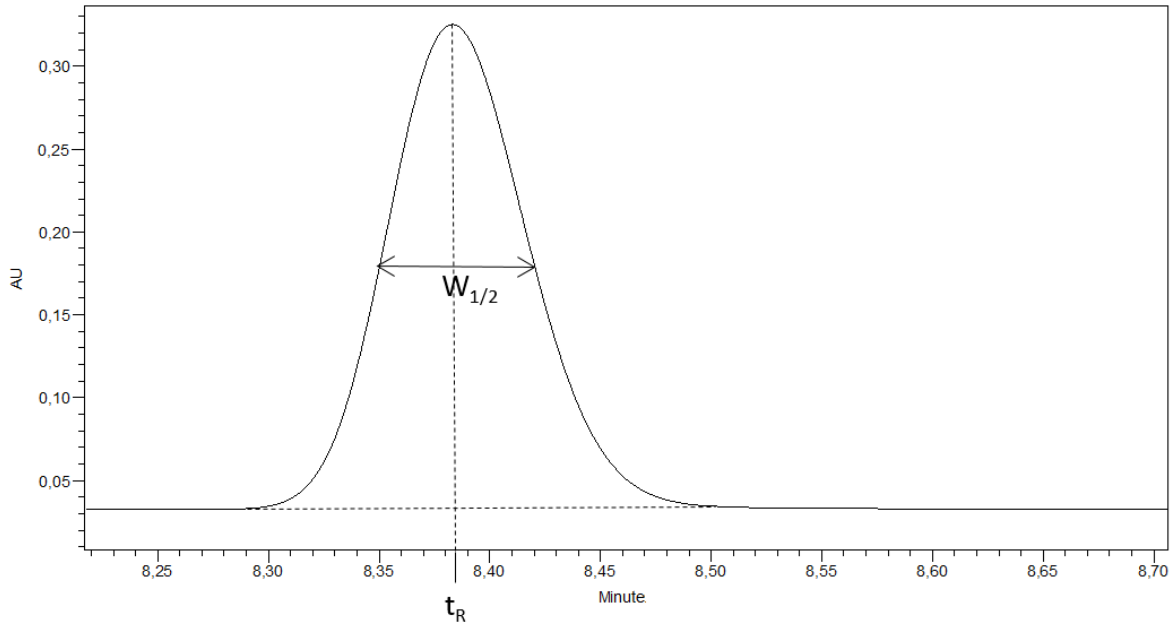
Kromatogram je zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata, sastoji se od kromatografskih krivulja - dijelova kromatograma koji pokazuju odnos promjene koncentracije razlučenog sastojka i vremena zadržavanja (http://struna.ihjj.hr). S obzirom na tip razvijanja kromatograma razlikujemo plošne i diferencijalne kromatograme. Plošne tehnike uključuju papirnu kromatografiju (engl. *paper chromatography*, PC), tankoslojnu kromatografiju (engl. *thin-layer chromatography*, TLC) i tankoslojnu kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *high-performance thin-layer chromatography*, HPTLC). Kod njih je nepokretna faza ploha, odnosno nalazi se na plohi, a pokretna faza se kreće kapilarnim silama ili pod utjecajem gravitacije preko nepokretne faze. Sastavnice uzorka prelaze različite udaljenosti u istom vremenu te se po završetku odjeljivanja detektiraju na nepokretnoj fazi. Kolonskim tehnikama dobivamo diferencijalne kromatograme, a one obuhvaćaju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatogrphy*, HPLC), plinsku kromatografiju (engl. *gas chromatography*, GC), kromatografiju sa superkritičnim tekućinama (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC) i druge. Za razliku od plošne kromatografije, ovdje sve sastavnice uzorka prelaze isti put ali se zbog specifičnih interakcija sa nepokretnom fazom na izlazu iz kolone pojavljuju u različitom vremenu te ih se detektira izvan nepokretne faze. Pokretna faza se pokreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije.

1.2.1. Kromatografski parametri

Prilikom razvoja metode postoji niz kromatografskih parametara koje je potrebno optimirati kako bi postigli željenu djelotvornost i preciznost. Sastavni dio svake metode je ispitivanje prikladnosti sustava kako bi osigurali valjano provođenje kromatografskog postupka.

Svaka kromatografska krivulja karakterizira se vremenom zadržavanja (t_R) i širinom kromatografske krivulje na polovici visine ($W_{1/2}$) (Slika 6). U praksi se često koristi relativno vrijeme zadržavanja (r_R) koje se računava prema jednadžbi (1) gdje je t_{R2} vrijeme zadržavanja kromatografske krivulje od interesa, a t_{R1} vrijeme zadržavanja glavne kromatografske krivulje (najčešće kromatografske krivulje analita).

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

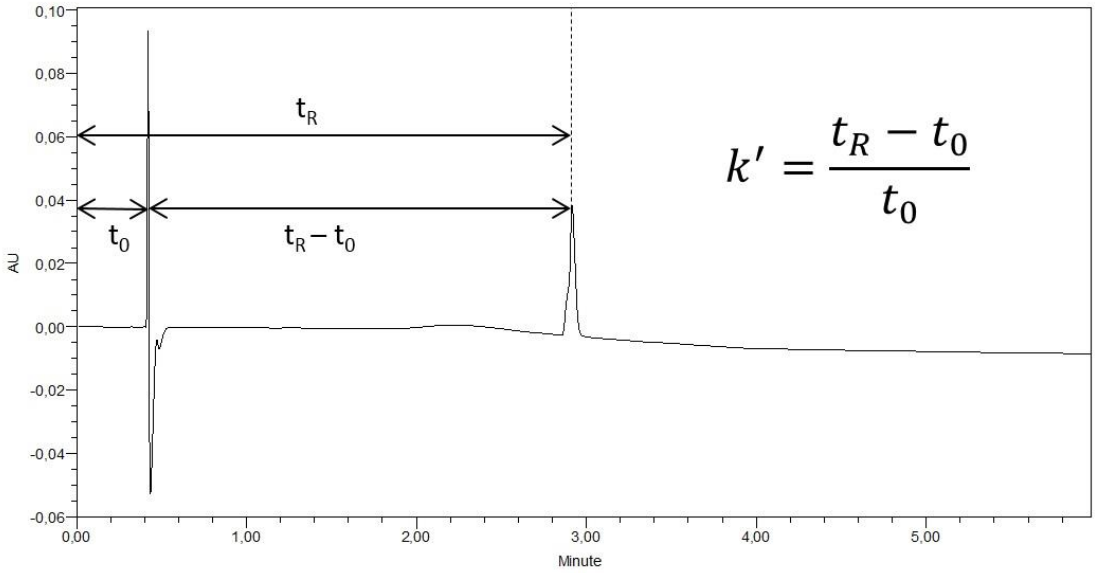


Slika 6: *Vrijeme zadržavanja (t_R) i širina kromatografske krivulje ($W_{1/2}$)*

Faktor kapaciteta (k') opisuje brzinu gibanja tvari u koloni i može se jednostavno mijenjati promjenom sastava pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji, odnosno promjenom temperature u plinskoj kromatografiji. Računa se prema jednadžbi (2) gdje je K_C ravnotežni omjer raspodjele, V_S volumen nepokretne faze, a V_M volumen pokretne faze.

$$k' = \frac{količina\ tvari\ u\ stacionarnoj\ fazi}{količina\ tvari\ u\ mobilnoj\ fazi} = K_C \frac{V_S}{V_M} \qquad (2)$$

Faktor kapaciteta također se može odrediti iz kromatograma (Slika 7) gdje je t_R vrijeme zadržavanja sastavnice uzorka, a t_0 vrijeme zadržavanja pokretne faze u kromatografskom sustavu („mrtvo vrijeme“) (www.struna.ihjj.hr).



Slika 7: *Određivanje faktora kapaciteta (k') iz kromatograma*

Djelotvornost kolone može se kvantitativno izraziti brojem i visinom teorijskih tavana, a raste povećanjem broja tavana (N) i smanjenjem visine tavana (h). Parametri procjene djelotvornosti kolone su razlučivanje (R_S), koeficijent selektivnosti (α), simetrijski faktor (A_S) i omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje (p/v, engl. *peak-to-valley*). Razlučivanje kolone je kvantitativna mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka. Može se poboljšati produženjem kolone i povećanjem faktora kapaciteta. Koeficijent selektivnosti pokazuje koliko će dobro kromatografska kolona odijeliti dva sastojka. Simetrijski faktor bi u idealnom slučaju trebao biti između 0,95 i 1,15, a uzroci loše simetrije mogu biti unos velike količine uzorka u kolonu, razgradnja uzorka, adsorpcija analita na aktivna mjesta nepokretne faze i drugi (Nigović, 2014a). Omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje važan je parametar kod odjeljivanja onečišćenja.

Parametri preciznosti određivanja su omjer signala i šuma (s/n, engl. *signal-to-noise*) te ponovljivost (RSD%).

Jednadžbe parametara djelotvornosti i preciznosti prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4: *Prikaz kromatografskih parametara i njihovih jednadžbi. (t_R- vrijeme zadržavanja sastavnice uzorka, $W_{1/2}$- širina kromatografske krivulje na polovici visine, L- duljina kolone, t_0- vrijeme zadržavanja pokretne faze u kromatografskom sustavu, k'- faktor kapaciteta, $W_{0.05}$- širina kromatografske krivulje na 0.05 visine, H_p- visina kromatografske krivulje iznad bazne linije, H_v- visina najniže točke između dvije kromatografske krivulje iznad bazne linije, H- visina kromatografske krivulje, n- šum bazne linije, s- standardna devijacija, $\bar{x}$- aritmetička sredina)*

Broj teorijskih tavana (N)	$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$
Visina teorijskih tavana (h)	$h = \frac{L}{N}$
Razlučivanje (Rs)	$R_S = \frac{1.18\,(t_{rB} - t_{rA})}{W_{B\,0.5} + W_{A\,0.5}}$
Koeficijent selektivnosti (α)	$\alpha = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0} = \frac{k'_B}{k'_A}$
Simetrijski faktor (As)	$A_S = \frac{W_{0.05}}{2d}$
Omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje (p/v)	$p/v = \frac{H_p}{H_v}$
Omjer signala i šuma (s/n)	$s/n = \frac{2H}{n}$
Ponovljivost (RSD%)	$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$

1.2.2. Kvantitativna analiza

Kromatogrami se kvantitativno mogu analizirati na više načina (Nigović, 2014a):

1. *Metoda s vanjskim standardom*: Koncentracija ispitivane tvari određuje se iz površine ili visine pripadajuće kromatografske krivulje usporedbom s površinom ili visinom kromatografske krivulje otopine standarda.
2. *Metoda sa unutranjim standardom*: Poznata količina unutarnjeg standarda dodaje se otopini uzorka s nepoznatom količinom tvari koja se određuje i otopini standarda. Koncentracija ispitivane tvari određuje se usporedbom omjera površine ili visine

kromatografske krivulje ispitivane tvari i unutarnjeg standarda s omjerom površine ili visine kromatografske krivulje otopine standarda i unutarnjeg standarda.

3. *Metoda standardnog dodatka:* Metoda se koristi za određivanje analita u uzorku čiji matriks mijenja faktor odgovora detektora. Alikvotima otopine uzorka doda se otopina standarda u rastućim koncentracijama. Iz odnosa izmjerene površine ili visine kromatografske krivulje i pripadajuće koncentracije dobije se kalibracijska funkcija. Ekstrapolacijom pravca do apscise očita se vrijednost koncentracije analita u uzorku (apsolutna vrijednost odsječka pravca).
4. *Metoda kalibracije*: Metoda zahtjeva pripremu koncentracijskog niza otopina standarda. Iz odnosa izmjerene površine ili visine kromatografske krivulje i pripadajuće koncentracije dobije se kalibracijska funkcija. Analitički rezultat računa se iz izmjerenog signala pomoću inverzne kalibracijske funkcije.
5. *Metoda ukupne površine*: Postotak sadržaja izračunava se iz omjera površine kromatografske krivulje određivane tvari i ukupne površine svih kromatografskih krivulja. Kod ove metode sve sastavnice uzorka moraju eluirati, odgovor detektora treba biti linearan s koncentracijom i treba postojati propisana granica za površinu kromatografskih krivulja koje se ne uključuje u računanje ukupnog zbroja površine svih kromatografskih krivulja. Postotak sadržaja ovisi o koncentraciji, odgovoru detektora i o apsorbanciji, ukoliko ju naš detektor mjeri, a računa se prema jednadžbi (3) gdje je A površina kromatografske krivulje, a f faktor odgovora. Faktor odgovora je relativna veličina koja predstavlja odnos površine kromatografske krivulje ispitivane tvari prema površini kromatografske krivulje otopine standarda srodnog spoja uz propisane uvjete. Ukoliko otopina srodnog spoja nije na raspolaganju moguće je koristiti jednadžbu (3) bez faktora odgovora.

$$c_x = \frac{A_x/f_x}{\sum A_i/f_i} \cdot 100 \qquad (3)$$

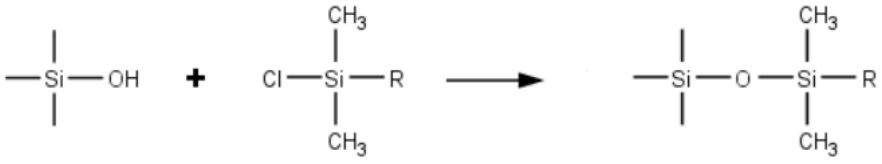
1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti tekuća pokretna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama nepokretne faze noseći sastavnice uzorka (Nigović, 2014b). Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti nepokretne faze, a razlikujemo razdjeljenje, adsorpciju, ionsku izmjenu, odjeljivanje prema veličini čestica i stereokemijske interakcije od kojih je razdjeljenje najčešće korišteni mehanizam. Razdjelna kromatografija dijeli se na kromatografiju normalnih i obrnutih faza, a 80% svih odjeljivanja ubrajamo u kromatografiju obrnutih faza. Kod kromatografije normalnih faza nepokretna faza je polarna (silikagel), a pokretna faza je manje polarna ili nepolarna (npr. heksan, izopropanol, metanol). Manje polarni spojevi se eluiraju prvi, a zatim slijede spojevi veće polarnosti. Što je pokretna faza nepolarnija to je njihovo vrijeme zadržavanja duže pa se povećanjem polarnosti pokretne faze ubrzava eluiranje. Kod kromatografije obrnutih faza nepokretna faza je nepolarna (kemijski modificirana površina silikagela) dok je pokretna faza polarna (npr. voda, metanol, acetonitril), a povećanjem nepolarnosti pokretne faze ubrzavamo eluaciju (Nigović, 2014b). Više polarni spojevi se eluiraju prvi, dok se oni manje polarni eluiraju kasnije.

1.3.1. Nepokretna faza

Kod kromatografije normalnih faza nepokretna faza je silikagel, dok je kod kromatografije obrnutih faza nepokretna faza kemijski modificirana površina silikagela.

Kemijski modificirana površina silikagela se dobiva reakcijom organosilana sa hidroksilnim skupinama na površini silikagela, a njezina polarnost ovisi o vezanim skupinama (R) (Slika 8). Oktadecilsilan, C18, (-$(CH_2)_{17}$-CH_3) i oktilsilan, C8, (-$(CH_2)_7$-CH_3) silikagel su najčešće korištene nepokretne faze i pokrivaju 80% farmaceutskih analiza.



Slika 8: *Reakcija organosilana s hidroksilnim skupinama na površini silikagela*

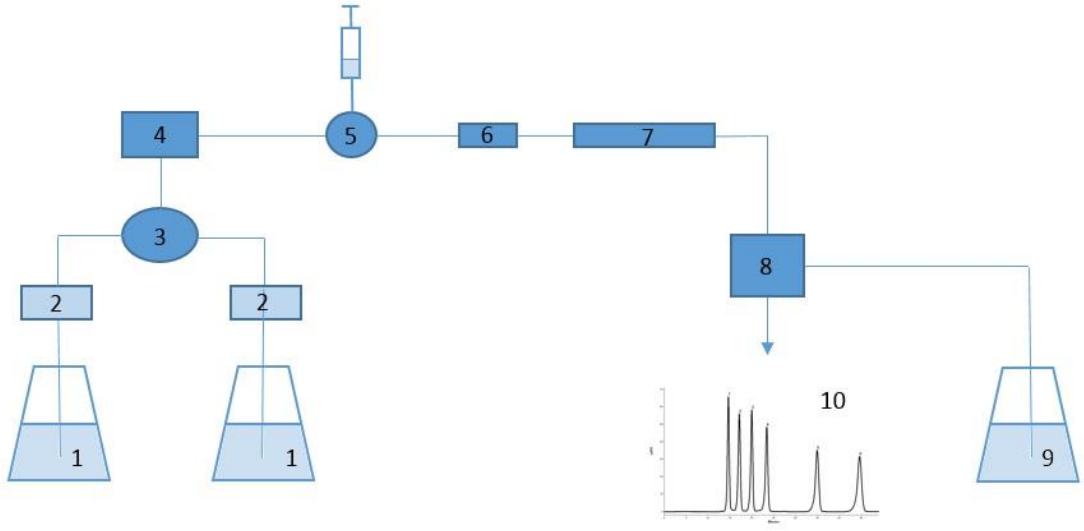
Pri izboru nepokretne faze (kolone) osim vrste punila, važni parametri su i veličina čestica, veličina pora punila, dužina te promjer kolone.

1.3.2. Pokretna faza

Sastav pokretne faze utječe na vrijeme zadržavanja sastavnica uzorka, a time i na djelotvornost odjeljivanja. Razlikujemo izokratno i gradijentno eluiranje. Izokratno eluiranje podrazumijeva konstantan sastav pokretne faze tijekom eluiranja. Međutim, njime se ne može uvijek postići željena djelotvornost, pa se češće koristi gradijentno eluiranje. Kod gradijentnog eluiranja se sastav mobilne faze mijenja kontinuirano ili skokovito čime se postiže djelotvornije odjeljivanje sastavnica te znatno kraće vrijeme eluiranja.

Pokretna faza ne smije sadržavati čestice veće od 0,45 μm (HPLC), odnosno 0,22 μm (UPLC), kako ne bi došlo do začepljenja kolone i smetnji u radu crpke. Iz tog razloga koriste se kemikalije kromatografskog stupnja čistoće ili se, ukoliko je potrebno, pokretne faze filtriraju.

1.3.3. Tekućinski kromatograf



Slika 9: *Shematski prikaz tekućinskog kromatografa. 1- spremnici pokretne faze, 2- sustav za obradu otapala, 3- komora za miješanje otapala, 4- crpka, 5- sustav za unošenje uzorka, 6- predkolona, 7- kolona, 8- detektor, 9- spremnik za otpad, 10- analitički zapis*

Tekućinski kromatograf (Slika 9) sastoji se od spremnika pokretne faze, sustava za obradu otapala (engl. *degasser*) koji uklanja otopljene plinove, komore za miješanje otapala, crpke, sustava za unošenje uzorka, predkolone (zaštita od mehaničkih onečišćenja u uzorku), kolone i detektora koji daje analitički zapis. Tekućina na izlazu iz kromatografa odlazi u spremnik za otpad.

Razlikujemo nekoliko vrsta detektora. UV/Vis detektor može snimati jednu odabranu valnu duljinu ili više njih, odnosno cijeli spektar od 190-800 nm. Takav varijabilni UV detektor se satoji od niza dioda (engl. *diode array detector*, DAD) te istovremeno pokriva široko UV/Vis područje s rezolucijom od 1 nm. Primjenjuje se za analizu uzoraka u kojima spojevi imaju veliku razliku u apsorbanciji ili kod uzoraka gdje se kromatografske krivulje preklapaju ali spojevi imaju različiti UV spektar, stoga služi i za identifikaciju prema UV spektru. Elektrokemijski detektor mjeri struju koja teče između radne i pomoćne elektrode, a struja nastaje zbog toga što odijeljeni analiti oksidiraju ili reduciraju promjenom potencijala između radne i referentne elektrode. Detektor indeksa loma mjeri promjene u indeksu loma pokretne faze prolaskom analita. Fluorescencijski detektor mjeri fluorescencijsku emisiju nakon pobuđivanja analita određenom valnom duljinom. Za strukturnu karakterizaciju onečišćenja često se koristi spregnuta tehnika tekućinske kromatografije sa spektrometrom masa (engl. *liquid chromatography- mass spectrometry*, LC-MS) gdje se analit detektira detektorom masa.

1.3.4. Primjena tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

HPLC se primjenjuje za odjeljivanje velikog broja organskih, anorganskih i bioloških spojeva, zatim polimera, kiralnih spojeva, termolabilnih spojeva, malih iona i makromolekula. Primjenjuje se za analizu onečišćenja, analizu hlapljivih i nehlapljivih spojeva, za određivanje iona, neutralnih molekula i dipolarnih iona (engl. *zwitterion*), izolaciju i čišćenje spojeva te odjeljivanje srodnih spojeva (Brown i DeAntonis, 1997).

Koristi se za određivanje sadržaja ljekovitih supstancija, praćenje stabilnosti ljekovitih supstancija i dozirnih oblika te određivanje sadržaja sintetskih međuprodukata i razgradnih produkata u dozirnim oblicima. Primjenjuje se za određivanje sadržaja aminokiselina, nukleinskih kiselina i proteina u biološkim tekućinama, za određivanje koeficijenta razdjeljenja i pK_a vrijednosti molekule lijeka te vezanja lijeka na proteine (Nigović, 2014b). Također se koristi za praćenje sintetskih reakcija i u kontroli kvalitete.

1.3.5. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) novo je razdoblje tekućinske kromatografije. UPLC kolone punjene su znatno manjim česticama (1,7 – 1,8 μm) od HPLC kolona (3 – 10 μm) te UPLC za razliku od HPLC-a postiže tlakove do 1000 bara, dok je HPLC ograničen na 400 bara. Navedene promjene u tehnologiji instrumenta i kolona dovele su do značajnog povećanja razlučivosti, brzine i osjetljivosti tekućinske kromatografije (www.waters.com). Primjena UPLC-a jednaka je primjeni HPLC-a.

1.4. Kvaliteta ugrađena u dizajn

Kvaliteta se definira kao prikladnost ljekovite supstancije ili proizvoda za ciljanu namjenu (ICH, 2009). Kvaliteta ugrađena u dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) podrazumijeva sistematični pristup razvoju koji počinje definiranim ciljevima i stavlja naglasak na razumijevanje proizvoda te razumijevanje i kontrolu procesa, a baziran je na znanstvenim dokazima i procjeni rizika kvalitete (ICH, 2009).

Pristup razvoju proizvoda varira ovisno o kompaniji, a može biti empirijski, sistematični (QbD) ili kombinacija oba pristupa. QbD značajno skraćuje vrijeme razvoja i smanjuje potrebne resurse. Može ubrzati postizanje željene kvalitete proizvoda i pomoći regulatornim tijelima da bolje razumiju strategiju kompanije (ICH, 2009). Prednosti QbD-a prepoznala je i američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) koja izrazito potiče njegovo korištenje (Sangshetti i sur., 2014).

Prednosti QbD-a su sljedeće (Sangshetti i sur., 2014):

- sigurnost pacijenta i učinkovitost proizvoda
- znanstveno razumijevanje farmaceutskog procesa i metode
- dizajn proizvoda i razvojnog procesa
- procjena rizika bazirana na znanstvenim činjenicama
- definirani kritični parametri kvalitete i analizirani njihovi učinci na kvalitetu konačnog proizvoda
- robusnost metode ili procesa
- prednosti u poslovanju kod primjene QbD-a

1.4.1. Razvoj analitičke metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn

Razvoj analitičke metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (engl. *Analytical Quality by Design*, AQbD) može uvelike skratiti vrijeme potrebno za njen razvoj, a time je i financijski isplativo.

DryLab (Molnár-institute, Germany) je jedan od AQbD programa koji se danas koriste i u skladu je sa Dobrom Proizvođačkom Praksom (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP). Program predviđa izgled kromatograma za široki raspon eksperimentalnih uvjeta te omogućuje razvoj i optimiranje LC metode u puno kraćem vremenskom okviru. DryLab brzo i jednostavno

prikazuje izgled kromatograma i učinkovitost odjeljivanja za višestruke parametre metode poput pH, temperature, koncentracije pufera i mnogih drugih. Potrebno je provesti od 2 do 12 početnih eksperimenata čije podatke DryLab obrađuje te na osnovu njih predviđa vremena zadržavanja i razlučivanje pojedine kromatografske krivulje virtualnih kromatograma. Kreiranjem multidimenzionalnih modela razlučivanja prikazuje skupine uvjete pri kojima se kromatografske krivulje najbolje odjeljuju. Smatra se da DryLab predviđa širinu kromatografskih krivulja i njihova vremena zadržavanja sa više od 99% točnosti.

Koristeći DryLab moguće je predvidjeti utjecaj na odjeljivanje i drugih parametara poput brzine protoka, dimenzija kolone, instrumentalnih parametara te izokratnog ili gradijentnog eluiranja. Također nudi mogućnost testiranja robusnosti na način da radi male promjene kritičnih parametara metode te određuje parametre koje je potrebno strogo kontrolirati pri provođenju analize (www.molnar-institute.com).

1.5. Onečišćenja u lijekovima

Onečišćenje je bilo koji sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar. Zahtjevi kakvoće lijeka definiraju prihvatljive granice za onečišćenja koja se dozvoljavaju u roku trajanja farmaceutskog proizvoda. Zbog interesa javnog zdravlja broj ispitanika i postavljene granice onečišćenja trebaju biti smanjene tako da odgovaraju farmaceutskim zahtjevima, ali treba izbjeći pretjerano čišćenje koje bi posljedično povećalo cijenu lijeka. Posebnu pažnju potrebno je posvetiti onečišćenjima s toksičnim svojstvima, farmakološki aktivnim onečišćenjima, onečišćenjima koja mijenjaju aktivnost i djeluju na stabilnost same ljekovite tvari te onečišćenjima koja utječu na analitičke rezultate (Nigović, 2013).

Od velike je važnosti ispitati onečišćenja farmaceutskog proizvoda, a ne samo djelatne tvari. Naime, može doći do interakcija djelatnih tvari u višekomponentnom uzorku, inerakcija djelatnih i pomoćnih tvari te interakcija sa primarnim spremnikom, a također je potrebno provjeriti kompatibilnost kationa i aniona.

Izvori onečišćenja mogu biti različiti (Nigović, 2013):

- onečišćenja u polaznim sirovinama
- nusprodukti i međuprodukti u proizvodnom procesu
- produkti razgradnje lijeka koji nastaju tijekom čuvanja i/ili djelovanjem svjetlosti, temperature, pH ili vode
- produkti razgradnje lijeka koji nastaju tijekom izrade ili čuvanja farmaceutskog dozirnog oblika
- produkti koji nastaju reakcijom s pomoćnim tvarima ili spremnikom
- usput ekstrahirane tvari iz prirodnih produkata

1.5.1. Kontrola i vrste onečišćenja

Prema ICH smjernicama onečišćenja se kontroliraju u novih ljekovitim supstancijama i dozirnim oblicima (ICH, 2006a; ICH, 2006b). Dijele se na organska i anorganska onečišćenja, te ostatna otapala.

Organska onečišćenja mogu biti polazne sirovine, nusprodukti i međuprodukti, razgradni produkti te reagensi, ligandi ili katalizatori (ICH, 2006a). Dijele se na specificirana onečišćenja

i ostala onečišćenja koja se mogu dokazati. Specificirana onečišćenja su poznata onečišćenja i dijele se na identificirana (karakterizirana kemijskom strukturom) i neidentificirana (definirana isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvima poput kromatografskog vremena zadržavanja). Ostala onečišćenja koja se ne mogu dokazati su potencijalna onečišćenja koja nisu detektirana niti u jednom ispitivanom uzorku tijekom izrade monografije, ali su ograničena ispitivanjima u Europskoj farmakopeji. Ona mogu nastati u proizvodnom postupku ili stajanjem te mogu, ili ne moraju, biti prisutna u ljekovitoj tvari (Nigović, 2013).

Prihvatljive granice za organska onečišćenja u ljekovitim supstancijama prikazane su u Tablici 5, a granice za degradacijske produkte u dozirnim oblicima u Tablici 6. Ukoliko onečišćenja prelaze granicu za izvještavanje potrebna je izjava o onečišćenjma u kojoj je dan točan postotak onečišćenja i metoda analize. Ako su granice veće od navedenih potrebno ih je znanstveno opravdati. Za onečišćenja koja prelaze granicu za identifikaciju potrebna je strukturna karakterizacija, dok je za onečišćenja koja prelaze granicu za kvalifikaciju potrebna procjena biološke sigurnosti (Nigović, 2013). Za iznimno toksična onečišćenja navedene granice mogu biti i niže. Sve navedeno vrijedi i za degradacijske produkte u dozirnim oblicima. Definirane granice onečišćenja ne odnose se na pomoćne tvari, biološke i biotehnološke proizvode, peptide, oligonukleotide, radiofarmaceutike, fermentacijske i polusintetske proizvode, biljne proizvode i produkte iz biljnih i životinjskih vrsta (ICH, 2006a; ICH, 2006b).

Tablica 5: *Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju za onečišćenja u ljekovitim supstancijama prema ICH smjernicama (ICH, 2006a)*

Maksimalna dnevna doza	**Granica za izvještavanje**	**Granica za identifikaciju**	**Granica za kvalifikaciju**
≤ 2 g/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)
> 2 g/dan	0,03%	0,05%	0,05%

U anorganska onečišćenja ubrajamo reagense, ligande i katalizatore, zatim teške i ostale metale, anorganske soli te materijale poput filtera, ugljena i drugih. Normalno se detektiraju i kvantificiraju koristeći farmakopejske ili druge prikladne postupke (ICH, 2006a). Granice za

anorganska onečišćnja ovise o namjeni ispitivanog materijala, količini i načinu doziranja (Nigović, 2013).

Tablica 6: *Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju za razgradne produkte u dozirnim oblicima prema ICH smjernicama* (ICH, 2006b)

Maksimalna dnevna doza	Granica
Granica za izvještavanje	
≤ 1 g/dan	0,1%
> 1 g/dan	0,05%
Granica za identifikaciju	
< 1 mg/dan	1,0% ili 5 µg UDU (ovisno što je niže)
1 – 10 mg/dan	0,5% ili 20 µg UDU (ovisno što je niže)
> 100 mg/dan – 2 g/dan	0,2% ili 2 mg UDU (ovisno što je niže)
> 2 g/dan	0,10%
Granica za kvalifikaciju	
< 10 mg/dan	1,0% ili 50 µg UDU (ovisno što je niže)
10 – 100 mg/dan	0,5% ili 200 µg UDU (ovisno što je niže)
> 100 mg/dan – 2 g/dan	0,2% ili 3 mg UDU (ovisno što je niže)
> 2 g/dan	0,15%

Ostatna otapala definiraju se kao zaostale, hlapljive, organske kemikalije koje se rabe ili nastaju u postupku proizvodnje (Nigović, 2013). Granice za ostatna otapala definirane su ICH smjernicama, a dijele se u tri skupine: otapala koja treba izbjegavati, otapala koja treba ograničiti i otapala sa niskom toksičnosti. U otapala koja treba izbjegavati ubrajamo humane karcinogene i otapala štetna za okoliš, a u otapala koja treba ograničiti animalne karcinogene koji nisu genotoksični, otapala koja su ireverzibilno toksična poput neurotoksičnih i teratogenih otapala te ostala otapala sa značajnom toksičnosti koja je reverzibilna (ICH, 2011).

Nova onečišćenja mogu se pronaći u poznatoj tvari uslijed izmjene postupka proizvodnje. Može doći do promjene u količini onečišćenja te do nastajanja novih oblika onečišćenja (Nigović, 2013). Iz tog razloga je od velike važnosti razviti analitičku metodu sa sposobnošću otkrivanja novih onečišćenja.

1.6. Forsirana razgradnja

Forsirana razgradnja (engl. *stress test*) je postupak kojim se ubrzano razgrađuje ljekovita supstancija ili dozirni oblik na ekstremnim uvjetima kako bi se dobila potencijalna onečišćenja. Tijekom forsirane razgradnje uzorci se izlažu visokoj temperaturi i svjetlosti, a ispituje se i njihova osjetljivost na oksidanse, kiselinu i lužinu. Točni uvjeti ispitivanja ovise o prirodi ljekovite supstancije i tipu dozirnog oblika, ali i o učinku kojeg je potrebno ispitati.

Na temelju rezultata forsirane razgradnje moguće je identificirati ključne faktore koji utječu na stabilnost ljekovite supstancije ili dozirnog oblika, te utvrditi razgradne puteve i moguće razgradne produkte. U razvoju metode za određivanje onečišćenja važno je rezultatima forsirane razgradnje pokazati da se potencijalna onečišćenja odjeljuju međusobno i od analita, dok je u razvoju metode za određivanje sadržaja važno pokazati odjeljivanje potencijalnih onečišćenja od analita kako ona ne bi utjecala na površinu njihovih kromatografskih krivulja.

Forsirana razgradnja omogućuje sakupljanje osnovnih informacija o stabilnosti lijeka u vrlo kratkom vremenu te je važan dio razvoja i validacije analitičke metode. Rezultati ispitivanja također mogu pomoći pri odabiru formulacije ili pri razvoju proizvodnog procesa. Važno je naglasiti da kod interpretacije rezultata treba biti oprezan jer do nekih promjena uočenih u toku forsirane razgradnje nikad neće doći pri normalnim uvjetima čuvanja te će izostati pri dugoročnom i ubrzanom ispitivanju stabilnosti. Dakle, rezultati mogu poslužiti samo kao smjernice i preliminarne informacije dok se konačni zaključci o stabilnosti supstancije ili dozirnog oblika mogu donijeti tek nakon formalnog ispitivanja stabilnosti (Lusina, 2006).

Preporuka je da se ljekovita supstancija ili dozirni oblik razgradi od 10 – 30%. Kod većeg udjela razgradnje moguće je da nastaju sekundarni degradacijski produkti što se nastoji izbjeći. Preporuke za ispitivanje osjetljivosti na kiselinu, lužinu i oksidanse nalaze se u Tablici 7.

***Tablica 7**: Preporuke za forsiranu razgradnju za ispitivanje osjetljivosti na kiselinu, lužinu i oksidanse*

Tip degradacije	Uvjet forsirane razgradnje	Temperatura (°C)	Trajanje
Kiselina	0,1 – 2M HCl (+ NaOH za neutralizaciju)	40 – 60°C	Do 5 dana
Lužina	0,1 – 2M NaOH (+ HCl za neutralizaciju)	40 - 60°C	Do 5 dana
Oksidans (H_2O_2)	5 - 10% H_2O_2	40°C	2 h, 4 h, 8 h, 24 h
Oksidans (H_2O_2)	5 - 10% H_2O_2	Sobna temperatura	Do 7 dana

2. Obrazloženje teme

Febantel/pirantel/prazikvantel (FEB/PIR/PRZ) i albendazol/levamisol (ALB/LEV) ljekovite su supstancije koje se koriste u veterinarskoj praksi u obliku višekomponentnih tableta. Tablete sa febantelom, pirantel pamoatom i prazikvantelom kao ljekovitim supstancijama postoje na hrvatskom tržištu pod trgovačkim imenom PRAZINON Plus (Genera, Hrvatska) i indicirane su kao anthelmintik za pse, dok se tablete s levamisolom i albendazolom kao ljekovitim supstancijama nalaze isključivo na inozemnom tržištu.

Sigurnost lijeka određuje se, osim njegovim farmakološko-toksikološkim profilom, i neželjenim učincima uzrokovanim onečišćenjima koje sadrži. Iz tog razloga postoje propisane granice za pojedinu vrstu onečišćenja i ona se moraju strogo kontrolirati.

Kako bi se olakšala i ubrzala analiza ovih višekomponentnih tableta cilj je razviti zajedničke metode za određivanje sadržaja i onečišćenja za FEB/PIR/PRZ i za ALB/LEV. U literaturi već postoji opisana metoda za određivanje sadržaja FEB/PIR/PRZ na HPLC-u u trajanju od 25 min (Białecka i Kulik, 2010), a u ovom radu je cilj razviti selektivnu metodu na UPLC-u kojom će se skratiti vrijeme analize. Kako bi se skratilo vrijeme i resursi potrebni za razvoj, metode će biti razvijane po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD), a selektivnost metoda dodatno će se potvrditi rezultatima forsirane razgradnje.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

U izradi ovog diplomskog rada korišteni su standardi (engl. *chemical reference substance*, CRS) febantela (FEB), prazikvantela (PRZ) (Ph. Eur. Reference Standard), pirantel pamoata (PIR), albendazola (ALB) i levamisola (LEV) (USP Reference Standard) te ljekovite supstancije (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API) istih (Veterina d.o.o., Hrvatska).

Metanol, acetonitril i mravlja kiselina nabavljeni su od Mercka (SAD), a natrijev hidroksid, klorovodična kiselina i vodikov peroksid od Kemike (Hrvatska). Metanol i acetonitril bili su kromatografskog stupnja čistoće, a korištena voda je bila ultra visoke čistoće (Milli-Q Integral Water Purification System, Merck).

Ispitivanja su provedena na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti ACQUITY® UPLC H class system (Waters, Velika Britanija) s kvaternom pumpom ACQUITY® UPLC Quaternary Solvent Manager, automatskim dodavačem uzoraka ACQUITY® UPLC Sample Manager, odjeljkom za kolonu ACQUITY® UPLC Column Manager i fotoelektričnim detektorom s diodnim nizom (engl. *photodiode array*, PDA) ACQUITY® UPLC Photodiode Array Detector. Kao sredstvo za ispiranje igle izvana (engl. *wash solvent*) korištena je mješavina acetonitrila i metanola u volumnom omjeru 50:50, kao sredstvo za ispiranje igle iznutra (engl. *purge solvent*) 1% acetonitril u pročišćenoj vodi, a kao sredstvo za ispiranje brtvi (engl. *seal wash*) 10% acetonitril u pročišćenoj vodi.

Svi kromatogrami procesirani su u programskom paketu Empower (Waters, Velika Britanija).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema temeljnih standardnih otopina i razrijeđenih otopina

Temeljne standardne otopine (engl. *stock solution*) pripremljene su u koncentraciji 0,1 mg/ml. Odvagama anthelmintika dodan je metanol u volumenu 70% volumetrijske tikvice. Tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min, a zatim nadopunjene do oznake acetonitrilom.

Razrijeđene otopine pripremljene se razrjeđenjem temeljnih standarnih otopinama sa pročišćenom vodom kako bi se dobile konačne koncentracije: 0,03 mg/ml za FEB i PIR, 0,02 mg/ml za ALB i 0,01 mg/ml za PRZ i LEV koje približno odgovaraju omjeru FEB/PIR/PRZ u tabletama PRAZINON Plus (150 mg, 144 mg, 50 mg) (Genera, Hrvatska), odnosno omjeru ALB/LEV u tabletama Ecsital (300 mg, 150 mg) (Ecstasy Biotech Pvt, Indija).

Sve otopine PIR pripremljene su u tamnim tikvicama te u prostoriji sa izvorom crvene svjetlosti kako bi se izbjeglo stvaranje fotoizomera (Radman, 2014). Crvena boja je valne duljine između 625 – 740 nm što je dvostruko iznad apsorpcijskog maksimuma PIR koji iznosi 310 nm.

3.2.2. Određivanje mrtvog volumena UPLC tekućinskog kromatografa

Mrtvi volumen (engl. *dwell volume*) se definira kao volumen uređaja od komore za miješanje otapala do početka kolone. Jedan je od važnih parametara koje je potrebno odrediti za točnost predviđanja kromatografskih parametara programskim paketom DryLab.

Određuje se tako da se ukloni kolona i pokrene eluiranje. Eluiranje je provedeno na tekućinskom kromatografu ACQUITY® UPLC H Class System (Waters, Velika Britanija). Korištene su pročišćena voda kao pokretna faza A i 0,2% aceton u pročišćenoj vodi kao pokretna faza B. Provedeno je gradijentno eluiranje od 0 – 100% B u trajanju od 10 min, pri protoku od 0,5 ml/min. Praćena je valna duljina od 265 nm. Mrtvi volumen određen je iz dobivenog kromatograma prema jednadžbama 4 i 5 gdje je AU (100% B) broj apsorpcijskih jedinica (engl. *absorption units*) kada pokretna faza sadrži samo tekućinu iz kanala B, a AU (0% B) samo tekućinu iz kanala A. AU (50% B) je broj apsorpcijskih jedinica u trenutku omjera pokretnih faza A:B=50:50, a taj trenutak definiramo kao $t_{AU(50\%\ B)}$. $t_{50\%}$ je vrijednost definirana kao polovica ukupnog vremena eluiranja koje je određeno metodom i iznosi 5 min, dok je brzina protoka također određena metodom i iznosi 0,5 mL/min.

$$AU\ (50\%\ B) = \frac{AU\ (100\%\ B) - AU\ (0\%\ B)}{2} \quad (4)$$

$$Mrtvi\ volumen = \left(t_{AU(50\%B)} - t_{50\%} \right) \cdot brzina\ protoka\ (ml/min) \quad (5)$$

3.2.3. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje anthelmintika

Kako bi se dobio optimalni pH za odjeljivanje FEB/PIR/PRZ i ALB/LEV te njihovih onečišćenja korišten je programski paket Marvin Beans (ChemAxon, Mađarska) u kojemu su nacrtane strukture spojeva i njihovih specificiranih onečišćenja (Slike 1-5). Program nudi opciju kojom računa koeficijent distribucije (logD) svake pojedine strukture i na temelju dobivenih podataka daje uvid u optimalni pH za odjeljivanje sastavnica.

3.2.4. Određivanje optimalne metode za odjeljivanje onečišćenja anthelmintika

Kako bi se odredila najkraća i najučinkovitija metoda za odjeljivanje anthelmintika u što kraćem vremenskom periodu korišten je programski paket DryLab (Molnár-institute, Njemačka).

Ispitivanja su provedena na tekućinskom kromatografu ACQUITY® UPLC H Class System (Waters, Velika Britanija). Kao pokretne faze korištene su 0,1% mravlja kiselina u vodi (kanal A) i acetonitril (kanal B). Korišteni su anthelmintici u koncentraciji 0,015 mg/ml, a injektirano je 6 µL uzorka. Provedeno je gradijentno eluiranje od 2-70% acetonitrila. Testiran je utjecaj vremena eluiranja (15 i 50 min) na odjeljivanje kromatografskih krivulja FEB/PIR/PRZ, a preliminarnim ispitivanjima utvrđena je brzina protoka 0,6 ml/min te temperatura kolone 70°C. Za ALB/LEV testirana su dva parametra: temperatura (35°C i 70°C) i vrijeme eluiranja (15 i 50 min) dok je preliminarnim ispitivanjem utvrđena brzina protoka 0,6 ml/min.

Opisanim eluiranjem anthelmintika testirano je pet različitih kolona kako bi se odabrala najprikladnija za njihovo odjeljivanje: Fortis C18 (100 x 2,1 nm, 1,7 µm), Fortis Diphenyl (100 x 2,1 nm, 1,7 µm) (Fortis Technologies Ltd., Velika Britanija), ACQUITY® HSS C18 (100 x 2,1 nm, 1,8 µm), ACQUITY® BEH C18 (100 x 2,1 nm, 1,7 µm), ACQUITY® CSH Phenyl-Hexyl (100 x 2,1 nm, 1,7 µm) (Waters, Velika Britanija).

Na osnovu predviđanja DryLab-a određena je optimalna metoda za odjeljivanje FEB/PIR/PRZ i ALB/LEV.

3.2.5. Metoda za određivanje sadržaja za febantel/pirantel/prazikvantel

Metoda je razvijena na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti ACQUITY® UPLC H Class System (Waters, Velika Britanija). Separacija se odvijala na koloni ACQUITY® BEH C18 (100 x 2,1 nm, 1,7 µm) gradijentnim eluiranjem u trajanju od 10 min (Tablica 8) pri protoku od 0,6 mL/min i temperaturi od 70°C pomoću pokretnih faza 0,1% mravlje kiseline u pročišćenoj vodi (kanal A) i acetonitrila (kanal B). Temperatura automatskog dodavača uzoraka (engl. *autosampler*) namještena je na 20°C, a volumen injektiranja bio je 6 µL. Vrijeme ujednačavanja (engl. *equilibration time*) nakon eluiranja iznosilo je jednu minutu. Apsorbancija je mjerena pri 240 nm za FEB i pamoat, 310 nm za PIR i 195 nm za PRZ sa rezolucijom od 4,8 nm te je mjeren cijeli UV spektar od 190 – 400 nm sa rezolucijom od 1,2 nm.

Tablica 8: *UPLC metoda za određivanje sadržaja za febantel/pirantel/prazikvantel*

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	85	15
3	70	30
10	20	80

3.2.6. Metoda za određivanje onečišćenja za FEB/PIR/PRZ

Uređaj, kolona, pokretne faze, temperatura automatskog dodavača uzoraka, brzina protoka, temperatura kolone, volumen injektiranja, vrijeme ujednačavanja i valne duljine na kojima je mjerena apsorbancija bili su jednaki kao i u metodi za određivanje sadržaja za FEB/PIR/PRZ (3.2.5). Eluiranje je bilo gradijentno u trajanju od 19 min (Tablica 9). Kromatogrami su kvantitativno analizirani metodom ukupne površine.

Tablica 9: *UPLC metoda za određivanje onečišćenja za febantel/pirantel/prazikvantel*

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	95	5
1	95	5
3	75	25
6	68	32
13	68	32
18	20	80
19	20	80

3.2.7. Metoda za određivanje sadržaja za ALB/LEV

Uređaj, kolona, pokretne faze, brzina protoka, temperatura automatskog dodavača uzoraka i vrijeme ujednačavanja bili su jednaki kao i kod određivanja sadržaja za FEB/PIR/PRZ (3.2.5). Temperatura kolone bila je 32°C, a volumen injektiranja 8 µl. Apsorbancija je mjerena pri 223 nm za ALB i 215 nm za LEV sa rezolucijom od 4,8 nm te je mjeren cijeli UV spektar od 190 – 400 nm sa rezolucijom od 1,2 nm. Eluiranje je bilo gradijentno u trajanju od 7 min (Metoda A, Tablica 10).

Tablica 10: *UPLC metoda A za određivanje sadržaja za albendazol/levamisol*

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	95	5
1	95	5
3	79	21
7	30	70

3.2.8. Metoda za određivanje onečišćenja za ALB/LEV

Uređaj, kolona, pokretne faze, temperatura automatskog dodavača uzoraka, brzina protoka, temperatura kolone, volumen injektiranja, vrijeme ujednačavanja i valne duljine na kojima je mjerena apsorbancija bili su jednaki kao i u metodi za određivanje sadržaja za ALB/LEV

(3.2.7). Eluiranje je bilo gradijentno u trajanju od 10 min (Metoda A, Tablica 11). Kromatogrami su kvantitativno analizirani metodom ukupne površine.

Tablica 11: *UPLC metoda A za određivanje onečišćenja za albendazol/levamisol*

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	95	5
1	95	5
3	79	21
7	30	70
10	30	70

3.2.9. Forsirana razgradnja

Forsirana razgradnja provedena je na temeljnoj standardnoj otopini API-a FEB, PIR, PRZ, ALB i LEV. Odvagama anthelmintika dodan je metanol u volumenu 70% volumetrijske tikvice. Tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min, a zatim tretirane kiselinom (HCl)/lužinom (NaOH)/oksidansom (H_2O_2), odnosno grijane su na 80°C. Reagensi forsirane razgradnje dodani su do 80% volumena volumetrijske tikvice nakon čega su tikvice držane na sobnoj ili povišenoj temperaturi određeno vrijeme. Tikvice tretirane lužinom i kiselinom su neutralizirane jednakim udjelom kiseline, odnosno lužine jednakog molariteta, te potom nadopunjene do oznake metanolom. Tikvice tretirane oksidansom ili izložene povišenoj temperaturi su nadopunjene do oznake metanolom. Otopine su dalje razrijeđene prema pripremi opisanoj u poglavlju (3.2.1).

Uvjeti forsirane razgradnje za FEB:

- Temperatura, 80°C, 24 h
- 5% H_2O_2, 7 h
- 0,1M NaOH, 2 min
- 1M HCl, 1 h

Uvjeti forsirane razgradnje za PIR:

- Temperatura, 80°C, 24 h
- Sobna svjetlost
- 10% H_2O_2, 80°C, 24 h
- 5M NaOH, 1 h
- 5M HCl, 72 h

Uvjeti forsirane razgradnje za PRZ:

- Temperatura, 80°C, 24 h
- 10% H_2O_2, 80°C, 24 h
- 1M NaOH, 5 h
- 5M HCl, 48 h

Uvjeti forsirane razgradnje za ALB:

- Temperatura, 80°C, 24 h
- 10% H_2O_2, 30 min
- 1M NaOH, 24 h
- 5M HCl, 5 h

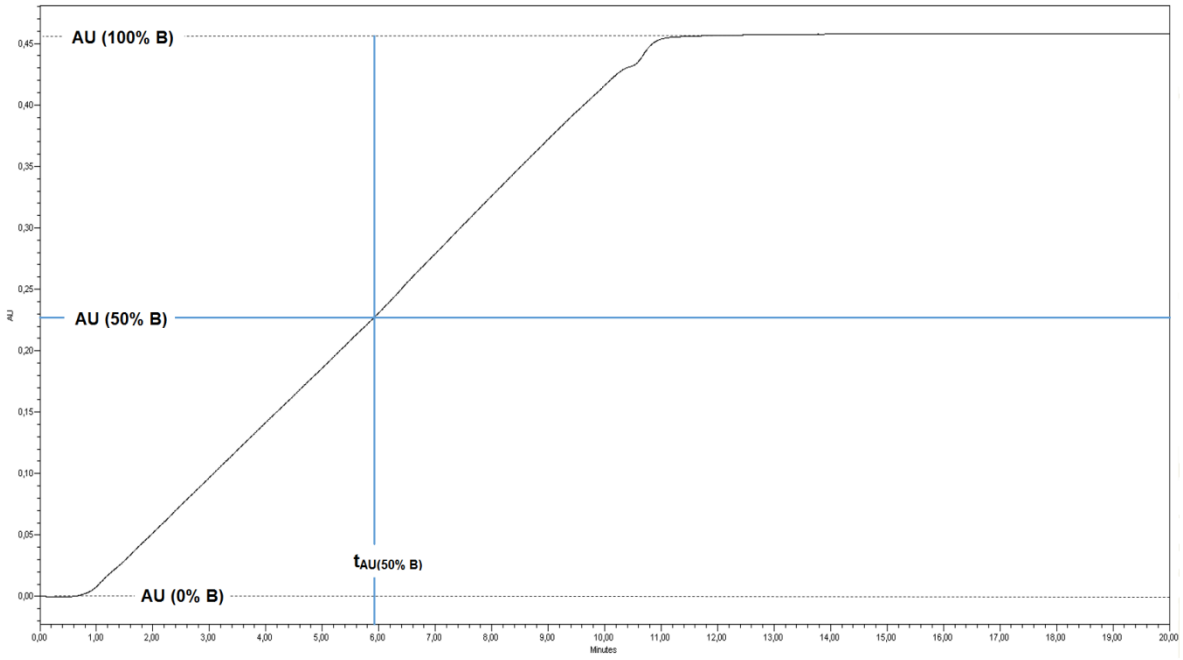
Uvjeti forsirane razgradnje za LEV:

- Temperatura, 80°C, 24 h
- 10% H_2O_2, 80°C, 24 h
- 5M NaOH, 48 h
- 5M HCl, 80°C, 24 h

4. Rezultati

4.1. Određivanje mrtvog volumena UPLC tekućinskog kromatografa

Mrtvi volumen tekućinskog kromatografa ACQUITY® UPLC H Class System (Waters, Velika Britanija) određen je iz kromatograma (Slika 10) prema jednadžbama 4 i 5, te iznosi 0,46 mL.

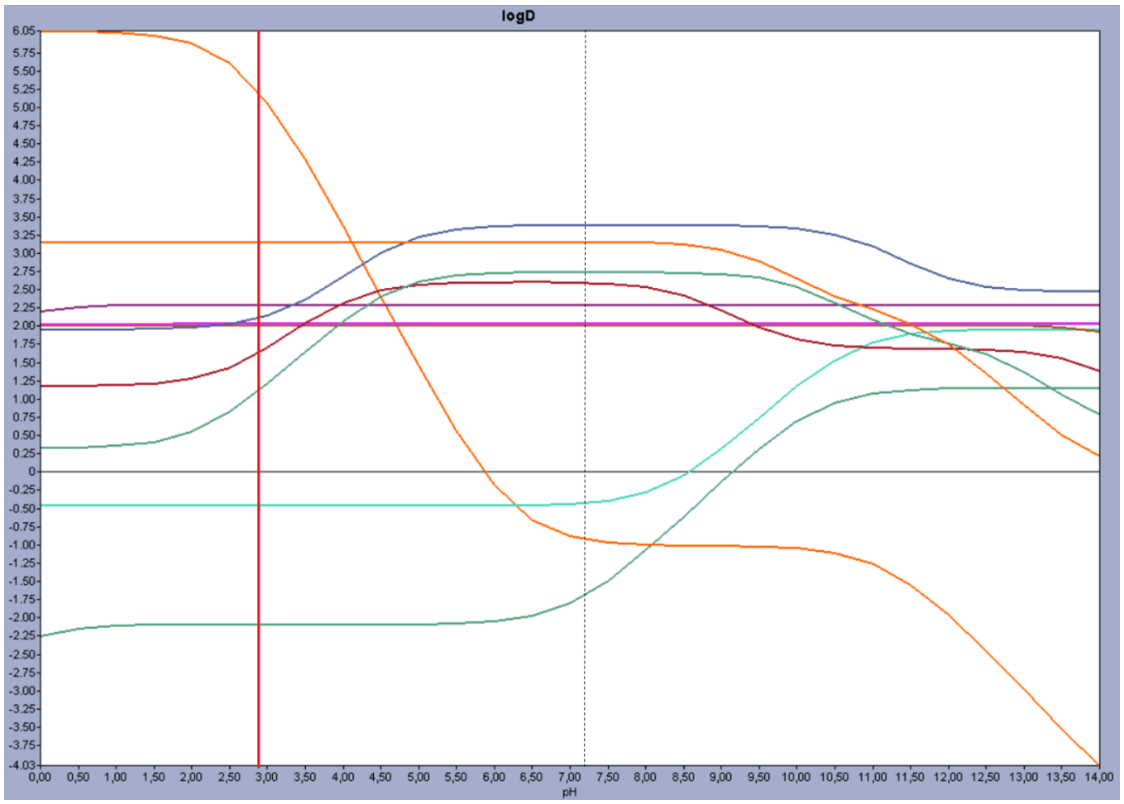


***Slika 10**: Kromatografski prikaz određivanja mrtvog volumena tekućinskog kromatografa*

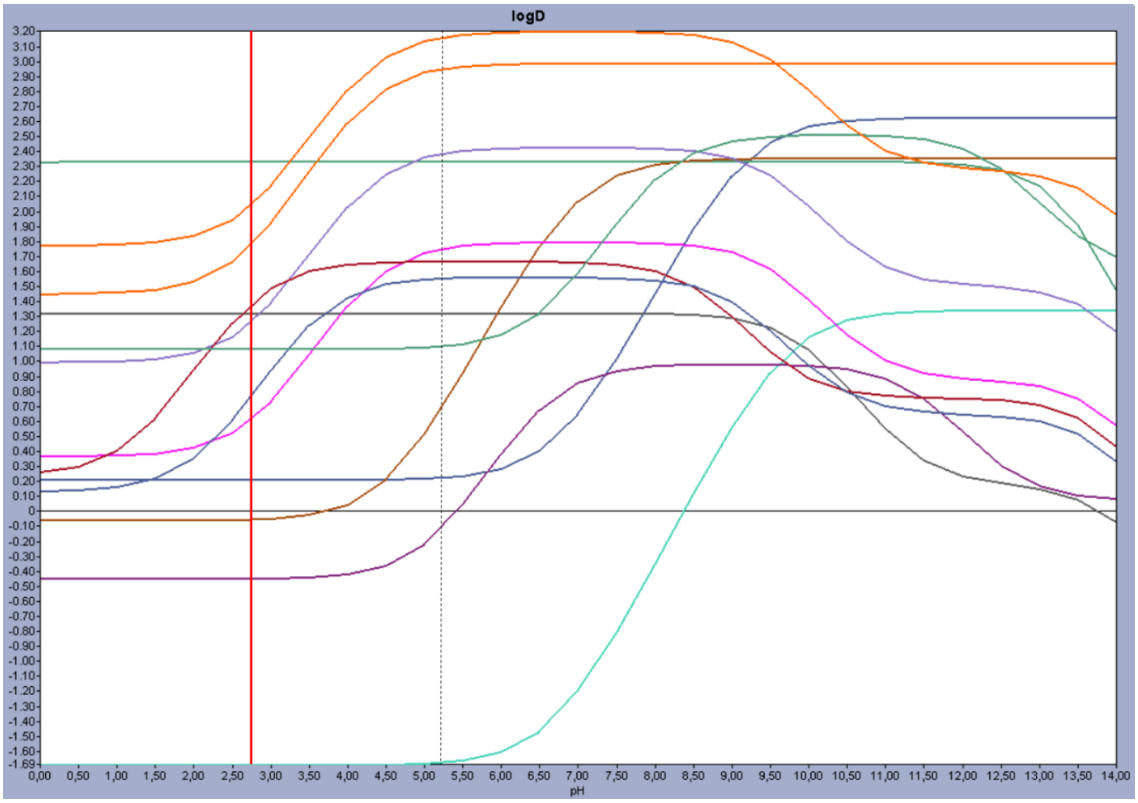
4.2. Određivanje prikladnog pH za odjeljivanje anthelmintika

Korištenjem programskog paketa Marvin Beans (ChemAxon, Mađarska) dobivena je ovisnost koeficijenta distribucije (logD) FEB, PIR, PRZ i njihovih specificiranih onečišćenja (Slika 11), odnosno ALB, LEV i njihovih specificiranih onečišćenja (Slika 12) o pH. Sastavnice uzorka u oba slučaja moguće je odijeliti u različitom rasponu pH.

Za ispitivanja provedena u ovom radu za FEB/PIR/PRZ odabran je pH 2,8, a najveća razlika u logD svih sastavnica uzorka primjećena je pri pH 7,1, dok je za ALB/LEV odabran pH 2,75, a najveća razlika u logD svih sastavnica uzorka primjećena je pri pH 5,2.



Slika 11: *Grafički prikaz ovisnosti logD febantela, pirantela, prazikvantela i njihovih specificiranih onečišćenja o pH*

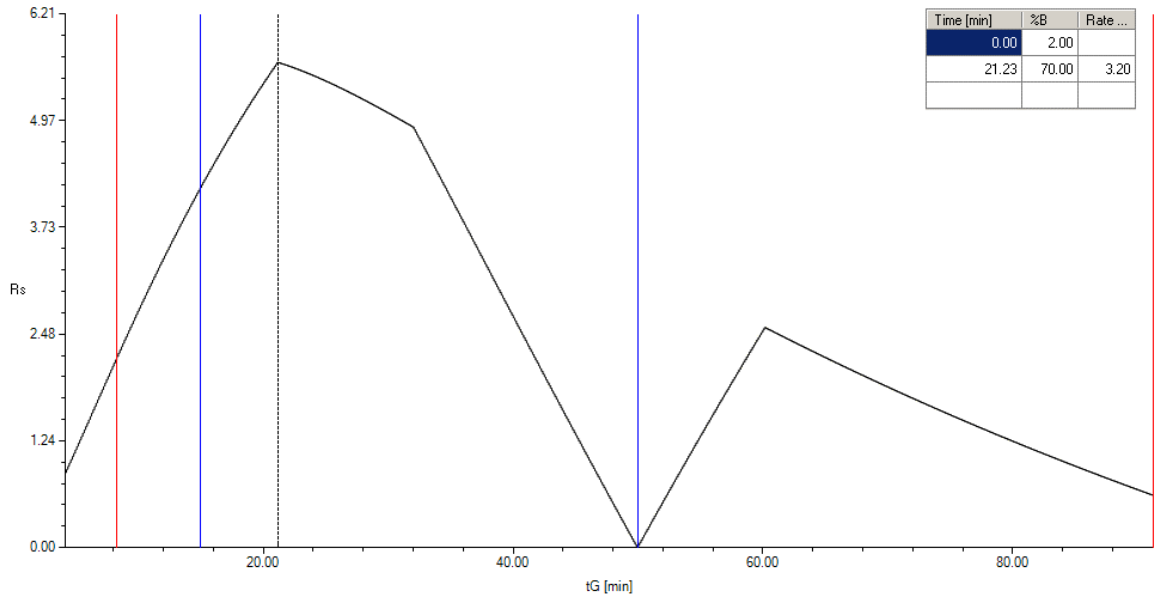


Slika 12: *Grafički prikaz ovisnosti logD albendazola, levamisola i njihovih specificiranih onečišćenja o pH*

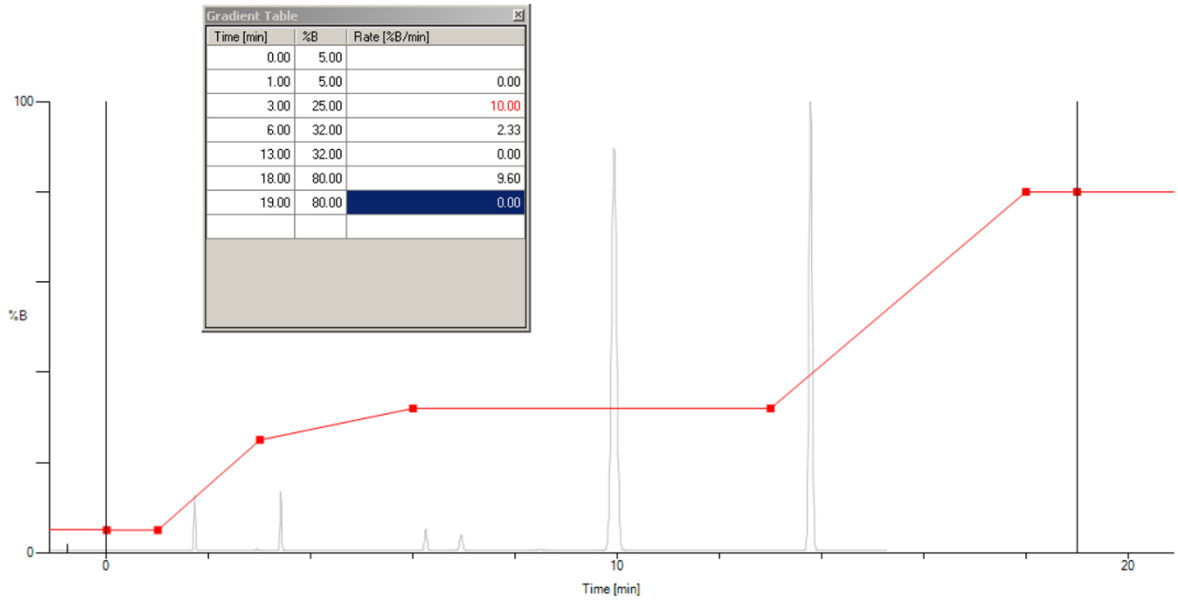
4.3. Određivanje optimalne metode za odjeljivanje onečišćenja anthelmintika programskih paketom DryLab

4.3.1. DryLab eksperimenti za febantel/pirantel/prazikvantel

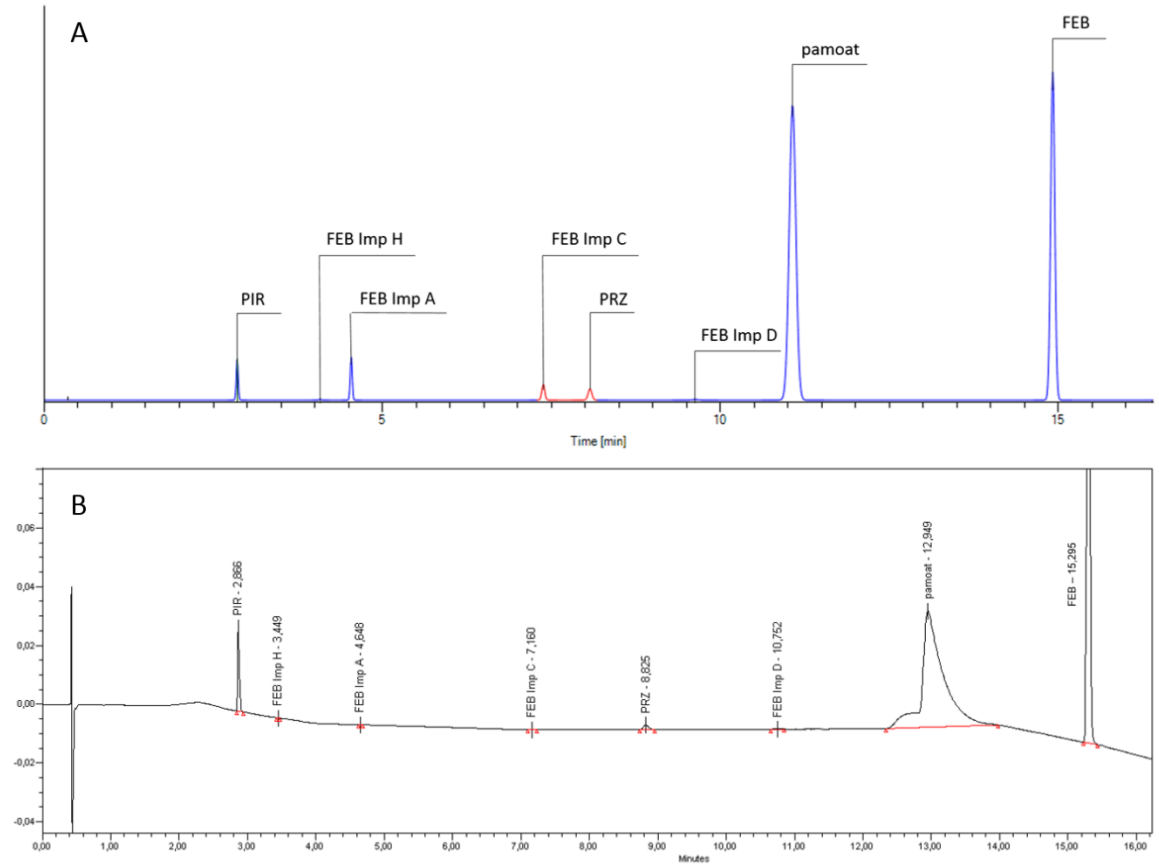
Preliminarnim ispitivanjima određena je brzina protoka 0,6 ml/min te temperatura kolone 70°C. Rezultati su dobiveni eluiranjem na koloni ACQUITY® BEH C18 (100 x 2,1 nm, 1,7 µm). Programskim paketom DryLab (1D eksperiment) utvrđen je utjecaj vremena eluiranja na razlučivanje (R_S) kromatografskih krivulja (Slika 13), a prema tim podacima dobivena je metoda za odjeljivanje onečišćenja (Slika 14). Slika 15 prikazuje usporedbu virtualnog kromatograma dobivenog u DryLab-u i stvarnog kromatograma dobivenog tekućinskim kromatografom. Njihovi kromatografski parametri prikazani su u Tablici 12.



Slika 13: *Prikaz ovisnosti razlučivanja (R_S) febantela/pirantela/prazikvantela i njihovih onečišćenja o vremenu eluiranja t(G) ukoliko je eluiranje linearno gradijentno od 2-70% B*



Slika 14: *Prikaz UPLC metode dobivene programskim paketom DryLab kojom je predviđeno najbolje odjeljivanje febantela/pirantela/prazikvantela i njihovih onečišćenja*



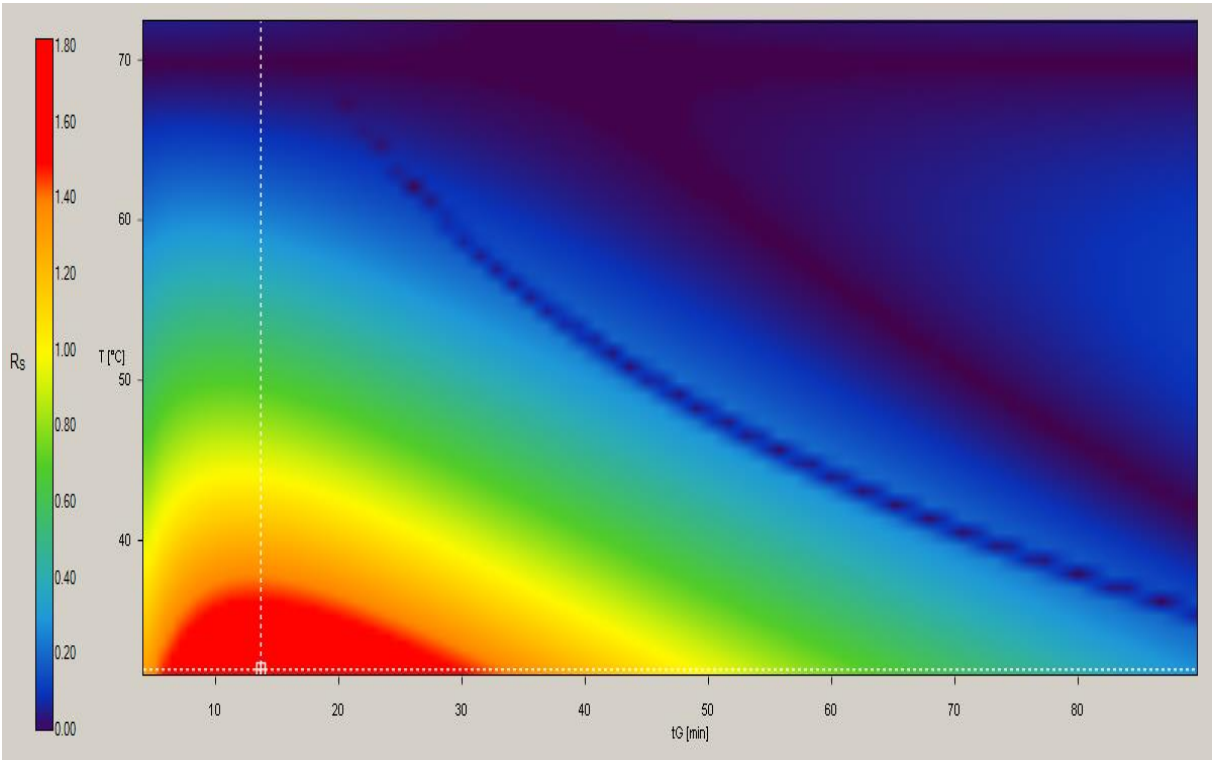
Slika 15: *Usporedba virtualnog kromatograma dobivenog korištenjem programskog paketa DryLab (A) i stvarnog kromatograma dobivenog tekućinskim kromatografom (B) za febantel/pirantel/prazikvantel*

Tablica 12: *Usporedba kromatografskih parametara (t_R- vrijeme zadržavanja, R_S- razlučivanje koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju) dobivenih virtualnim kromatogramom korištenjem programskog paketa DryLab (predviđene vrijednosti) i stvarnih vrijednosti parametara dobivenih tekućinskim kromatografom (UPLC) za febantel/pirantel/prazikvantel*

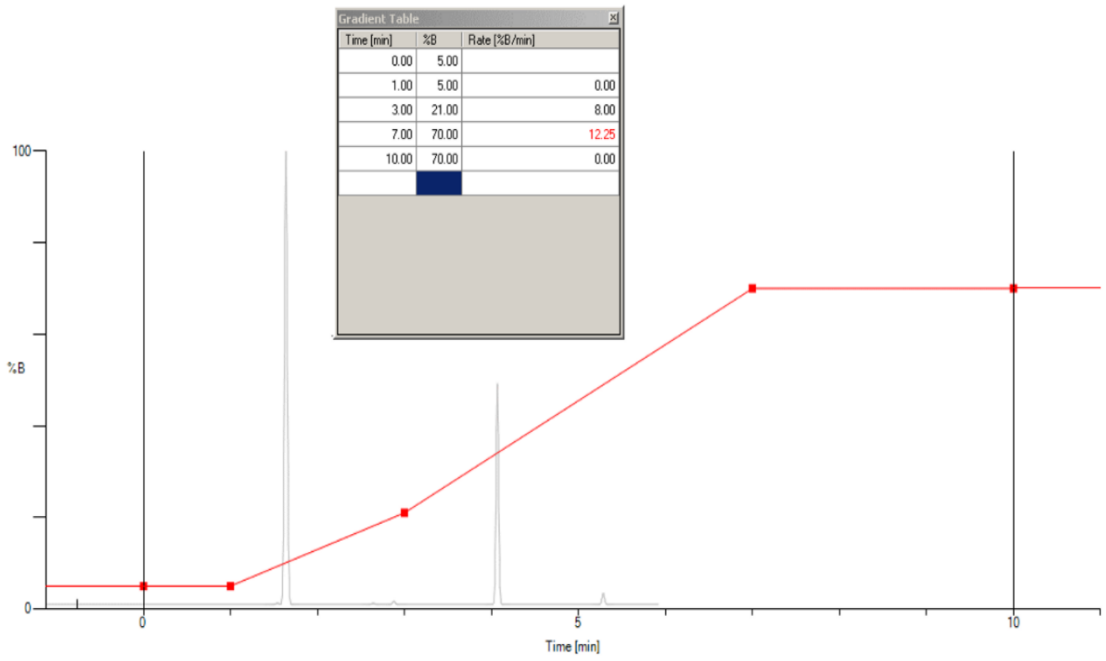
	DryLab (predviđene vrijednosti)		**UPLC (stvarne vrijednosti)**	
	t_R	**R_S**	**t_R**	**R_S**
PIR	2,85	-	2,866	-
FEB Imp H	4,08	23,37	3,448	15,02
FEB Imp A	4,54	8,64	4,648	28,69
FEB Imp C	7,38	39,51	7,160	34,02
PRZ	8,07	7,06	8,825	14,82
FEB Imp D	9,63	11,92	10,752	12,65
pamoat	11,07	8,37	12,949	7,05
FEB	14,92	24,76	15,295	8,87

4.3.2. DryLab eksperimenti za albendazol/levamisol

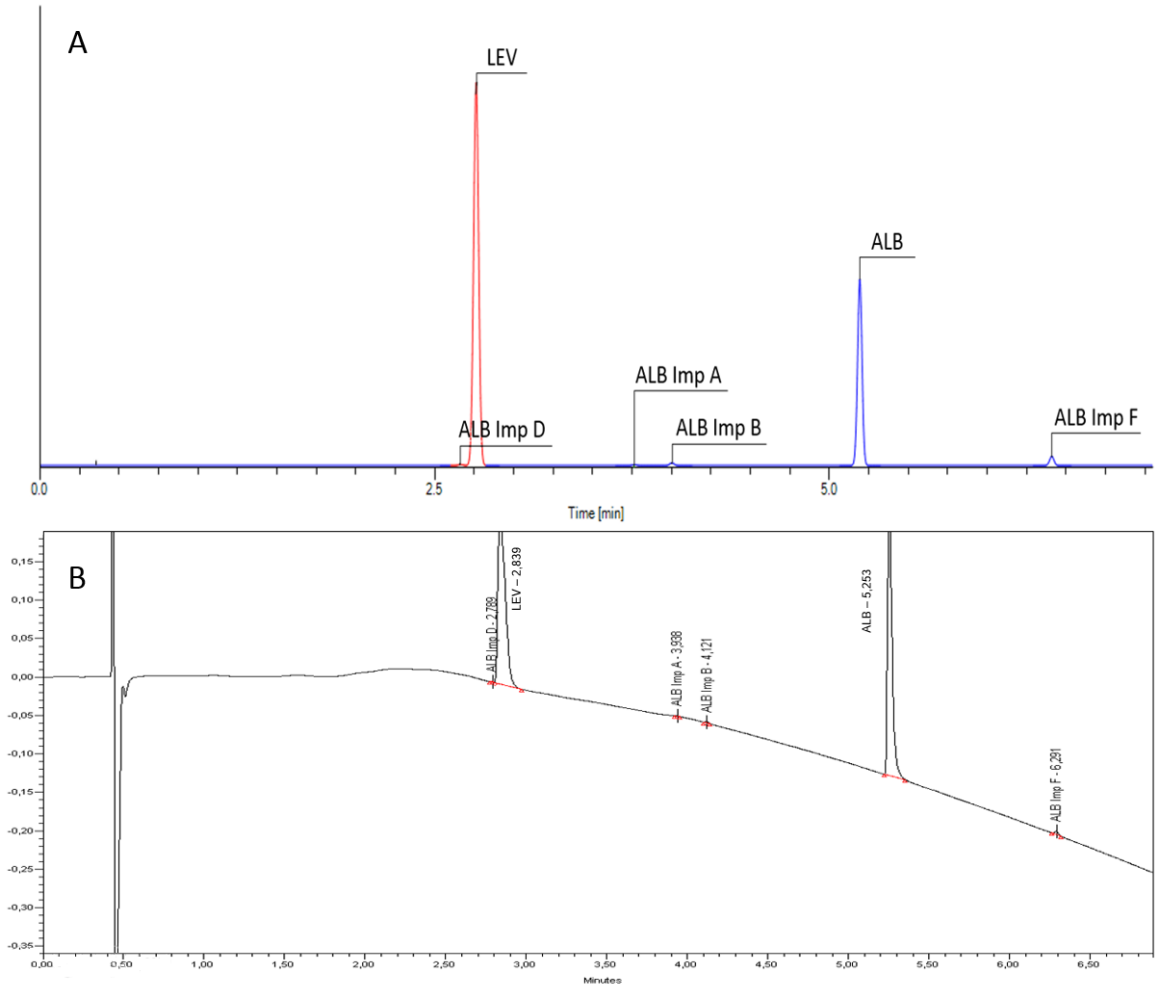
Preliminarnim ispitivanjima određena je brzina protoka 0,6 ml/min. Rezultati su dobiveni eluiranjem na koloni ACQUITY® BEH C18 (100 x 2,1 nm, 1,7 µm). Programskim paketom DryLab (2D eksperiment) utvrđen je utjecaj vremena eluiranja i temperature na razlučivanje (R_S) kromatografskih krivulja (Slika 16), a prema tim podacima dobivena je metoda za odjeljivanje onečišćenja (Slika 17). Slika 18 prikazuje usporedbu virtualnog kromatograma dobivenog u DryLabu i stvarnog kromatograma dobivenog tekućinskim kromatografom. Njihovi kromatografski parametri prikazani su u Tablici 13.



Slika 16: *Prikaz ovisnosti razlučivanja (R_S) albendazola/levamisola i njihovih onečišćenja o temperaturi (°C) i trajanju eluiranja (t(G)) ukoliko je eluiranje linearno gradijentno od 2-70% B*



Slika 17: *Prikaz UPLC metode dobivene programskim paketom DryLab kojom je predviđeno najbolje odjeljivanje albendazola/levamisola i njihovih onečišćenja*



Slika 18: *Usporedba virtualnog kromatograma dobivenog korištenjem programskog paketa DryLab (A) i stvarnog kromatograma dobivenog tekućinskim kromatografom (B) za albendazol/levamisol*

Tablica 13: *Usporedba kromatografskih parametara (t_R- vrijeme zadržavanja, R_S- razlučivanje koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju) dobivenih virtualnim kromatogramom korištenjem programskog paketa DryLab (predviđene vrijednosti) i stvarnih vrijednosti parametara dobivenih tekućinskim kromatografom (UPLC) za albendazol/levamisol*

	DryLab (predviđene vrijednosti)		**UPLC (stvarne vrijednosti)**	
	t_R	**R_S**	**t_R**	**R_S**
ALB Imp D	2,67	-	2,789	-
LEV	2,76	1,74	2,839	0,82
ALB Imp A	3,77	19,10	3,938	20,29
ALB Imp B	4,00	4,77	4,121	6,30
ALB	5,19	23,92	5,253	28,04
ALB Imp F	6,41	25,36	6,291	24,60

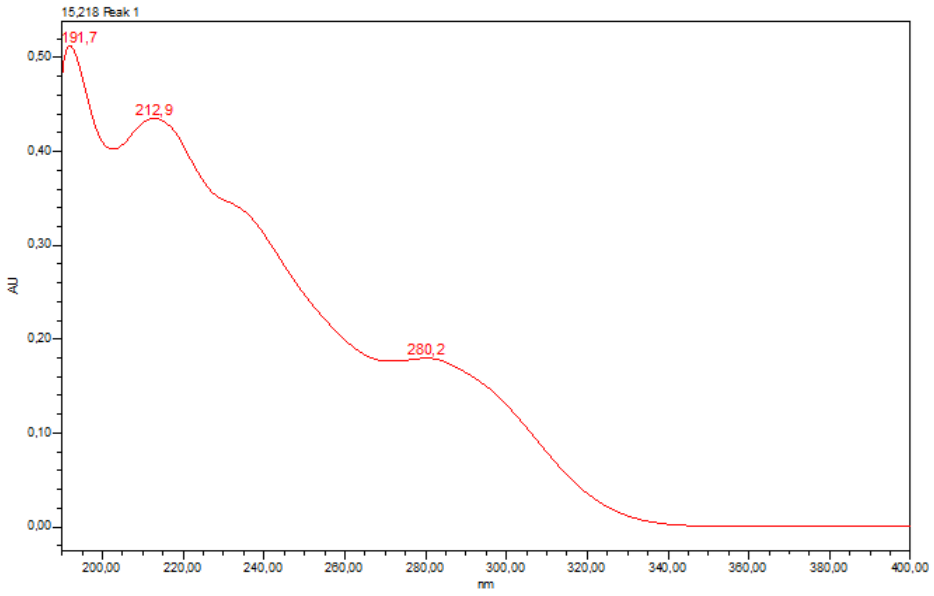
4.4. Forsirana razgradnja

Sva prikazana onečišćenja i razgradni produkti u ovom i sljedećim poglavljima imenovana su po kratici za pojedini anthelmintik te oznakom Imp za onečišćenje (engl. *impurity*) i abecednim slovom. Imenovanje nije povezano sa imenovanjem specificiranih onečišćenja na Slikama 1-5 te bi za strukturnu karakterizaciju onečišćenja i razgradnih produkata bilo potrebno provesti dodatnu analizu poput spregnute tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS). Termin onečišćenje korišten je za onečišćenje prisutno u standardu i/ili API-u, dok je termin razgradni produkt korišten za onečišćenje nastalo forsiranom razgradnjom.

U svim rezultatima procesirane su isključivo kromatografske krivulje sa omjerom signala i šuma većim od 10.

4.4.1. Eksperimenti forsirane razgradnje za febantel

Svi kromatogrami FEB procesirani su pri 240 nm, a UV spektar FEB snimljen PDA detektorom prikazan je na Slici 19. Kromatografski parametri FEB, njegovih onečišćenja u standardu i API-u te njegovih razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi, oksidansu, lužini i kiselini prikazani su u Tablicama 14, 15 i 16. Na Slici 20 prikazan je kromatogram dobiven nakon izlaganja otopine FEB kiselini.



***Slika 19**: UV spektar febantela snimljen PDA detektorom*

Tablica 14: *Prikaz febantela i njegovih onečišćenja u standardu i API-u te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 240 nm)*

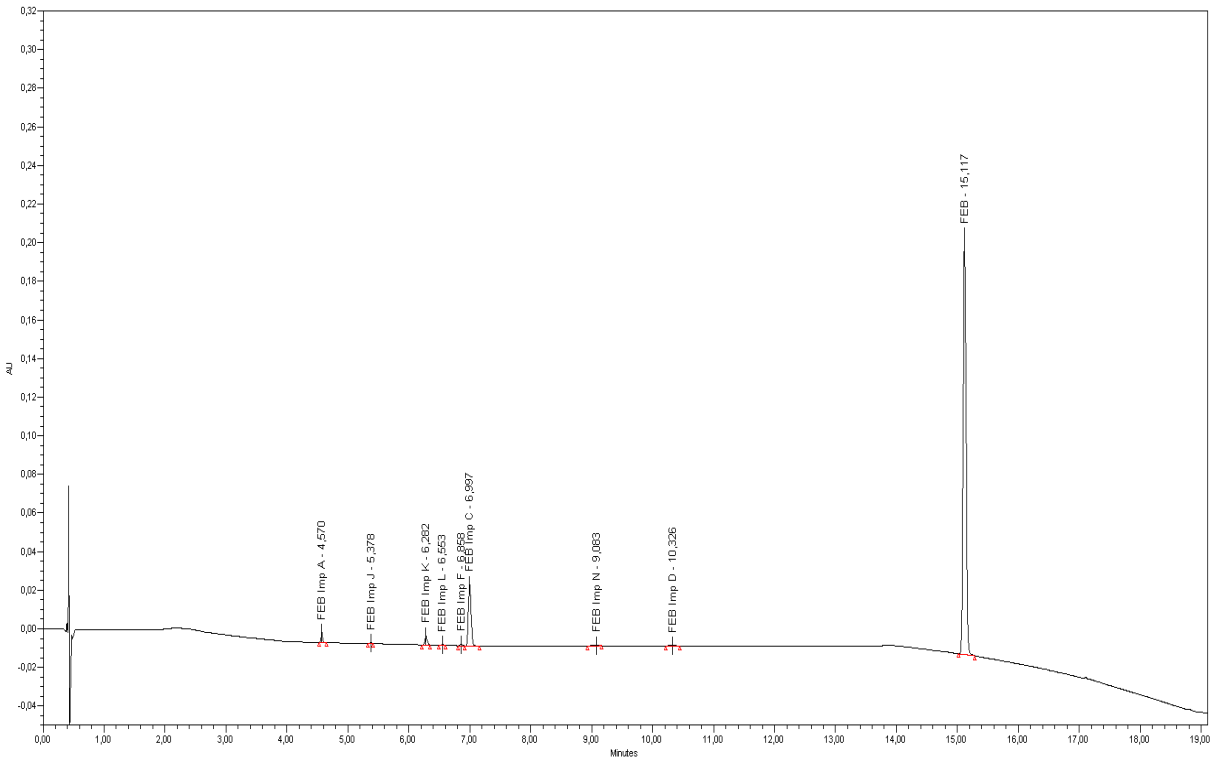
			standard			API		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
FEB Imp H	3,368	0,22	-	-	-	0,02	-	14
FEB Imp B	4,451	0,29	0,04	-	18	-	-	-
FEB Imp A	4,632	0,30	1,46	3,8	596	1,60	28,7	891
FEB Imp C	7,103	0,47	0,11	33,8	22	0,10	35,7	31
FEB Imp D	10,266	0,67	-	-	-	0,25	25,8	37
FEB	15,222	1,00	98,39	90,8	24210	98,03	35,2	32778

Tablica 15: *Prikaz febantela, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi (80°C, 24 h) i oksidansu (5% H_2O_2, 7 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 240 nm)*

			80°C, 24 h			5% H_2O_2, 7 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
FEB Imp O	3,282	0,22	-	-	-	0,03	-	30
FEB Imp H	3,375	0,22	0,02	-	15	0,02	2,9	17
FEB Imp E	4,090	0,27	0,04	19,1	28	-	-	-
FEB Imp P	4,240	0,28	0,05	3,7	35	-	-	-
FEB Imp A	4,538	0,30	8,58	7,5	4204	0,11	28,1	73
FEB Imp I	4,995	0,33	-	-	-	0,03	9,3	18
FEB Imp K	6,242	0,41	-	-	-	11,92	21,4	5923
FEB Imp F	6,942	0,46	0,05	34,4	19	-	-	-
FEB Imp C	6,962	0,46	0,08	1,8	28	0,07	9,1	28
FEB Imp M	7,453	0,49	-	-	-	0,16	5,3	57
FEB Imp D	10,213	0,68	0,17	27,1	27	0,20	21,0	40
FEB	15,068	1,00	91,01	36,5	30203	87,47	37,1	32029

Tablica 16: *Prikaz febantela, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem lužini (0,1M NaOH, 2 min) i kiselini (1M HCl, 1 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 240 nm)*

			0,1M NaOH, 2 min			1M HCl, 1 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
FEB Imp H	3,368	0,22	0,01	-	11	-	-	-
FEB Imp E	4,090	0,27	0,05	18,6	42	-	-	-
FEB Imp A	4,570	0,30	18,50	9,9	8279	1,11	-	460
FEB Imp J	5,378	0,36	-	-	-	0,16	14,7	55
FEB Imp K	6,282	0,42	0,02	28,6	9	1,41	14,0	419
FEB Imp L	6,553	0,43	-	-	-	0,17	3,8	48
FEB Imp F	6,858	0,45	0,06	8,6	20	0,31	4,0	80
FEB Imp C	6,997	0,46	0,07	1,8	25	11,68	1,7	2799
FEB Imp N	9,083	0,60	-	-	-	0,35	14,4	38
FEB Imp D	10,326	0,68	0,16	26,2	28	0,21	6,7	24
FEB	15,117	1,00	81,12	36,8	26347	84,61	37,2	19073



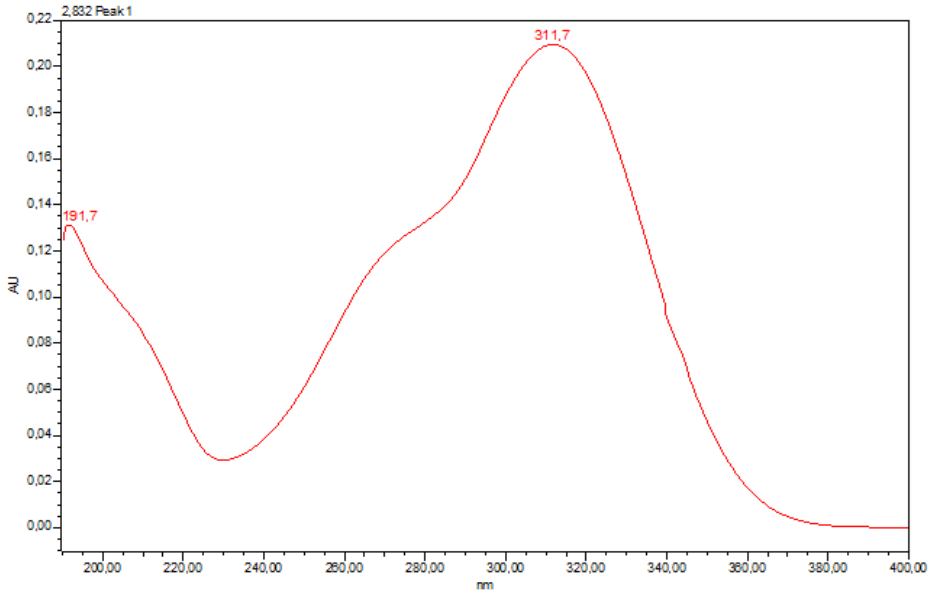
Slika 20: *Kromatografski prikaz febantela, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata nakon izlaganja kiselini (1M HCl, 1 h) (procesirano pri 240 nm)*

4.4.2. Eksperimenti forsirane razgradnje za pirantel

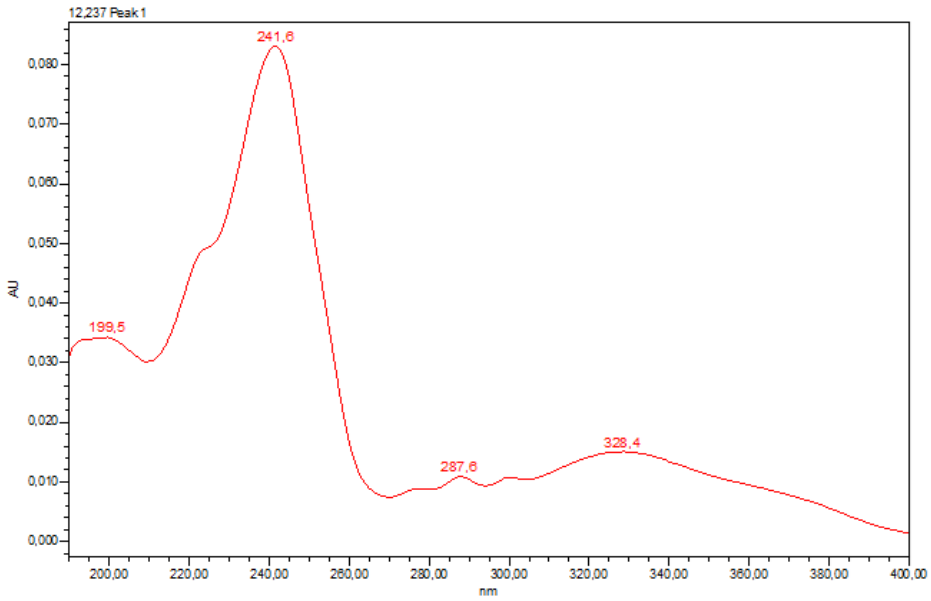
Svi kromatogrami PIR procesirani su pri 310 nm. S obzirom da pirantel dolazi u obliku pirantel pamoata svi kromatogrami su također procesirani pri 240 nm kako bismo vidjeli onečišćenja pamoata. UV spektri PIR i pamoata snimljeni PDA detektorom prikazani su na Slikama 21 i 22.

Kromatografski parametri PIR u standardu i API-u te kromatografski parametri njegovih razgradnih produkata nastalih izlaganjem sobnoj svjetlosti, temperaturi, oksidansu, lužini i kiselini prikazani su u Tablicama 17, 18 i 19. Na Slici 23 prikazan je kromatogram dobiven nakon izlaganja otopine PIR kiselini.

U standardu (Slika 24) i API-u pirantel pamoata prisutna su jednaka onečišćenja pamoata, a njihovi kromatografski parametri prikazani su u Tablici 20. Razgradni produkti pamoata nastali forsiranom razgradnjom nisu prikazani s obzirom da se prati raspad aktivne tvari odnosno pirantela.



Slika 21: *UV spektar pirantela snimljen PDA detektorom*



Slika 22: *UV spektar pamoata snimljen PDA detektorom*

Tablica 17: *Prikaz pirantela u standardu i API-u pirantel pamoata te pirantela i njegovog onečišćenja u otopini pirantel pamoata nastalog pod utjecajem sobne svjetlosti te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 310 nm)*

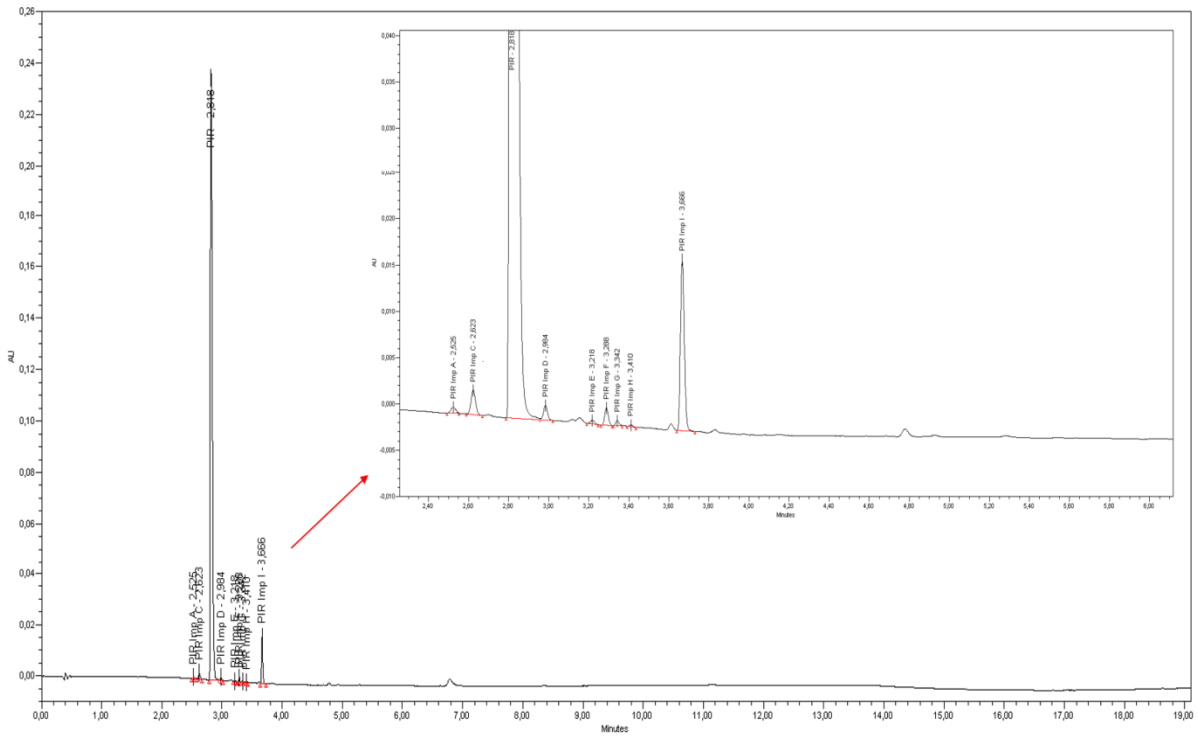
			standard		API		sobna svjetlost		
	t_R	r_R	A (%)	s/n	A (%)	s/n	A (%)	R_S	s/n
PIR Imp A	2,525	0,87	-	-	-	-	4,46	-	703
PIR	2,894	1,00	100	18998	100	13799	95,54	6,7	15605

Tablica 18: *Prikaz pirantela i njegovog razgradnog produkta u otopini pirantel pamoata nastalog izlaganjem temperaturi (80°C, 24 h) i oksidansu (10% H_2O_2, 80°C, 24 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 310 nm)*

			80°C, 24 h			10% H_2O_2, 80°C, 24 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
PIR Imp A	2,525	0,87	0,03	-	10	0,03	-	10
PIR	2,894	1,00	99,97	6,2	18046	99,97	6,1	17862

Tablica 19: *Prikaz pirantela i njegovih razgradnih produkata u otopini pirantel pamoata nastalih izlaganjem lužini (1M NaOH, 1 h) i kiselini (5M HCl, 72 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine(%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 310 nm)*

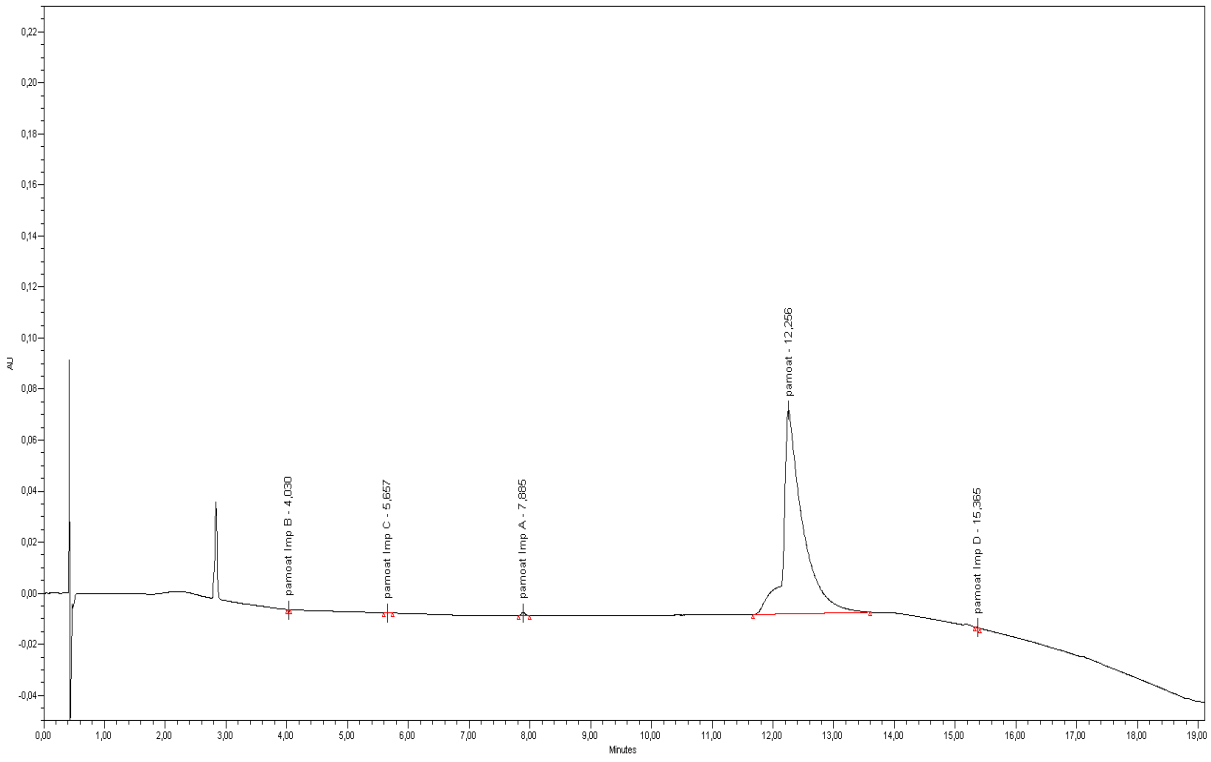
			1M NaOH, 1 h			5M HCl, 72 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
PIR Imp A	2,525	0,87	-	-	-	0,2	-	31
PIR Imp C	2,693	0,93	14,16	-	2907	0,79	2,2	134
PIR	2,894	1,00	85,28	4,3	14161	93,27	3,9	12105
PIR Imp D	3,053	1,05	0,56	3,5	125	0,42	3,6	80
PIR Imp E	3,218	1,11	-	-	-	0,11	6,2	19
PIR Imp F	3,288	1,14	-	-	-	0,44	1,9	95
PIR Imp G	3,342	1,15	-	-	-	0,11	1,6	26
PIR Imp H	3,41	1,18	-	-	-	0,05	2,1	10
PIR Imp I	3,666	1,27	-	-	-	4,62	7,5	943



Slika 23: *Kromatografski prikaz pirantela i njegovih razgradnih produkata u otopini pirantel pamoata nakon izlaganja kiselini (5M HCl, 72 h) (procesirano pri 310 nm)*

Tablica 20: *Prikaz pamoata i njegovih onečišćenja u standardu i API-u pirantel pamoata te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 240 nm)*

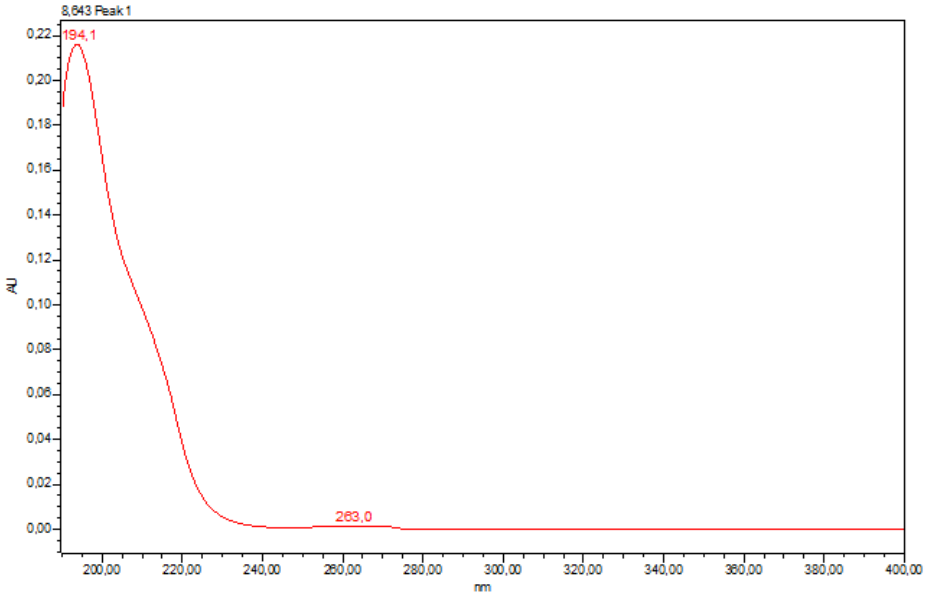
			standard			API		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
pamoat Imp B	4,028	0,33	0,01	-	11	0,01	1,4	13
pamoat Imp C	5,658	0,46	0,03	26,7	21	0,01	28	11
pamoat Imp A	7,88	0,64	0,27	22,9	164	0,31	23,9	190
pamoat	12,235	1,00	99,66	15,7	11092	99,61	15,5	11624
pamoat Imp D	15,36	1,26	0,03	11	29	0,05	11,7	43



Slika 24: *Kromatografski prikaz standarda pamoata i njegovih onečišćenja u otopini pirantel pamoata (procesirano pri 240 nm)*

4.4.3. Eksperimenti forsirane razgradnje za prazikvantel

Svi kromatogrami PRZ procesirani su pri 195 nm, a UV spektar PRZ snimljen PDA detektorom prikazan je na Slici 25. Kromatografski parametri PRZ, njegovog onečišćenja u standardu i API-u te njegovih razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi, oksidansu, lužini i kiselini prikazani su u Tablicama 21, 22 i 23. Na Slici 26 prikazan je kromatogram dobiven nakon izlaganja otopine PRZ kiselini.



Slika 25: *UV spektar prazikvantela snimljen PDA detektorom*

Tablica 21: *Prikaz prazikvantela i njegovog onečišćenja u standardu i API-u te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 195 nm)*

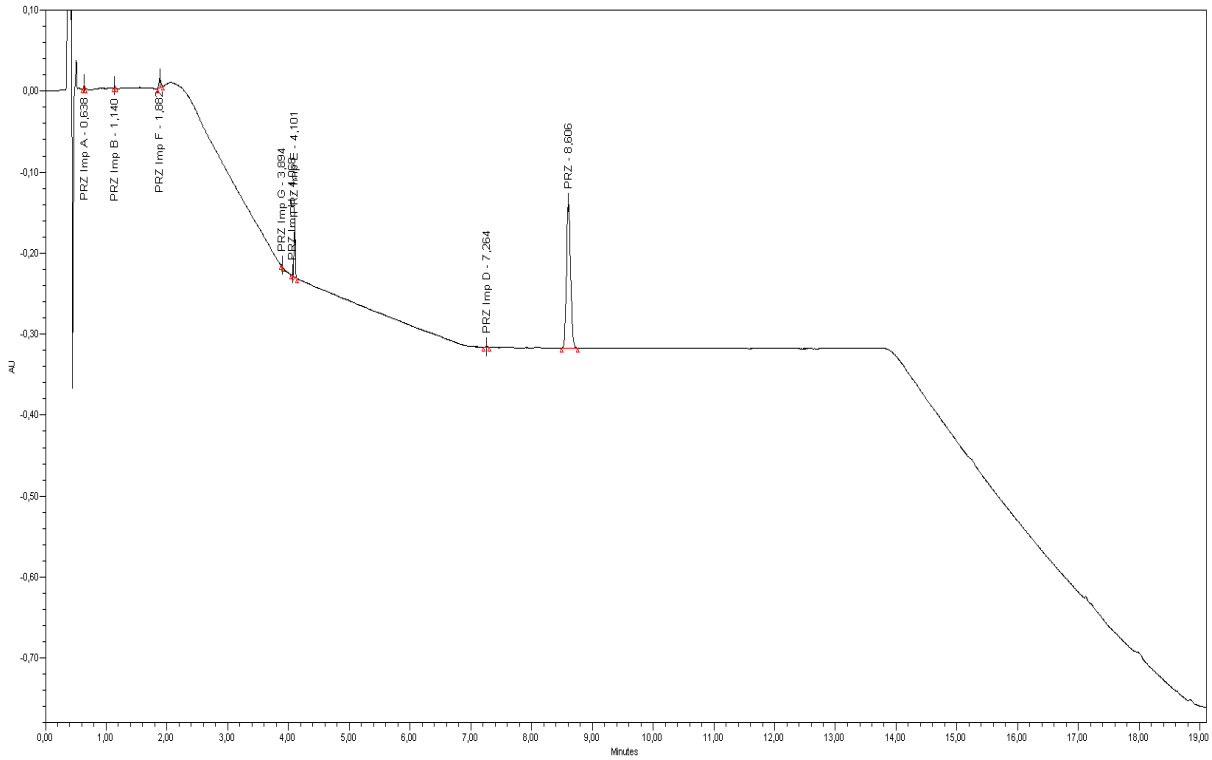
			standard			API		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
PRZ Imp A	0,639	0,07	0,71	-	21	0,68	-	38
PRZ	8,626	1,00	99,29	97,3	1883	99,32	96,6	1816

Tablica 22: *Prikaz prazikvantela, njegovog onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi (80°C, 24 h) i oksidansu (10% H_2O_2, 80°C, 24 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 195 nm)*

			80°C, 24 h			10% H_2O_2, 80°C, 24 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
PRZ Imp A	0,639	0,07	0,13	-	11	0,86	-	39
PRZ Imp B	1,143	0,13	-	-	-	1,33	13	49
PRZ Imp C	6,727	0,78	-	-	-	0,32	94,2	10
PRZ Imp D	7,173	0,83	-	-	-	0,96	5,5	18
PRZ	8,626	1,00	99,87	102,1	2245	96,52	13,8	1813

Tablica 23: *Prikaz prazikvantela, njegovog onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem lužini (1M NaOH, 5 h) i kiselini (5M HCl, 48 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 195 nm)*

			1M NaOH, 5 h			5M HCl, 48 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
PRZ Imp A	0,638	0,07	-	-	-	0,68	-	29
PRZ Imp B	1,14	0,13	2,13	-	73	0,37	14,2	38
PRZ Imp F	1,882	0,22		-	-	2,62	15,4	168
PRZ Imp G	3,894	0,45	-	-	-	0,19	42,8	22
PRZ Imp H	4,068	0,47	-	-	-	0,41	5,7	50
PRZ Imp E	4,101	0,48	17,18	75,8	672	8,9	1,1	904
PRZ Imp D	7,264	0,84	-	-		0,36	54,8	17
PRZ	8,606	1,00	80,69	55,8	1946	86,45	13,2	2583



Slika 26: *Kromatografski prikaz prazikvantela, njegovog onečišćenja i razgradnih produkata nakon izlaganja kiselini (5M HCl, 48 h) (procesirano pri 195 nm)*

4.4.4. Eksperimenti forsirane razgradnje za febantel/pirantel/prazikvantel

Forsirana razgradnja provedena je na otopini FEB/PIR/PRZ po najblažem uvjetu za utjecaj temperature (80°C, 24 h), oksidansa (5% H_2O_2, 7 h), lužine (0,1M NaOH, 2 min) i kiseline (1M HCl, 1 h).

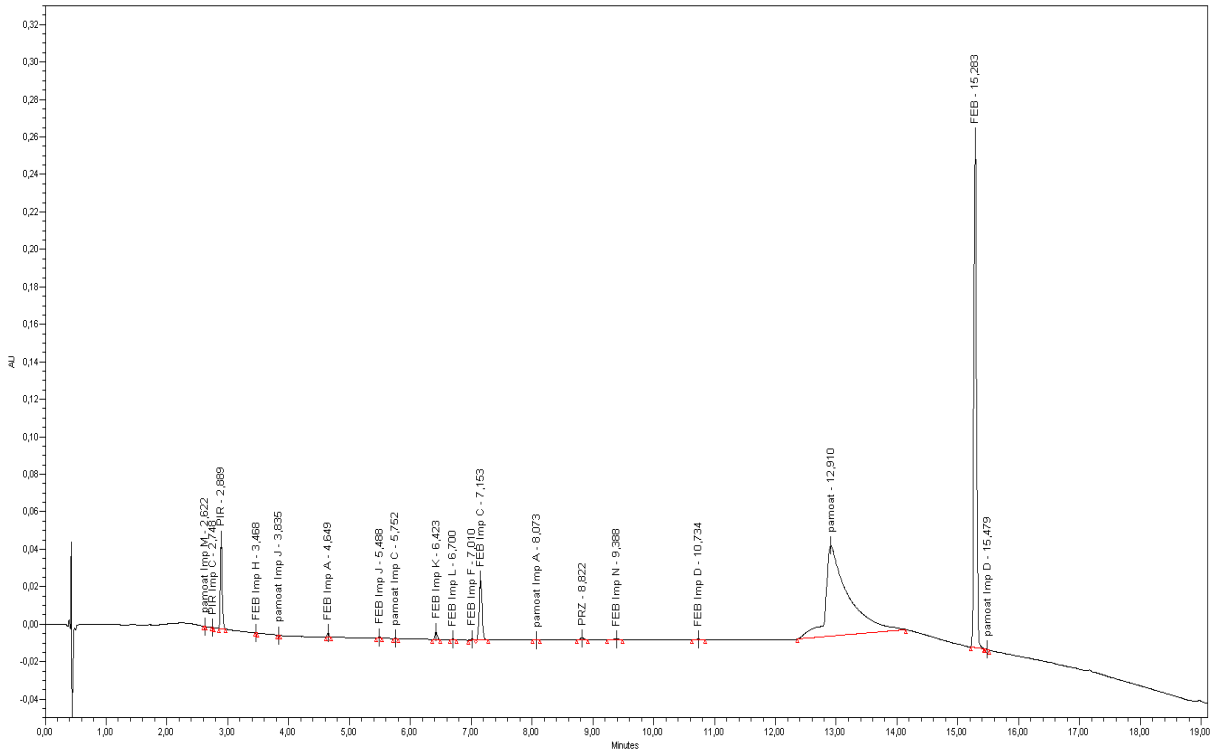
Kromatografske krivulje FEB, pamoata, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata procesirane su pri 240 nm, PIR i njegovog razgradnog produkta pri 310 nm, a PRZ pri 195 nm. Kromatografski parametri sastavnica otopine FEB/PIR/PRZ za pojedini uvjet forsirane razgradnje prikazani su u Tablicama 24 i 25, a na Slici 27 prikazan je kromatogram dobiven nakon izlaganja otopine FEB/PIR/PRZ kiselini. Postoci nerazgrađenog FEB u otopini FEB/PIR/PRZ i usporedba sa samom otopinom FEB nakon forsirane razgradnje prikazani su u Tablici 26.

Tablica 24: *Prikaz febantela, pirantela, prazikvantela, pamoata, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi (80°C, 24 h) i oksidansu (5% H_2O_2, 7 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 240 nm, * pri 310 nm, ** pri 195 nm)*

		80°C, 24 h		5% H_2O_2, 7 h	
	t_R	R_S	s/n	R_S	s/n
pamoat Imp M	2,622	-	19	-	-
PIR*	2,914	3,9	19980	-	15978
FEB Imp O	3,390	-	-	11,3	112
FEB Imp H	3,494	13,3	11	3,5	19
pamoat Imp J	3,861	-	-	11,8	52
pamoat Imp E	4,026	-	-	4,3	47
FEB Imp A	4,695	29,6	49	14,0	244
FEB Imp I	5,187	-	-	9,9	17
pamoat Imp C	5,812	17,0	11	9,8	11
FEB Imp K	6,496	-	-	9,2	6837
FEB Imp C	7,241	16,4	51	9,2	116
FEB Imp M	7,394	-	-	1,4	35
pamoat Imp A	8,207	9,0	35	6,9	35
PRZ**	8,964	6,0	1513	6,0	1525
FEB Imp D	10,974	12,9	24	12,9	33
pamoat	13,131	6,3	5783	6,4	9064
FEB	15,359	8,1	27191	7,8	40047
pamoat Imp D	15,548	2,7	33	2,7	34

Tablica 25: *Prikaz febantela, pirantela, prazikvantela, pamoata, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem lužini (0,1M NaOH, 2 min) i kiselini (1M HCl, 1 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 240 nm, * pri 310 nm, ** pri 195 nm)*

		0,1M NaOH, 2 min		1M HCl, 1 h	
	t_R	R_S	s/n	R_S	s/n
pamoat Imp M	2,622	-	-	-	21
PIR Imp C*	2,748	-	76	3,9	23
PIR*	2,889	4,0	17544	3,2	19971
pamoat Imp O	3,119	5,4	88	-	-
FEB Imp H	3,468	10,7	13	13,5	11
pamoat Imp J	3,835	-	-	11,4	24
pamoat Imp E	3,963	14,0	10	-	-
FEB Imp E	4,098	2,7	23	-	-
FEB Imp A	4,649	11,0	5352	19,7	272
FEB Imp J	5,488	-	-	15,0	77
pamoat Imp C	5,752	16,6	12	4,0	9
FEB Imp K	6,423	9,4	41	9,6	463
FEB Imp L	6,700	-	-	3,9	54
FEB Imp F	7,010	8,1	10	3,9	89
FEB Imp C	7,153	1,7	40	1,7	3457
pamoat Imp A	8,073	9,5	11	10,0	11
PRZ*	8,822	6,4	1509	6,7	1594
FEB Imp N	9,388	-	-	3,3	48
FEB Imp D	10,734	12,6	27	6,6	29
pamoat	12,910	6,3	8306	6,4	5188
FEB	15,283	9,3	29070	8,2	29138
pamoat Imp D	15,479	2,6	35	2,6	17



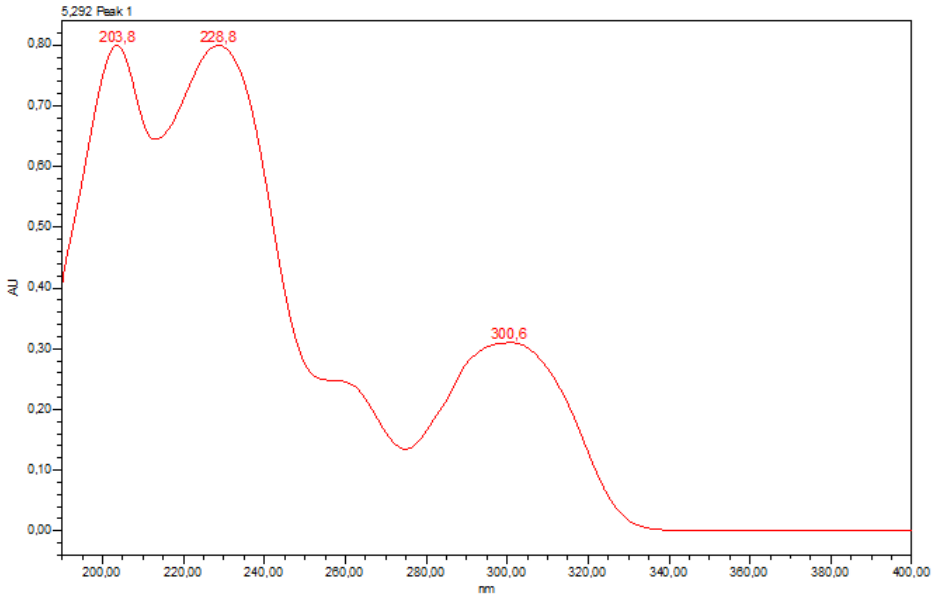
Slika 27: *Kromatografski prikaz otopine febantela/pirantela/prazikvantela, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata nakon izlaganja kiselini (1M HCl, 1 h) (procesirano pri 240 nm)*

Tablica 26: *Usporedba postotka nerazgrađenog febantela nakon forsirane razgradnje u otopini febantela te u otopini febantela/pirantela/prazikvantela*

	FEB	**FEB/PIR/PRZ**
Temperatura (80°C, 24 h)	91,01%	99,44%
Oksidans (5% H_2O_2, 7 h)	87,47%	85,63%
Lužina (0,1M NaOH, 2 min)	81,12%	87,68%
Kiselina (1M HCl, 1 h)	84,61%	86,03%

4.4.5. Eksperimenti forsirane razgradnje za albendazol

Svi kromatogrami ALB dobiveni su metodom A te su procesirani pri 223 nm, a UV spektar ALB snimljen PDA detektorom prikazan je na Slici 28. Kromatografski parametri ALB, njegovih onečišćenja u standardu i API-u te njegovih razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi, oksidansu, lužini i kiselini prikazani su u Tablicama 27, 28 i 29. Na Slici 29 prikazan je kromatogram dobiven nakon izlaganja otopine ALB lužini.



Slika 28: *UV spektar albendazola snimljen PDA detektorom*

Tablica 27: *Prikaz albendazola i njegovih onečišćenja u standardu i API-u te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 223 nm)*

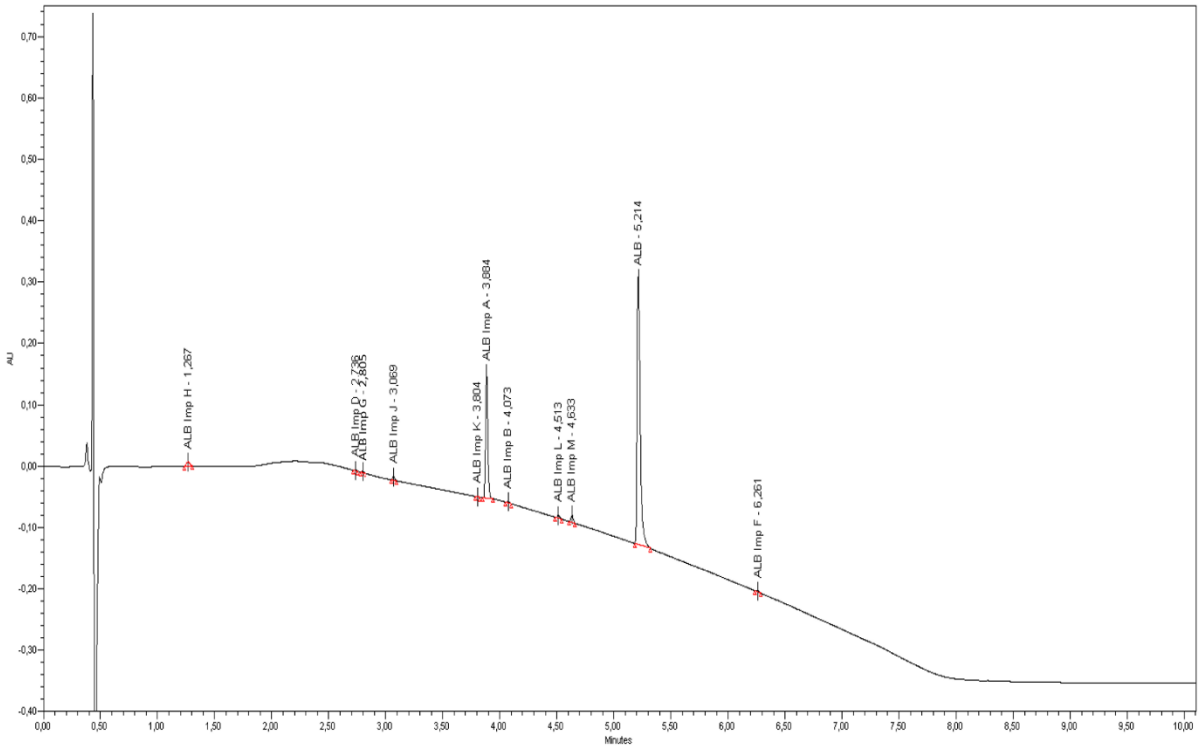
			standard			API		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
ALB Imp D	2,918	0,56	-	-	-	0,14	-	30
ALB Imp A	3,943	0,75	0,03	-	22	0,07	29,1	17
ALB Imp B	4,125	0,79	0,19	4,8	90	0,28	3,9	68
ALB Imp C	5,098	0,97	0,14	27	78	-	-	-
ALB	5,25	1,00	99,64	4,1	41863	98,93	26,1	19301
ALB Imp F	6,249	1,19	-	-	-	0,58	24,4	128

Tablica 28: *Prikaz albendazola, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi (80°C, 24 h) i oksidansu (10% H_2O_2, 80°C, 30 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 223 nm)*

			80°C, 24 h			10% H_2O_2, 30 min		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
ALB Imp D	2,681	0,52	0,15	-	49	0,12	-	17
ALB Imp G	2,783	0,54	-	-	-	0,09	2,5	16
ALB Imp A	3,859	0,74	0,14	29,6	60	26,03	30,4	4306
ALB Imp B	4,051	0,78	0,33	5,2	121	0,21	5,3	33
ALB	5,201	1,00	98,87	27,3	29904	73,02	28,5	9136
ALB Imp F	6,27	1,21	0,52	26,9	204	0,52	26,6	82

Tablica 29: *Prikaz albendazola, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem lužini (1M NaOH, 24 h) i kiselini (5M HCl, 5 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 223 nm)*

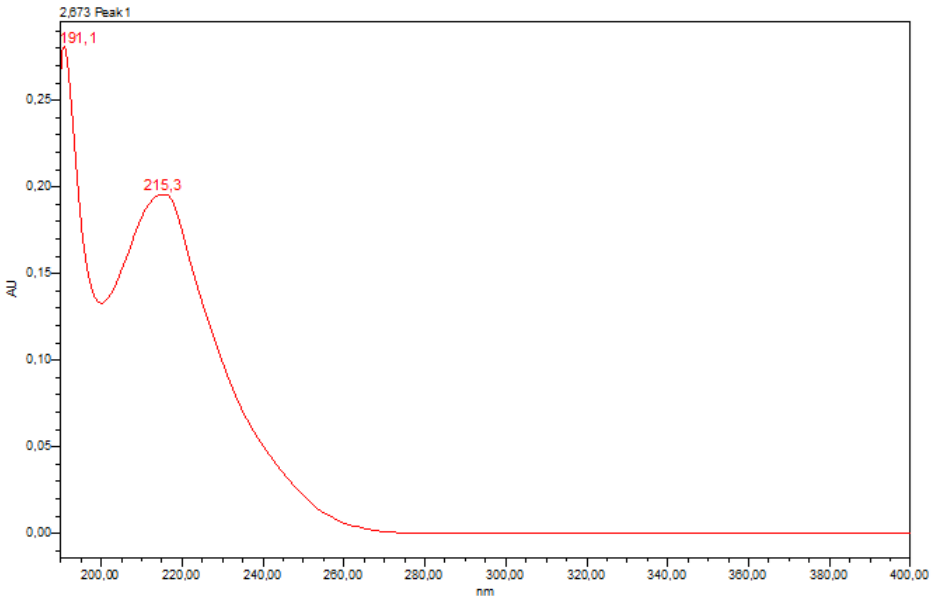
			1M NaOH, 24 h			5M HCl, 5 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
ALB Imp H	1,267	0,24	1,28	-	228	-	-	-
ALB Imp D	2,702	0,52	0,19	31,1	56	0,13	-	100
ALB Imp G	2,805	0,54	0,31	1,9	91	0,06	2,6	49
ALB Imp J	3,069	0,59	0,69	10,6	211	-	-	-
ALB Imp A	3,826	0,74	0,07	22,8	22	15,42	26,3	11116
ALB Imp K	3,866	0,74	24	2,4	6783	-	-	-
ALB Imp B	4,052	0,78	0,25	5,3	70	0,26	5,1	187
ALB Imp L	4,502	0,87	0,6	11,7	163	0,05	11,6	35
ALB Imp M	4,614	0,89	1,45	3,2	409	0,12	2,9	92
ALB	5,197	1,00	70,86	14	14489	83,49	14,8	50385
ALB Imp F	6,249	1,20	0,21	27,1	62	0,46	26,4	319



Slika 29: *Kromatografski prikaz albendazola, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata nakon izlaganja lužini (1M NaOH, 24 h) (procesirano pri 223 nm)*

4.4.6. Eksperimenti forsirane razgradnje za levamisol

Svi kromatogrami LEV dobiveni su metodom A te su procesirani pri 215 nm, a UV spektar LEV snimljen PDA detektorom prikazan je na Slici 30. Kromatografski parametri LEV, njegovog onečišćenja u standardu i API-u te njegovih razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi, oksidansu, lužini i kiselini prikazani su u Tablicama 30, 31 i 32. Na Slici 31 prikazan je kromatogram dobiven nakon izlaganja otopine LEV kiselini.



Slika 30: *UV spektar levamisola snimljen PDA detektorom*

Tablica 30: *Prikaz levamisola i njegovog onečišćenja u standardu i API-u te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 215 nm)*

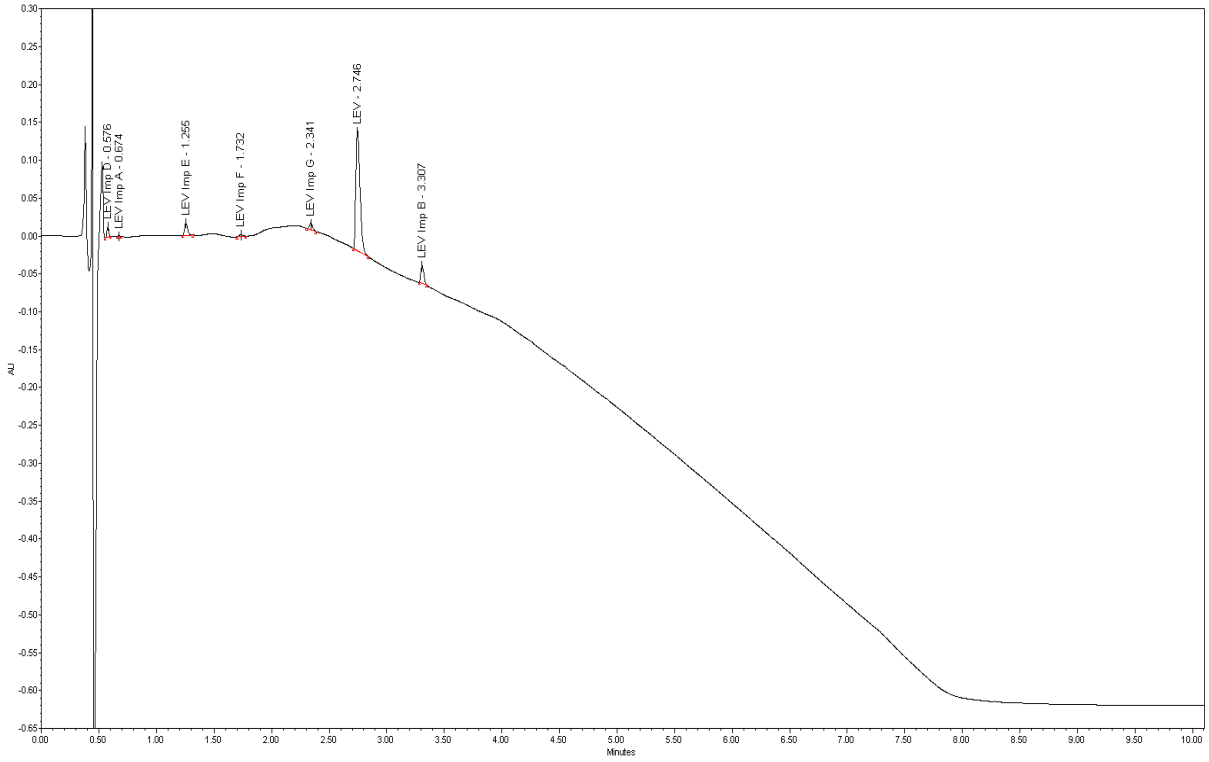
			standard			API		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
LEV Imp A	0,677	0,24	0,35	-	49	0,38	-	49
LEV	2,771	1,00	99,65	33,2	6997	99,62	32,5	5244

Tablica 31: *Prikaz levamisola, njegovog onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi (80°C, 24 h) i oksidansu (10% H_2O_2, 80°C, 24 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 215 nm)*

			80°C, 24 h			10% H_2O_2, 80°C, 24 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
LEV Imp A	0,677	0,24	0,08	-	14	0,12	-	13
LEV	2,771	1,00	99,92	46,2	9913	98,51	36,4	5215
LEV Imp B	3,324	1,20	-	-	-	0,93	10	95
LEV Imp C	4,539	1,64	-	-	-	0,43	27	48

Tablica 32: *Prikaz levamisola, njegovog onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem lužini (5M NaOH, 48 h) i kiselini (5M HCl, 80°C, 24 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vrijemena zadržavanja (r_R), postotka površine (%A), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 215 nm)*

			5M NaOH, 48 h			5M HCl, 80°C, 24 h		
	t_R	r_R	A (%)	R_S	s/n	A (%)	R_S	s/n
LEV Imp D	0,576	0,21	5,49	-	1168	2,9	-	240
LEV Imp A	0,674	0,25	0,25	2,9	23	0,12	3,6	10
LEV Imp E	1,255	0,46	6,62	14,2	981	5,83	16	287
LEV Imp F	1,732	0,63	-	-	-	1,04	9,1	40
LEV Imp G	2,341	0,85	-	-	-	3,21	11,1	145
LEV	2,746	1,00	87,64	23,4	8031	78,58	6,8	5698
LEV Imp B	3,307	1,20	-	-	-	8,32	9,5	401



Slika 31: *Kromatografski prikaz levamisola, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata nakon izlaganja kiselini (5M HCl, 80°C 24 h) (procesirano pri 215 nm)*

4.4.7. Eksperimenti forsirane razgradnje za albendazol/levamisol

Forsirana razgradnja provedena je na otopini ALB/LEV po najblažem uvjetu za utjecaj temperature (80°C, 24 h), oksidansa (10% H_2O_2, 30 min), lužine (1M NaOH, 24 h) i kiseline (5M HCl, 5 h).

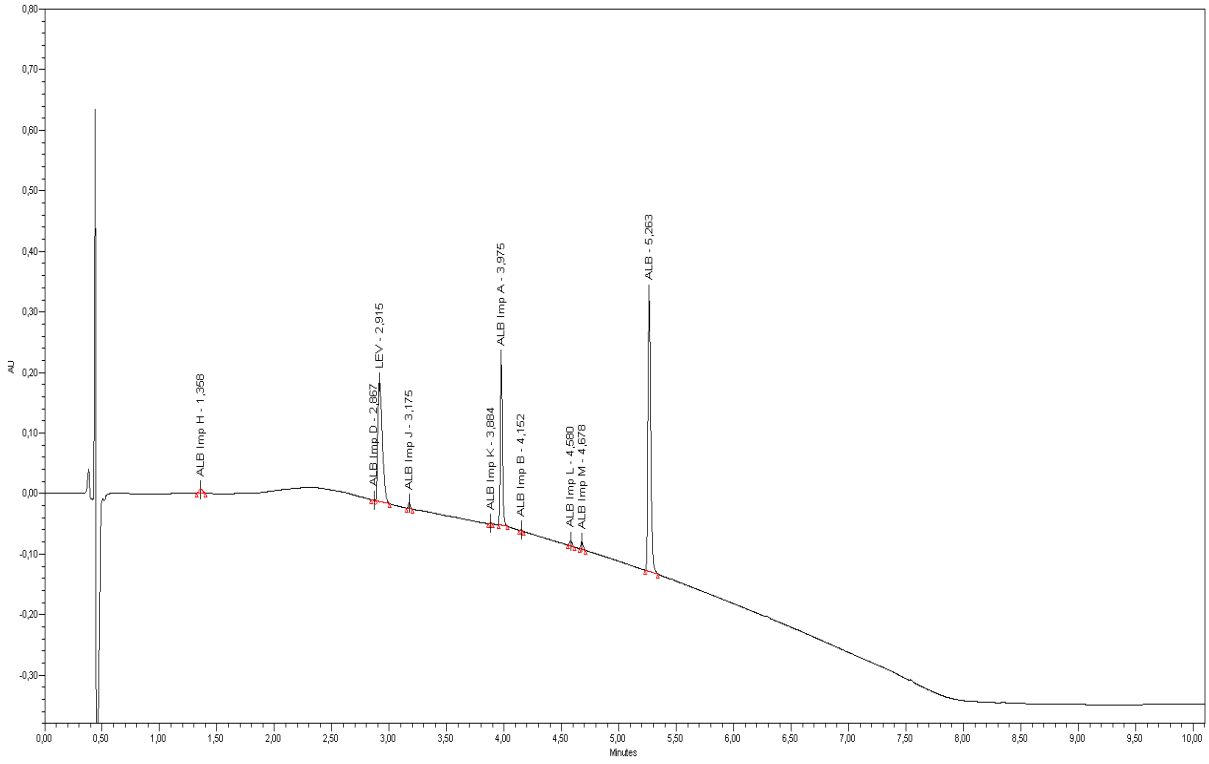
Kromatogrami se dobiveni metodom A, a kromatografske krivulje ALB, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata procesirane su pri 223 nm, dok je LEV procesiran pri 215 nm. Kromatografski parametri sastavnica za pojedini uvjet forsirane razgradnje prikazani su u Tablicama 33 i 34, a na Slici 32 je prikazan kromatogram nakon izlaganja otopine ALB/LEV lužini. Postoci nerazgrađenog ALB u otopini ALB/LEV i usporedba sa samom otopinom ALB nakon forsirane razgradnje prikazani su u Tablici 35.

Tablica 33: *Prikaz albendazola, levamisola, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem temperaturi (80°C, 24 h) i oksidansu (10% H_2O_2, 30 min) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), relativnog vremena zadržavanja u odnosu na ALB (r_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 223 nm,* pri 215 nm)*

		80°C, 24 h		10% H_2O_2, 30 min	
	t_R	R_S	s/n	R_S	s/n
ALB Imp D	2,858	-	25	-	27
LEV*	2,91	1,0	4951	1,0	3956
ALB Imp A	3,973	20,0	29	20,1	3901
ALB Imp B	4,155	4,8	41	4,5	36
ALB	5,266	27,5	11001	25,5	16904
ALB Imp F	6,309	26,7	74	25,7	149

Tablica 34: *Prikaz albendazola, levamisola, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata nastalih izlaganjem lužini (1M NaOH, 24 h) i kiselini (5M HCl, 5 h) te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 223 nm, * pri 215 nm)*

		1M NaOH, 24 h		5M HCl, 5h	
	t_R	R_S	s/n	R_S	s/n
ALB Imp H	1,358	-	200	-	-
ALB Imp D	2,788	34,7	38	-	42
LEV*	2,842	1,0	3832	1,0	6753
ALB Imp J	3,175	4,9	332	-	-
ALB Imp K	3,884	20,8	42	-	-
ALB Imp A	3,935	2,6	9256	20,5	5219
ALB Imp B	4,115	5,1	56	5,1	87
ALB Imp L	4,55	11,7	300	13,6	12
ALB Imp M	4,658	2,6	403	3,5	55
ALB	5,24	14,4	15537	15,1	21757
ALB Imp F	6,289	-	-	26,9	130



Slika 32: *Kromatografski prikaz otopine albendazola/levamisola, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata nakon izlaganja lužini (1M NaOH, 24 h) (procesirano pri 223 nm)*

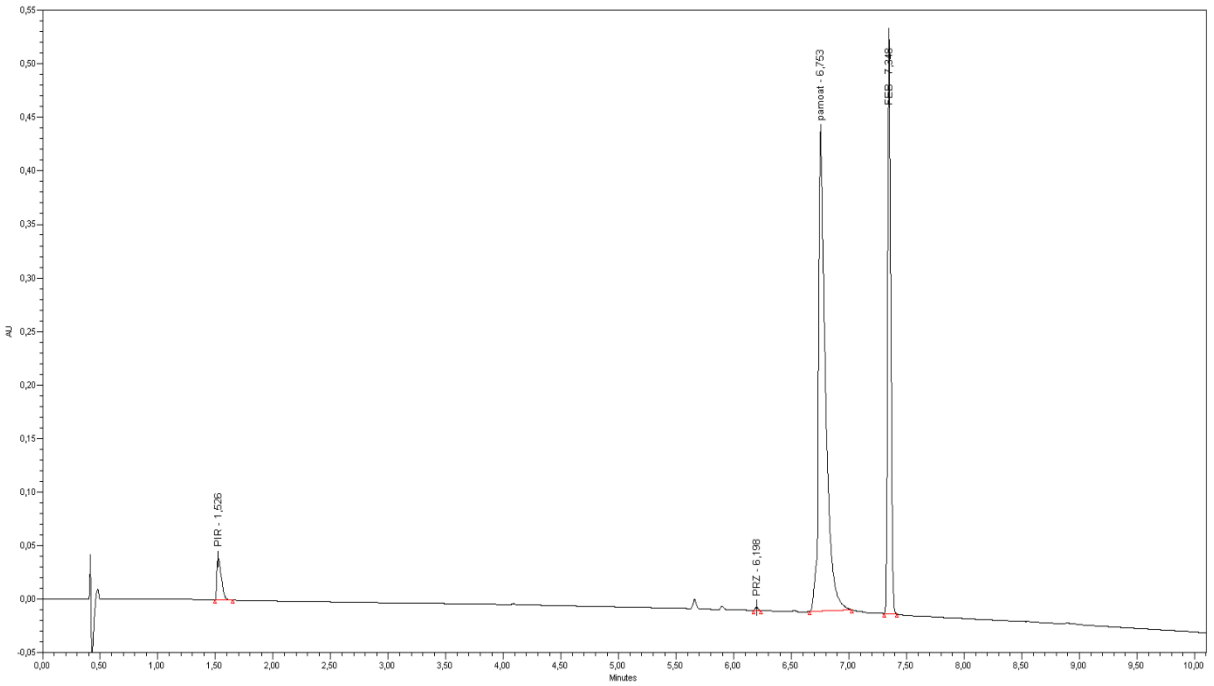
Tablica 35: *Usporedba postotka nerazgrađenog albendazola nakon forsirane razgradnje u otopini albendazola te u otopini albendazola/levamisola*

	ALB	**ALB/LEV**
Temperatura (80°C, 24 h)	98,87%	98,67%
Oksidans (10% H_2O_2, 30 min)	73,02%	82,86%
Lužina (1M NaOH, 24 h)	70,86%	68,52%
Kiselina (5M HCl, 5 h)	83,49%	82,72%

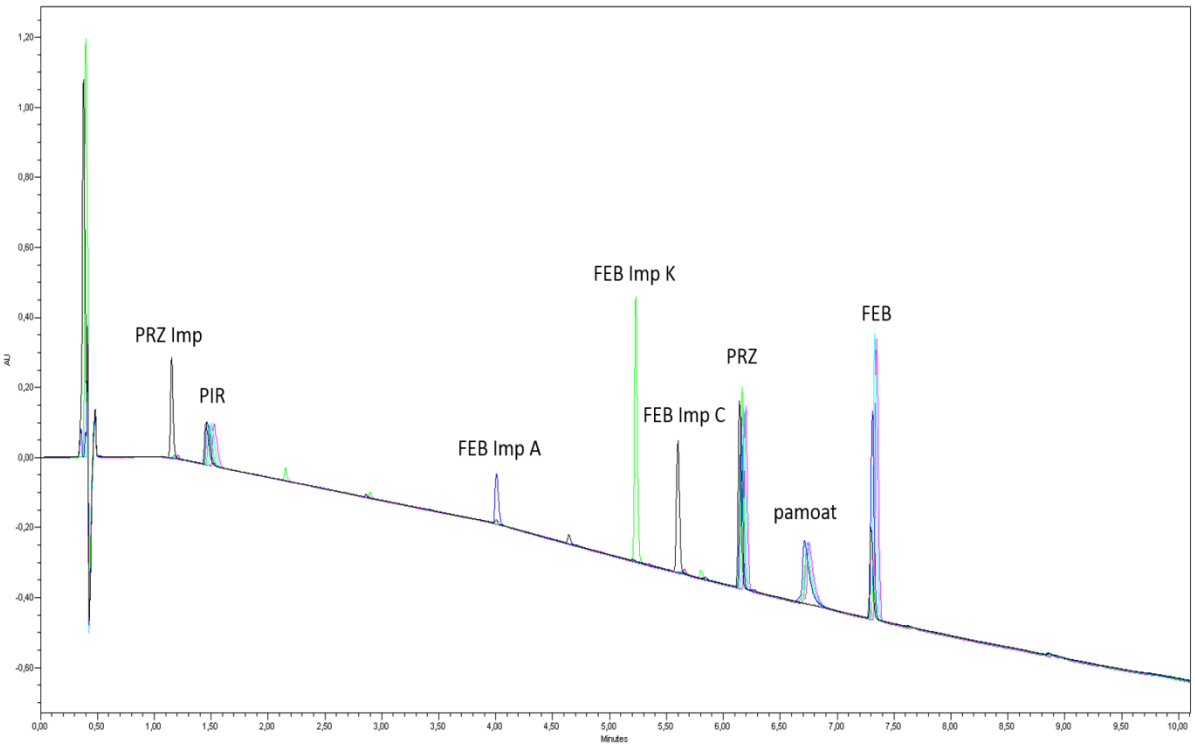
4.5. Metode za febantel/pirantel/prazikvantel

4.5.1. Definiranje metode za određivanje sadržaja za febantel/pirantel/prazikvantel

Sve kromatografske krivulje od interesa (FEB, PIR, PRZ, pamoat) uspješno se odjeljuju međusobno (Slika 33) te od njihovih onečišćenja i razgradnih produkata (Slika 34). U Tablici 36 prikazani su njihovi kromatografski parametri. FEB i pamoat procesirani su pri 240 nm, PIR pri 310 nm, a PRZ pri 195 nm.



Slika 33: *Kromatografski prikaz metode za određivanje sadržaja febantela/pirantela/prazikvantela (procesirano pri 240 nm)*



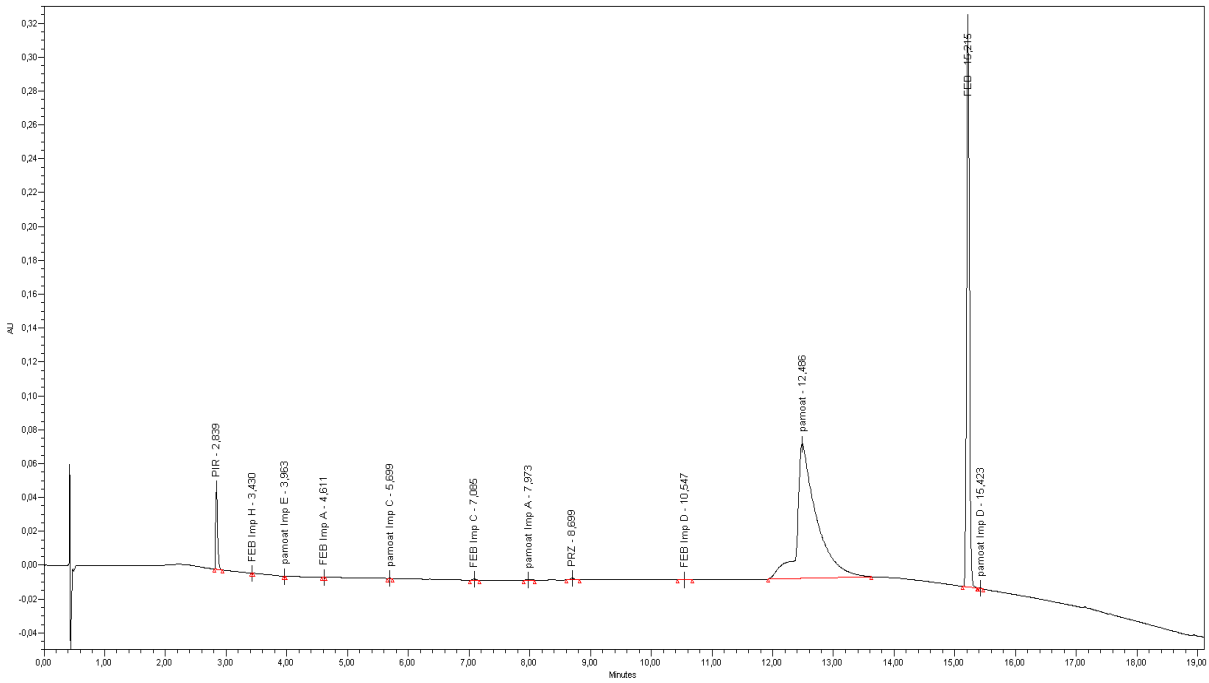
Slika 34: *Prikaz preklopljenih kromatograma otopine API-a febantela/pirantela,/prazikvantela i otopina koje su bile izložene uvjetima forsirane razgradnje (temperatura, oksidans, lužina, kiselina) po metodi za određivanje sadržaja (procesirano pri 195 nm kako bi se vidio prazikvantel)*

Tablica 36: *Prikaz kromatografskih parametara febantela, pirantela, prazikvantela i pamoata dobivenih po metodi za određivanje sadržaja: vremena zadržavanja (t_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (febantel i pamoat su procesirani pri 240 nm, pirantel pri 310 nm, a prazikvantel pri 195 nm)*

	t_R	R_S	s/n
PIR	1,456	-	6168
PRZ	6,145	78,8	2288
pamoat	6,715	7,6	28613
FEB	7,301	8,0	34384

4.5.2. Definiranje metode za određivanje onečišćenja za febantel/pirantel/prazikvantel

Kromatografske krivulje FEB, PIR, PRZ, pamoata, njihovih onečišćenja i razgradnih produkata se uspješno odjeljuju (Slika 35). Njihovi kromatografski parametri prikazani su u Tablici 37. FEB, pamoat i njihova onečišćenja procesirani su pri 240 nm, PIR pri 310 nm, a PRZ pri 195 nm.



Slika 35: *Kromatografski prikaz metode za određivanje onečišćenja u otopini API-a febantela/pirantela/prazikvantela (procesirano pri 240 nm)*

Tablica 37: *Prikaz sastavnica analizirane otopine API-a febantela/pirantela/prazikvantela po metodi za određivanje onečišćenja te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 240 nm, * pri 310 nm, ** pri 195 nm)*

	t_R	R_S	s/n
PIR*	2,914	-	26729
FEB Imp H	3,494	13,3	16
pamoat Imp E	4,026	15,5	10
FEB Imp A	4,695	14,6	20
pamoat Imp C	5,812	18,0	12
FEB Imp C	7,241	17,3	76
pamoat Imp A	8,207	8,8	19
PRZ**	8,964	6,1	1490
FEB Imp D	10,974	12,2	42
pamoat	13,131	6,1	9065
FEB	15,359	10,0	37992
pamoat Imp D	15,548	2,7	32

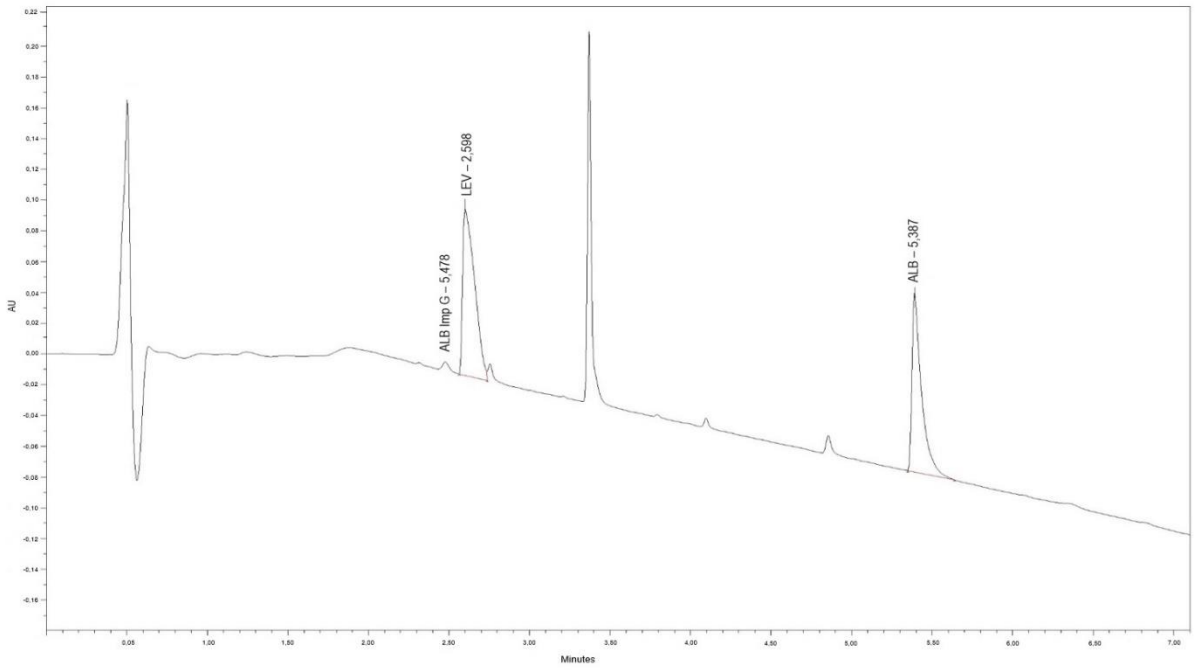
4.6. Metode za albendazol/levamisol

4.6.1. Definiranje metode za određivanje sadržaja za albendazol/levamisol

Kromatografske krivulje ALB i LEV uspješno se odjeljuju međusobno, međutim ne odjeljuju se uspješno od razgradnih produkata u uzorku. Analizom onečišćenja i razgradnih produkata u otopini ALB (Tablice 28 i 29) i otopini ALB/LEV (Tablice 33 i 34) nakon djelovanja oksidansa, lužine i kiseline primijećeno je da se ispod kromatografske krivulje LEV nalazi razgradni produkt ALB Imp G. Iz tog razloga je modifikacijom metode A razvijena metoda B (Tablica 38). Na Slici 36 prikazano je uspješno odjeljivanje LEV od ALB Imp G metodom B u otopini ALB/LEV koja je bila izložena lužini, a kromatografski parametri ALB i LEV prikazani su Tablici 39. ALB je procesiran pri 223 nm, a LEV pri 215 nm.

Tablica 38: *UPLC metoda B za određivanje sadržaja za albendazol/levamisol*

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	95	5
1	95	5
3	79	21
7	46	54



Slika 36: *Kromatografski prikaz učinkovite metode B za određivanje sadržaja albendazola/levamisola. Prikazana je otopina albendazola nakon djelovanja lužine (1M NaOH, 24 h) kako bi se vidjelo odjeljivanje razgradnog produkta ALB Imp G od levamisola (procesirano pri 223 nm).*

Tablica 39: *Prikaz kromatografskih parametara albendazola i levamisola dobivenih po metodi za određivanje sadržaja: vremena zadržavanja (t_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (albendazol je procesiran pri 223 nm, a levamisol pri 215 nm)*

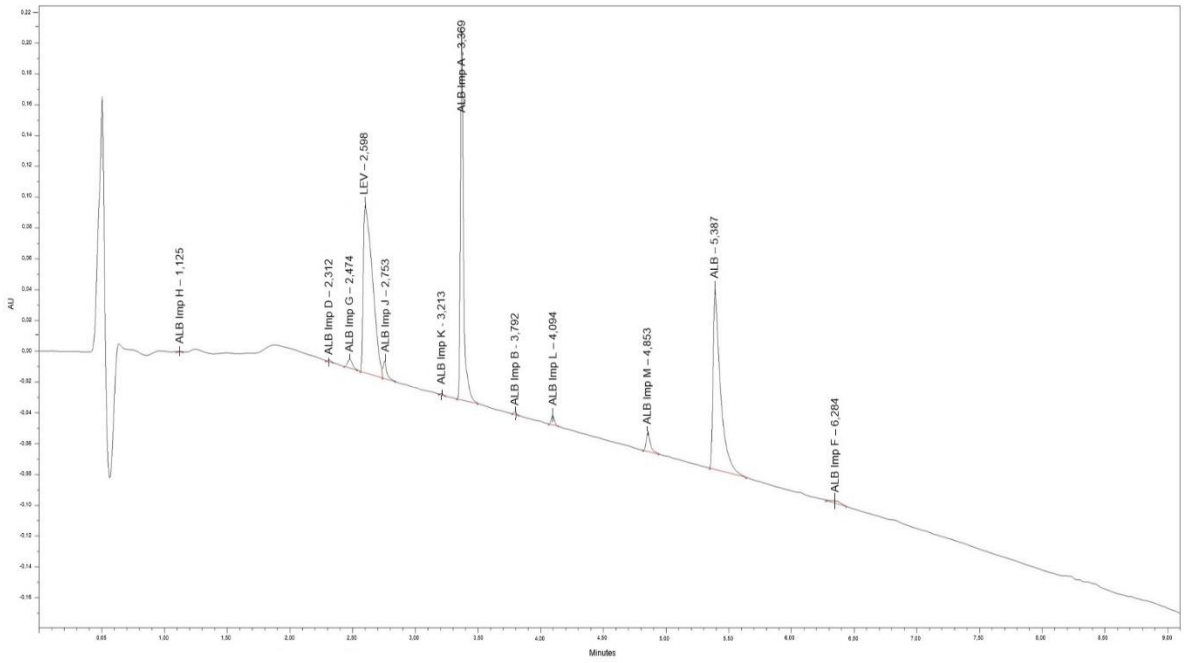
	t_R	R_S	s/n
LEV	2,598	-	4218
ALB	5,389	20,1	2782

4.6.2. Definiranje metode za određivanje onečišćenja za albendazol/levamisol

Kromatografske krivulje ALB, LEV i njihovih razgradnih produkata ne odjeljuju se uspješno metodom A (vidi 4.6.1), pa je njenom modifikacijom razvijena metoda B (Tablica 40). Na Slici 37 prikazano je uspješno odjeljivanje ALB Imp G od LEV metodom B u otopini ALB/LEV koja je bila izložena lužini. Kromatografski parametri sastavnica otopine prikazani su u Tablici 41. ALB, njegova onečišćenja i razgradni produkti procesirani su pri 223 nm, a LEV pri 215 nm.

Tablica 40: *UPLC metoda B za određivanje onečišćenja za albendazola/levamisola*

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	95	5
1	95	5
3	79	21
9	30	70



Slika 37: *Kromatografski prikaz učinkovite metode B za određivanje onečišćenja albendazola/levamisola. Prikazana je otopina albendazola nakon djelovanja lužine (1M NaOH, 24 h) kako bi se vidjelo odjeljivanje razgradnog produkta ALB Imp G od levamisola (procesirano pri 223 nm)*

Tablica 41: *Prikaz sastavnica analizirane otopine albendazola/levamisola koja je bila pod utjecajem lužine (1M NaOH, 24 h) po metodi B za određivanje onečišćenja te njihovih kromatografskih parametara: vremena zadržavanja (t_R), razlučivanja koje se odnosi na prethodnu kromatografsku krivulju (R_S) te omjera signala i šuma (s/n) (procesirano pri 223 nm, * pri 215 nm)*

	t_R	R_S	s/n
ALB Imp H	1,125	-	12
ALB Imp D	2,312	14,1	67
ALB Imp G	2,474	2,3	160
LEV*	2,598	1,1	4218
ALB Imp J	2,753	1,7	289
ALB Imp K	3,213	11,5	27
ALB Imp A	3,369	3,9	9075
ALB Imp B	3,792	9,9	40
ALB Imp L	4,094	6,6	296
ALB Imp M	4,853	15,1	325
ALB	5,389	7,2	2782
ALB Imp F	6,284	5,6	25

5. Rasprava

5.1. Priprava temeljnih standardnih i razrijeđenih otopina

Temeljne standardne otopine FEB, PIR, PRZ, ALB i LEV, koncentracije 0,1 mg/ml, pripremljene su dodatkom metanola u volumenu 70% volumetrijske tikvice uz izlaganje ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 30 min nakon čega su nadopunjene acetonitrilom. Razrijeđene otopine pripremljene su razrjeđivanjem temeljnih standardnih otopina u pročišćenoj vodi u odgovarajućim koncentracijama (0,03 mg/ml za FEB i PIR, 0,02 mg/ml za ALB i 0,01 mg/ml za PRZ i LEV). Ispitan je utjecaj razrjeđivanja sa mješavinom acetonitrila i vode u volumnom omjeru 15:85, 50:50 i 85:15 te sa pročišćenom vodom na visinu i širinu kromatografskih krivulja. Kromatografske krivulje imale su najbolji izgled (visina, širina, simetrija) kada su temeljne standardne otopine bile razrijeđene čistom pročišćenom vodom, a od mješavina acetonitrila i vode najbolji izgled dalo je razrjeđenje u omjeru 15:85, zatim 50:50 te 85:15. Dobiveni utjecaj može se objasniti time što eluiranje u svim metodama započinje mješavinom pokretnih faza sa vrlo velikim udjelom pročišćene vode (95% u metodi za određivanje onečišćenja FEB/PIR/PRZ i određivanje sadržaja i onečišćenja ALB/LEV, te 85% u metodi za određivanje sadržaja FEB/PIR/PRZ). Što je razrjeđenje sličnije mješavini pokretnih faza na početku eluiranja to su kromatografske krivulje uže, više i više simetrične, a time je njihovo odjeljivanje uspješnije.

5.2. Određivanje optimalnog pH uz pomoć programskog paketa Marvin Beans

Prema rezultatima programskog paketa Marvin Beans najprikladniji pH za odjeljivanje FEB/PIR/PRZ je 7,1 (Slika 11), dok je najprikladniji pH za odjeljivanje ALB/LEV 5,2 (Slika 12). Međutim, moguće je uspješno odjeljivanje i u drugim rasponima pH vrijednosti, pa je tako odabran raspon između pH 2,7 - 2,8 iz nekoliko razloga: 1) kolone su dugotrajnije ukoliko se koristi kiseli pH, 2) zajednička pokretna faza A pojednostavljuje eksperiment i skraćuje vrijeme potrebno za razvoj dviju pojedinačnih metoda, 3) pri navedenom rasponu pH moguće je uspješno odijeliti sve sastavnice uzoraka.

Pokretna faza A u svim metodama bila je 0,1% mravlja kiselina u pročišćenoj vodi čiji je pH varirao između 2,7 - 2,8.

5.3. Određivanje optimalne metode uz pomoć programskog paketa DryLab

Za točnost predviđanja od iznimne je važnosti odrediti mrtvi volumen instrumenta te izvankolonski volumen (engl. *extracolumn volume*). Izvankolonski volumen najviše ovisi o volumenu sustava za injektiranje, volumenu detektora i volumenu kapilara od injektora do detektora. Njegova vrijednosti ovisi o tipu instrumenta, pa za UPLC iznosi 0,002 ml, dok je za HPLC 0,016 ml. Međutim, te vrijednosti ne odgovaraju u svim slučajevima, npr. kada su kromatografske krivulje znatno šire od pretpostavljenog. S obzirom da izvankolonski volumen ima značajan utjecaj na širinu kromatografskih krivulja, od velike je važnosti ispravno odrediti njegovu vrijednost kako bi predviđene vrijednosti u DryLab-u bile što točnije.

Mrtvi volumen određuje se eksperimentalno i iznosio je 0,46 ml, dok je izvankolonski volumen određen empirijski i iznosio je 0,006 ml. Osim navedenog, potrebno je provesti inicijalna ispitivanja u kojima mijenjamo parametre čiji utjecaj na odjeljivanje kromatografskih krivulja želimo ispitati. Tako dobivene kromatograme potrebno je procesirati na način da svaki kromatogram sadrži jednak broj kromatografskih krivulja kako bi DryLab na temelju unesenih rezultata mogao stvarati virtualne kromatograme i predvidjeti kromatografske parametre.

Metode su razvijene na koloni ACQUITY® BEH C18 (100 x 2,1 nm, 1,7 μm) koja daje najbolji izgled kromatografskih krivulja (visina, širina, simetrija) u odnosu na ostale testirane kolone.

5.3.1. DryLab predviđanja za febantel/pirantel/prazikvantel

Preliminarnim ispitivanjima na otopini API-a FEB/PIR/PRZ uočeno je puno bolje odjeljivanje kromatografskih krivulja pri visokim temperaturama (70°C) nego pri niskim (35°C) te pri protoku 0,6 ml/min. Iz toga razloga DryLab-om je ispitan samo utjecaj vremena eluiranja na odjeljivanje sastavnica uzorka (Slika 13). Inicijalno testiranje uključivalo je linearno gradijentno eluiranje od 2 do 70% B u trajanju od 15 min i 50 min. Na temelju procesiranih kromatograma i predviđanja koje je DryLab pokazao uspješno je razvijena metoda za određivanje onečišćenja za FEB/PIR/PRZ (Slika 14).

Usporedbom kromatografskih parametara (vremena zadržavanja i razlučivanja) koje predviđa DryLab i parametara dobivenih tekućinskim kromatografom (Tablica 12) primjećeno je veliko odstupanje vremena zadržavanja pamoata od gotovo 2 min. Razlog tome je najvjerojatnije izgled njegove kromatografske krivulje (Slika 24) koja je nesimetrična i njezina

širina na baznoj liniji iznosi preko 2 min. Točnost predviđanja DryLab-a se smanjuje za kromatografske krivulje opisanog izgleda.

Osim toga, uočeno je veće odstupanje u vrijednostima razlučivanja za FEB Imp H, FEB Imp A i FEB. Prema jednadžbi za razlučivanje (Tablica 4) vrijedi da njegova vrijednost raste što je veća razlika vremena zadržavanja kromatografskih krivulja i što su kromatografske krivulje uže. Lošijom procjenom širine kromatografskih krivulja i manjim odstupanjima u vremenima zadržavanja moguće je objasniti odstupanja u razlučivanju, posebice u slučaju FEB čije se razlučivanje računa u odnosu na pamoat na kojem su primjećena najveća odstupanja od stvarnog uzorka.

5.3.2. DryLab predviđanja za albendazol/levamisol

Preliminarnim ispitivanjima na otopini API-a ALB/LEV određen je protok od 0,6 ml/min. Pomoću DryLab-a ispitan je učinak temperature i vremena eluiranja na odjeljivanje sastavnica uzorka (Slika 16). Inicijalno ispitivanje uključivalo je linearno gradijentno eluiranje od 2 do 70% B pri temperaturama 35°C i 70 °C u trajanju od 15 min i 50 min. Na temelju procesiranih kromatograma i predviđanja prema DryLab-u uspješno je razvijena metoda za određivanje onečišćenja za ALB/LEV (Slika 17) u otopini API-ja. Nakon provedene forsirane razgradnje uočeno je da pri određenim uvjetima (oksidans, lužina i kiselina) nastaje onečišćenje ALB Imp G koje nije prisutno u API-u i koje se nalazi ispod kromatografske krivulje LEV pa je bilo potrebno modificirati metodu.

Usporedbom kromatografskih parametara (vremena zadržavanja i razlučivanja) predviđenih DryLab-om i parametara dobivenih tekućinskim kromatografom (Tablica 13) nisu primjećena značajna odstupanja.

5.4. Evaluacija razvijenih metoda na temelju rezultata forsirane razgradnje

Forsirana razgradnja provedena je pod uvjetima temperature, oksidansa, lužine i kiseline te svjetlosti za PIR. Cilj je bio postići od 10 - 30% razgradnje kako bi se vidjeli razgradni produkti, ali ne i sekundarni produkti nastali iz primarnih. Rezultati forsirane razgradnje korišteni su za provjeru učinkovitosti metoda dobivenih programskih paketom DryLab.

Slijedeći preporuke u Tablici 7 za uvjet oksidansa nije dobivena željena razgradnja PIR, PRZ i LEV pa je korišten ekstremni uvjet (10% H_2O_2, 80°C, 24 h) kako bi se postigla odgovarajuća razgradnja. U slučaju PIR i LEV korištena je 5M NaOH, a u slučaju PIR, PRZ, ALB i LEV 5M HCl što također nije u skladu sa preporukama u Tablici 7. Takvi uvjeti odabrani su s ciljem da se izbjegne grijanje koje se provodilo u vodenoj kupelji i čiji rezultati nisu naročito reproducibilni, a skrati trajanje forsirane razgradnje. U slučaju LEV uz korištenje 5M HCl, otopina je također grijana na 80°C kroz 24 h. Naime, na taj način je postignuta puno veća razgradnja nego kada nije grijana i kad je neutralizirana nakon 48 h.

5.4.1. Tumačenje forsirane razgradnje za febantel

Svi kromatogrami FEB procesirani su pri 240 nm. Sam FEB nema taj apsorpcijski maksimum (Slika 19), međutim apsorpcijski maksimumi mnogih njegovih onečišćenja i razgradnih produkata su između 230 i 240 nm. Iz navedenog razloga je valna duljina od 240 nm odabrana kao optimalna pri kojoj se jasno vide i FEB i njegova onečišćenja te razgradni produkti.

Postoci nerazgrađenog FEB nakon forsirane razgradnje bili su između 81,12% i 91,01%. Rezultatima forsirane razgradnje pokazano je da postoji veliki broj razgradnih produkata FEB te da nastaju različitim razgradnim putevima.

5.4.2. Tumačenje forsirane razgradnje za pirantel

Pirantel dolazi u obliku soli pirantel pamoata. Apsorpcijski maksimum PIR je 310 nm, a pamoata 240 nm, pa su kromatogrami procesirani na obje valne duljine. Usporedbom UV spektra onečišćenja/razgradnih produkata sa UV spektrom PIR i pamoata pojedino onečišćenje/razgradni produkt pripisano je PIR, odnosno pamoatu. Za točnu procjenu podrijetla svakog onečišćenja/razgradnog produkta potrebna je dodatna analiza poput spregnute tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS) kojom je moguće provesti strukturnu karakterizaciju onečišćenja i razgradnih produkata.

Uvjeti forsirane razgradnje podešeni su prema PIR s obzirom da je on analit od interesa. Također, u Europskoj farmakopeji su specificirana samo njegova onečišćenja (Council of Europe, 2013c). PIR ne sadrži onečišćenja u standardu i API-u, dok pod utjecajem temperature, oksidansa i svjetlosti nastaje PIR Imp A čija površina značajnije raste jedino nakon izlaganja

svjetlosti i iznosi 4,46% ukupne površine. S obzirom da navedeno onečišćenje nastaje pod utjecajem svjetlosti smatra se da je to fotoizomer koji nastaje tim putem (Radman, 2014). Nakon izlaganja lužini postotak nerazgrađenog FEB bio je 85,28%, a nakon izlaganja kiselini 93,72%. Rezultatima forsirane razgradnje pokazano je da se PIR obavezno treba zaštititi od svjetlosti, te da razgradni produkti nastaju uglavnom pri lužnatim uvjetima.

U standardu i API-ju pirantel pamoata prisutno je četiri onečišćenja pamoata ukupne površine 0,36% u standardu, i 0,39% u API-ju. Pri uvjetima forsirane razgradnje za PIR, pamoat se značajno raspada, u daleko većem omjeru nego PIR te čak 100% nakon izlaganja kiselini.

5.4.3. Tumačenje forsirane razgradnje za prazikvantel

Svi kromatogrami PRZ procesirani su pri valnoj duljini od 195 nm što je njegov apsorpcijski maksimum.

PRZ u standardu i API-u sadrži onečišćenje PRZ Imp A. Nakon izlaganja temperaturi onečišćenje je i dalje prisutno te nema detektiranih razgradnih produkata. U standardu je PRZ Imp A površine 0,71%, u API-u 0,68%, a nakon izlaganja temperaturi 0,13%. Bilo bi za očekivati da će se postotak površine nakon izlaganja forsiranoj razgradnji povećati, međutim, njegova površina se nakon izlaganja temperaturi smanjila. Moguće objašnjenje je da se onečišćenje razgradilo na sekundarna onečišćenja koja su onda toliko male površine i omjera signala i šuma manjeg od 10 da ih je nemoguće detektirati.

Razgradnja PRZ nakon izlaganja oksidansu bila je tek 3,48%, dok je nerazgrađenog PRZ nakon izlaganja lužini ostalo 80,69%, a nakon izlaganja kiselini 86,45%. Rezultatima forsirane razgradnje pokazano je da razgradni produkti PRZ uglavnom nastaju pri lužnatim i kiselim uvjetima.

5.4.4. Tumačenje forsirane razgradnje za febantel/pirantel/prazikvantel

Forsirana razgradnja provedena je na temeljnoj standardnoj otopini FEB/PIR/PRZ po najblažim uvjetima forsirane razgradnje: temperatura (80°C, 24), oksidans (5% H_2O_2, 7 h), lužina (0,1M NaOH, 2 min) i kiselina (1M HCl, 1 h) čime je pokazano uspješno odjeljivanje onečišćenja međusobno i od analita.

Kromatogrami su procesirani pri 240 nm prateći FEB, pamoat, njihova onečišćenja i razgradne produkte, pri 310 nm prateći PIR i njegov razgradni produkt te pri 195 nm prateći PRZ. Na kromatogramima nije procesirano onečišćenje PRZ Imp A koje se nalazi u standardu i API-u PRZ zbog toga što je njegov omjer signala i šuma manji od 10. U standardu PRZ omjer signala i šuma bio je 25, a u API-u 28 te je takvu promjenu moguće objasniti promjenom u baznoj liniji.

Prema podacima u Tablici 26 uočeno je odstupanje postotka nerazgrađenog FEB u otopini FEB (91,01%) i u otopini FEB/PIR/PRZ (99,44%) nakon izlaganja temperaturi kao uvjetu forsirane razgradnje. Moguće objašnjenje je nereproducibilnost ispitivanja zbog vodene kupelji koja je korištena kao izvor temperature. Kupelj je grijana na 80°C kroz 24 h, a ovisno o razini vode u kupelji i vanjskim uvjetima, voda je u određenom trenutku isparila čime se uvjeti forsirane razgradnje mijenjaju te ih je nemoguće kontrolirati kroz 24 h. Nešto manje odstupanje uočeno je nakon djelovanja lužine kao uvjeta forsirane razgradnje gdje je nerazgrađenog FEB u otopini FEB ostalo 81,12%, a u otopini FEB/PIR/PRZ 87,68%. S obzirom da je FEB iznimno osjetljiv na djelovanje lužine i forsirana razgradnja traje tek 2 min, a nakon neutralizacije kiselinom FEB se i dalje razgrađuje važno je injektirati uzorak čim prije nakon neutralizacije te i najmanja odstupanja utječu na postotak nerazgrađenog FEB.

5.4.5. Tumačenje forsirane razgradnje za albendazol

Svi kromatogrami ALB procesirani su pri valnoj duljini od 223 nm koja je između njegova dva apsorpcijska maksimuma (204 i 229 nm), a pokazala se kao optimalna za detekciju onečišćenja i razgradnih produkata.

ALB već u standardu i API-u sadrži nekoliko onečišćenja koja su ostala prisutna i nakon izlaganja temperaturi te nije bilo razgradnih produkata. Postoci nerazgrađenog ALB nakon forsirane razgradnje bili su između 70,86% i 83,49%. Rezultatima forsirane razgradnje pokazano je da postoji veliki broj razgradnih produkata ALB te da nastaju različitim razgradnim putevima.

5.4.6. Tumačenje forsirane razgradnje za levamisol

Svi kromatogrami LEV procesirani su pri valnoj duljini od 215 nm što je njegov apsorpcijski maksimum.

LEV u standardu i API-u sadrži onečišćenje LEV Imp A. Nakon izlaganja temperaturi onečišćenje je i dalje prisutno te nema detektiranih razgradnih produkata. U standardu je LEV Imp A površine 0,35%, u API-u 0,38%, a nakon izlaganja temperaturi 0,08%. Moguće objašnjenje za smanjenje postotka onečišćenja nakon forsirane razgradnje je jednako onome opisanom u poglavlju (5.4.3.), odnosno da se onečišćenje razgrađuje na sekundarna onečišćenja koja su onda toliko male površine i omjera signala i šuma ispod 10 da ih je nemoguće detektirati.

Razgradnja LEV nakon izlaganja oksidansu bila je tek 1,49%, dok je nerazgrađenog LEV nakon izlaganja lužini ostalo 87,64%, a nakon izlaganja kiselini 78,58%. Rezultatima forsirane razgradnje pokazano je da razgradni produkti LEV uglavnom nastaju pri lužnatim i kiselim uvjetima.

5.4.7. Tumačenje forsirane razgradnje za albendazol/levamisol

Forsirana razgradnja provedena je na temeljnoj standardnoj otopini ALB/LEV po najblažim uvjetima forsirane razgradnje: temperatura (80°C, 24), oksidans (10% H_2O_2, 30 min), lužina (1M NaOH, 24 h) i kiselina (5M HCl, 5 h) čime je pokazano neuspješno odjeljivanje razgradnog produkta ALB Imp G od LEV metodom A. Na ovom primjeru pokazana je važnost provođenja forsirane razgradnje i evaluacija metode na temelju dobivenih rezultata. Kromatogrami su procesirani pri 223 nm prateći ALB, njegova onečišćenja i razgradne produkte te pri 215 nm prateći LEV.

Na kromatogramima nije procesirano onečišćenje LEV Imp A koje se nalazi u standardu i API-u LEV zbog toga što je njegov omjer signala i šuma manji od 10. U standardu LEV omjer signala i šuma bio je 29, a u API-u 23 te je takvu promjenu moguće objasniti promjenom u baznoj liniji.

Prema podacima u Tablici 35 uočeno je veće odstupanje postotka nerazgrađenog ALB u otopini ALB (73,02%) i u otopini ALB/LEV (82,86%) nakon djelovanja oksidansa kao uvjeta forsirane razgradnje. ALB je vrlo osjetljiv na djelovanje oksidansa i forsirana razgradnja traje tek 30 min. Kako je učinak oksidansa nemoguće zaustaviti važno je točno nakon 30 min injektirati uzorak, a odstupanja od tog perioda rezultiraju odstupanjima u postotku nerazgrađenog ALB.

5.5. Metode za određivanje sadržaja i onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela

Uspješno je razvijena metoda za određivanja sadržaja FEB/PIR/PRZ u trajanju od 10 min i metoda za određivanje onečišćenja u trajanju od 19 min. Učinkovitost razvijenih metoda potvrđena je rezultatima forsirane razgradnje. Metodom za određivanje sadržaja odjeljuju se kromatografske krivulje FEB, PIR i PRZ međusobno i od svih onečišćenja i razgradnih produkata prisutnih u uzorku što je preduvjet za točnost određivanja sadržaja, dok se metodom za određivanje onečišćenja sva onečišćenja i razgradni produkti odjeljuju i međusobno što je važno za njihovu detekciju.

5.6. Metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja albendazola/levamisola

Uspješno je razvijena metoda B za određivanje sadržaja ALB/LEV u trajanju od 7 min i metoda B za određivanje onečišćenja ALB/LEV u trajanju od 9 min. Učinkovitost razvijenih metoda potvrđena je rezultatima forsirane razgradnje. Metodom za određivanje sadržaja odjeljuju se kromatografske krivulje ALB/LEV međusobno i od svih onečišćenja i razgradnih produkata prisutnih u uzorku što je preduvjet za točnost određivanja sadržaja, dok se metodom za određivanje onečišćenja sva onečišćenja i razgradni produkti odjeljuju i međusobno što je važno za njihovu detekciju.

Metode B za ALB/LEV nastale su modifikacijom metoda A koje su se pokazale neuspješnima u odjeljivanju razgradnog produkta ALB Imp G koji nastaje djelovanjem oksidansa, kiseline i lužine od LEV. Smanjenjem nagiba gradijenta eluiranja između 3 i 7 min u metodi za određivanje sadržaja sa 21-70% B na 21-54% B uspješno je odijeljen razgradni produkt ALB Imp G od LEV sa razlučivanjem 1,1. Smanjenjem nagiba gradijenta eluiranja u metodi za određivanje onečišćenja od 21 – 70% B u periodu od 3-7 min na period od 3-9 min također je postignuto uspješno odjeljivanje ALB Imp G od LEV sa jednakim razlučivanjem kao i u metodi za određivanje sadržaja.

5.7. Kvantitativna analiza onečišćenja i promjene u metodama za određivanje onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela i albendazola/levamisola

Kvantitativna analiza provedena je metodom ukupne površine unutar svakog pojedinačnog kromatograma. S obzirom da srodni spojevi anthelmintika preko kojih bi se računao faktor odgovara nisu bili na raspolaganju, jednadžba (3) korištena je bez faktora odgovora. Nedostatak metode ukupne površine je što ona ne uzima u obzir nedetektirane sastavnice uzorka te pretpostavlja isti odziv detektora za sve sastavnice što nije točno. Validacija bi omogućila korištenje metode sa vanjskim standardom čime bi se povećala točnost rezultata.

Cilj je koristiti razvijene metode za analizu višekomponentnih tableta. Iz tog razloga je granica određivanja (engl. *limit of quantitation,* LOQ) određena prema podacima za dozirne oblike u Tablici 6 prema kojima je potrebno izvještavanje o razgradnom produktu ukoliko je on veći od 0,1% za dozirne oblike čija je maksimalna dnevna doza ≤1 g/dan, te 0,05% ukoliko je >1 g/dan. S obzirom da u literaturi nisu pronađene maksimalne dnevne doze za ispitivane anthelmintike, u Tablici 2 su prikazane njihove preporučene dnevne doze koje su korištene za izračun. Za FEB i PIR one prelaze 1 g/dan pa je njihova granica za izvještavanje 0,05%, dok preporučene dnevne doze PRZ, ALB i LEV ne prelaze 1 g/dan pa je njihova granica za izvještavanje 0,1%. Međutim kako je granica od 0,1% izražena na samo jednu decimalu ona obuhvaća raspon od 0,05 - 0,14%. Iz tog razloga LOQ je za sve anthelmintike određen kao 0,05% njihove koncentracije.

Kako bi se anthelmintici mogli detektirati u LOQ koncentraciji i biti zadovoljavajućeg omjera signala i šuma, volumen injektiranja treba biti 10 µl, a koncentracije FEB i PIR 0,18 mg/ml, ALB 0,12 mg/ml te PRZ i LEV 0,06 mg/ml. Kromatografska krivulja FEB u LOQ koncentraciji pri tim uvjetima ima omjer signala i šuma 60 (procesirano pri 240 nm), PIR 104 (procesirano pri 310 nm), PRZ 13 (procesirano pri 195 nm), pamoat 15 (procesirano pri 240 nm), ALB 72 (procesirano pri 223 nm), a LEV 27 (procesirano pri 215 nm). Kvantitativna analiza u ovom slučaju više nije moguća metodom ukupne površine jer su kromatografske krivulje prekoncentrirane, već je potrebno validirati metodu te koristiti metodu sa vanjskim standardom. S obzirom da je u provedenim ispitivanjima korištena metoda ukupne površine volumen injektiranja je bio 6 µl za FEB, PIR i PRZ i 8 µl za ALB i LEV, a korištene su koncentracije 0,03 mg/ml za FEB i PIR, 0,02 mg/ml za ALB te 0,01 mg/ml za PRZ i LEV pri kojima nije moguće detektirati LOQ vrijednosti anthelmintika.

6. Zaključci

1. Programski paket Marvin Beans uspješno je predvidio pH vrijednosti koje omogućuju odjeljivanje febantela/pirantela/prazikvantela te albendazola/levamisola.
2. Programskim paketom DryLab uspješno je razvijena metoda za određivanje onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela, dok je metoda za određivanje onečišćenja albendazola/levamisola uspješna isključivo za otopinu API-a albendazola/levamisola na kojoj su provedena inicijalna ispitivanja i u kojoj nema onečišćenja ALB Imp G.
3. Programski paket DryLab pokazao se kao odličan alat kojim se značajno skraćuje vrijeme potrebno za razvoj metode. Iako su moguća odstupanja predviđenih od stvarnih rezultata, daje okvirnu sliku koja uvelike olakšava razvoj.
4. Rezultatima forsirane razgradnje pokazano je da febantel i albendazol imaju brojne razgradne produkte koji nastaju različitim razgradnim putevima, dok razgradni produkti prazikvantela i levamisola nastaju uglavnom pri kiselim i lužnatim uvjetima. Razgradni produkti pirantela nastaju uglavnom pri lužnatim uvjetima. Pri izlaganju svjetlosti nastaje njegov fotoizomer, stoga je za njegovu pripremu potrebno koristiti tamne tikvice, a pripremu je poželjno obavljati u prostoriji sa izvorom crvene svijetlosti koja onemogućuje stvaranje fotoizomera ili fotorazgradnih produkata.
5. Onečišćenja i razgradni produkti u otopini pirantel pamoata pripisana su pirantelu odnosno pamoatu na temelju usporedbe UV spektra. Kako bi se sa sigurnošću odredilo podrijetlo pojedinog onečišćenja, odnosno razgradnog produkta potrebno je provesti dodatnu analizu poput spregnute tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS).
6. Rezultati forsirane razgradnje pomogli su u evaluaciji metoda te ukazali na njihovu učinkovitost (febantel/pirantel/prazikvantel), odnosno neučinkovitost (albendazol/levamisol; metode A) u odjeljivanju sastavnica uzorka.
7. Uspješno je razvijena metoda za određivanje sadržaja te metoda za određivanje onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela.
8. Nakon što su rezultati forsirane razgradnje ukazali na neučinkovitost metoda A za određivanje sadržaja i onečišćenja albendazola/levamisola, uspješno je razvijena metoda B za određivanje sadržaja te metoda B za određivanje onečišćenja.
9. Metode nisu validirane te je prije korištenja potrebno provesti validaciju.

7. Literatura

Białecka W, Kulik A. Determination of active substances in multicomponent veterinary preparations of antiparasitic action by HPLC method. *Acta Pol Pharm, 2010,* 67, 463-8.

Brown P, DeAntonis, K. High-performance liquid chromatography. U: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Settle F, urednik, New Jersey, Prentice Hall, 1997, str. 147-164.

Cerjan-Stefanović Š, Drevenkar V, Jurišić B, Medić-Šarić M, Petrović M, Šegudović N, Švob V, Turina S. Kromatografsko nazivlje, IUPAC preporuke 1993. i 1998.. Zagreb, Hinus-Sekcija za kromatografiju, 1999.

Council of Europe. Febantel. U: European Pharmacopoeia 6th edition. Council Of Europe, 2013a.

Council of Europe. Praziquantel. U: European Pharmacopoeia, 8th edition. Council of Europe, 2013b, str. 3086-3087.

Council of Europe. Pyrantel Embonate. U: European Pharmacopoeia, 8th edition. Council of Europe, 2013c, str. 3130-3131.

Council of Europe. Albendazole. U: European Pharmacopoeia, 8th edition. Council of Europe, 2013d, str. 1496-1497.

Council of Europe. Levamisole Hydrochloride. U: European Pharmacopoeia, 8th edition. Council of Europe, 2013e, str. 2603-2604.

Ehteda A, Galettis P, Pillai K, Morris DL. Combination of Albendazole and 2-Methoxyestradiol significantly improves the survival of HCT-116 tumor-bearing nude mice. *BMC Cancer,* 2013, 86.

Ergamisol®, http://www.rxmed.com, pristupljeno 14. 5. 2015.

Horvat AJM, Babić S, Pavlović DM, Ašperger D, Pelko S, Kaštelan-Macan M, Petrović M, Mance AD. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *TrAC Trend Anal Chem,* 2012, 31, 61-84.

Hou ZJ, Luo X, Zhang W, Peng F, Cui B, Wu SJ, Zheng FM, Xu J, Xu LZ, Long ZJ, Wang XT, Li GH, Wan XY, Yang YL, Liu Q. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. *Oncotarget,* 2015, 6, 6326-40.

Hrvatsko strukovno nazivlje, http://www.struna.ihjj.hr, pristupljeno 2. 6. 2015.

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

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

Pharmaceutical Development, 2009, International Conference on Harmonisation, Q8(R2)

Impurities: Guideline for Residual Solvents, 2011, International Conference on Harmonisation, Q3C(R5)

Lusina M. Ispitivanje stabilnosti lijekova - teorija, regulativa i praksa. *Farm glas,* 2006, 395-404.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, 2002.

Mirfazaelian A, Dadashzadeh S, Rouini MR. A high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of albendazole metabolites in human serum. *J Pharm Biomed Anal,* 2002, 30, 1249-54.

Molnár-Institute for applied chromatography, http://molnar-institute.com, pristupljeno 12. 5. 2015.

Mutch RS, Hutson PR. Levamisole in the adjuvant treatment of colon cancer. *Clin Pharm,* 1991, 10(2), 95-109.

Nigović B. Onečišćenja u lijekovima. U: Analitika lijekova 1. Zagreb, 2013.

Nigović B. Kromatografske tehnike odjeljivanja. U: Analitika lijekova 2. Zagreb, 2014a.

Nigović B. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). U: Analitika lijekova 2. Zagreb, 2014b.

Nygren P, Fryknäs M, Ågerup B, Larsson R. Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol,* 2013, 139, 2133-2140.

Piantavini MS, Pontes FL, Uber CP, Stremel DP, Sena MM, Pontarolo R. Chemometric quality inspection control of pyrantel pamoate, febantel and praziquantel in veterinary tablets by mid infrared spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc,* 2014, 125, 396-403.

Pontes FLD, Pontarolo R, Ramos Campos F, Gasparetto JC, Cardoso MA, Piantavini MS, Badaro Trindade AC. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of Ivermectin, Febantel, Praziquantel, Pyrantel Pamoate and related compounds in fixed dose combination for veterinary use. *Asian J Pharm Clin Res,* 2013, 6(2), 191-199.

Pourgholami MH, Akhter J, Wang L, Lu Y, Morris DL. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother Pharmacol,* 2005, 55(5), 425-32.

Radman S. Praćenje pretvorbe anthelmintika u vodenom okolišu i procjena ekotoksikološkog djelovanja - Doktorski rad. Zagreb, 2014.

Sadigh-Eteghad S, Khayat-Nuri H, Abadi N, Ghavami S, Golabi M, Shanebandi D. Synergetic effects of oral administration of levamisole and Echinacea purpurea on immune response in Wistar rat. *Res Vet Sci,* 2011, 91(1), 82-5.

Sangshetti JN, Deshpande M, Zaheer Z, Shinde DB, Arote R. Quality by design approach: Regulatory need. *Arabian Journal of Chemistry,* 2014.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Introduction to analytical Separations. U: Fundamentals of analytical chemistry, 9th edition, Brooks/Cole, 2014, str. 862.

Waters Corporation, http://www.waters.com, pristupljeno 13. 5. 2015.

Ye T, Xiong Y, Yan Y, Xia Y, Song X, Liu L, Li D, Wang N, Zhang L, Zhu Y, Zneg J, Wei Y, Yu L. The Anthelmintic Drug Niclosamide Induces Apoptosis, Impairs Metastasis and Reduces Immunosuppressive Cells in Breast Cancer Model. *PLoS One,* 2014, 9(1).

8. Sažetak/Summary

Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika

Ključne riječi: febantel, pirantel, prazikvantel, albendazol, levamisol, UPLC, QbD

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti UPLC metode za određivanje sadržaja i onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela i albendazola/levamisola po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD). QbD se danas sve češće koristi iz razloga što značajno skraćuje vrijeme i potrebne resurse za razvoj metode.

Pripremljene su temeljne standardne otopine anthelmintika u koncentraciji 0,1 mg/ml koje su bile izložene uvjetima forsirane razgradnje: temperaturi, oksidansu, lužini, kiselini i svjetlosti (pirantel) s ciljem da se postigne 10-30% razgradnje pojedinog anthelmintika kako bi se vidjela potencijalna onečišćenja. Temeljne standardne otopine su zatim razrijeđene na koncentracije koje približno odgovaraju omjeru febantela, pirantela i prazikvantela u tabletama Prazinon PLUS (150 mg, 144 mg, 50 mg) i omjeru albendazola i levamisola u tabletama Ecsital (300 mg, 150 mg), pa je koncentracija febantela i pirantela bila 0,03 mg/ml, albendazola 0,02 mg/ml, a prazikvantela i levamisola 0,01 mg/ml. Nakon definiranih uvjeta za pojedini anthelmintik, forsirana razgradnja je provedena na otopini febantela/pirantela/prazikvantela, odnosno albendazola/levamisola prema najblažim uvjetima. Na temelju dobivenih rezultata procijenjena je učinkovitost razvijenih metoda u odjeljivanju sastavnica uzorka.

Optimalni pH za odjeljivanje sastavnica uzorka dobiven je korištenjem programskog paketa Marvin Beans, dok su metode dobivene korištenjem programskog paketa DryLab koji na temelju unesenih podataka stvara virtualne kromatograme i predviđa kromatografske parametre sastavnica uzorka. Metode su uspješno razvijene na BEH C18 koloni (100 x 2,1 nm, 1,7 μm) na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti. Metoda za određivanje sadržaja, febantela/pirantela/prazikvantela traje 10 min, a metoda za određivanje onečišćenja 19 min, dok metoda za određivanje sadržaja, odnosno onečišćenja albendazola/levamisola traje 7 min, odnosno 9 min.

Development of UPLC method using quality by design (QbD) approach for multicomponent systems of anthelmintic active pharmaceutical ingredients

Key words: febantel, praziquantel, pyrantel, albendazole, levamisole, UPLC, QbD

The aim of this study was to develop UPLC method for assay and impurities determination of febantel/pyrantel/praziquantel and albendazole/levamisole using quality by design approach (QbD). QbD is frequently used today because it saves times and shortens resources needed for developing a method.

Stock solutions of anthelmintics were prepared in concentration of 0,1 mg/ml and then exposed to influence of temperature, oxidizing agent, acid, base and light (pyrantel) in order to achieve 10-30% degradation products so the potential impurities could be detected. Stock solutions were then diluted in concentrations that correspond the ratio of febantel, pyrantel and praziquantel in tablets Prazinon PLUS (150 mg, 144 mg, 50 mg) and the ratio of albendazole/levamisole in tablets Ecsital (300 mg, 150 mg). Final concentration of febantel and pyrantel was 0,03 mg/ml, of albendazole 0,02 mg/ml and of praziquantel and levamisole 0,01 mg/ml. After defining the forced degradation conditions, febantel/pyrantel/praziquantel solution and albendazole/levamisole solution were exposed to the mildest conditions. Based on the collected results, efficacy of separating the components using developed methods was evaluated.

Optimal pH for separating the components was determined using Marvin Beans software, while methods were developed using DryLab software. Based on the input data, DryLab creates virtual chromatograms and predicts chromatographic parameters for each component. Methods were successfully developed using BEH C18 column (100 x 2,1 nm, 1,7 μm) on ultra-performance liquid chromatograph. Duration of method for assay determination of febantel/pyrantel/praziquantel is 10 min, while method for impurities determination lasts 19 min. Method for assay determination of albendazole/levamisole lasts 7 min, while duration of method for impurities determination is 9 min.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Samostalni kolegij Industrijska farmacija
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika

Tamara Milekić

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu uspješno su razvijene metode za određivanje sadržaja i onečišćenja febantela/pirantela/prazikvantela te albendazola/levamisola po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD). Forsirana razgradnja provedena je na temeljnoj standardnoj otopini pojedinog anthelmintika kako bi se vidjela potencijalna onečišćenja. Ispitana je osjetljivost anthelmintika na temperaturu, oksidans, kiselinu, lužinu i svjetlost (pirantel). Nakon što su definirani uvjeti kojima se postiže 10-30% razgradnih produkata forsirana razgradnja je provedena prema najblažim uvjetima na otopinama febantela/pirantela/prazikvantela i albendazola/levamisola kako bi se procjenila učinkovitost razvijenih metoda. Metode su razvijene na BEH C18 koloni (100 x 2,1 nm, 1,7 μm) na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti. Optimalni pH za odjeljivanje sastavnica uzorka dobiven je programskim paketom Marvin Benas, a metode su razvijene koristeći programski paket DryLab koji na temelju unesenih podataka stvara virtualne kromatograme i predviđa kromatografske parametre pojedine sastavnice uzorka. Trajanje metode za određivanje sadržaja febantela/pirantela/prazikvantela je 10 min, a za određivanje onečišćenja 19 min, dok je za određivanje sadržaja albendazola/levamisola potrebno 7 min, a za određivanje onečišćenja 9 min.

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

Rad sadrži: 79 stranica, 37 grafičkih prikaza, 41 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: febantel, pirantel, prazikvantel, albendazol, levamisol, UPLC, QbD

Mentor: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sanja Radman, *PLIVA Istraživanje i razvoj*.

Rad prihvaćen: lipanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Independent course Industrial pharmacy
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Development of UPLC method using quality by design (QbD) approach for multicomponent systems of anthelmintic active pharmaceutical ingredients

Tamara Milekić

SUMMARY

The aim of this study was to develop UPLC method for assay and impurities determination of febantel/praziquantel/pyrantel and albendazole/levamisole using quality by design approach (QbD). Stock solutions were exposed to the influence of temperature, oxidizing agent, acid, base and light (pyrantel) in order to achieve 10-30% degradation products so the potential impurities could be detected. After defining the forced degradation conditions, febantel/pyrantel/praziquantel solution and albendazole/levamisole solution were exposed to the mildest conditions. Based on the collected results, efficacy of separating the components using developed methods was evaluated. Methods were successfully developed using BEH C18 column (100 x 2,1 nm, 1,7 μm) on ultra-performance liquid chromatograph. Optimal pH for separating the components was determined using Marvin Beans software, while methods were developed using DryLab software. Based on the input data, DryLab creates virtual chromatograms and predicts chromatographic parameters for each component. Duration of method for assay determination of febantel/pyrantel/praziquantel is 10 min, while method for impurities determination lasts 19 min. Method for assay determination of albendazole/levamisole lasts 7 min, while duration of method for impurities determination lasts 9 min.

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

Thesis includes: 79 pages, 37 figures, 41 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: febantel, pyrantel, praziquantel, albendazole, levamisole, UPLC, QbD

Mentor: **Biserka Cetina-Čižmek**, **Ph.D.** *Senior Research Scientist,* PLIVA Research and development

Reviewers: **Biserka Cetina-Čižmek**, **Ph.D.** *Senior Research Scientist,* PLIVA Research and development

Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sanja Radman, **Ph.D.** PLIVA Research and development

The thesis was accepted: June 2015.