

Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu razgradnih produkata lijeka elvitegravira

Lasić, Zlata

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:618530>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Zlata Lasić

**RAZVOJ METODE TEKUĆINSKE
KROMATOGRFIJE ULTRAVISOKE
DJELOTVORNOSTI ZA ANALIZU
RAZGRADNIH PRODUKATA LIJEKA
ELVITEGRAVIRA**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u TAPI Pliva R&D Analitika pod mentorstvom prof. dr. sc.
Nives Galić i neposrednim voditeljstvom dipl. kem. inž. Mislava Runje.

Zahvale

Hvala prof. dr. sc. Nives Galić na mentorstvu i pomoći prilikom pisanja diplomskog rada.

Veliko hvala neposrednim voditeljima Mislavu Runji, dipl. kem. inž. i Luki Jeriću, inž. kem. na pruženoj prilici, prenošenju znanja, iskustava i pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Hvala mojoj Analitici, mojim kolegama, koji su mi pomagali na bilo koji način. Hvala na ugodnoj atmosferi, smijehu, savjetima i podršci. Posebno hvala Ruški i Mirni. Također, hvala i mojoj Ani na prijateljstvu te velikoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala dragim kolegama i kolegicama u Splitu i Zagrebu koji su svojim društvom uljepšali protekle godine studiranja i učinili studentske dane uistinu prekrasnim razdobljem. Posebno hvala mojoj prijzi Anđeli na velikom prijateljstvu, smijehu i suzama, nesebičnoj pomoći i vjeri u mene. Prijo, zajedno smo jače.

Hvala svim prijateljima, a najviše hvala Mariji, Gabi i Em Si, mojim prijateljicama još od školskih klupa koje su uvijek bile uz mene, radovale se mojim uspjesima i bile velika podrška. Hvala vam što ste pokazale što znači biti pravi prijatelj. Uz vas je sve lakše.

I na kraju, najveće hvala mojoj dragoj obitelji, mojim roditeljima, bratu i sestri. Hvala na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjerneoj vjeri u moj uspjeh. Hvala roditeljima na žrtvi i odricanju čime su mi omogućili lijep i lagodan studentski život.

Mama i tata, hvala za sve. Ovo je za vas.

Sadržaj

SAŽETAK	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Elvitegravir	2
2.1.1. <i>HIV.....</i>	3
2.2. Kromatografija	4
2.2.1. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....</i>	5
2.2.2. <i>Kromatografski parametri.....</i>	6
2.2.3. <i>Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....</i>	8
2.3. Spektrometrija masa.....	9
2.3.1. <i>Dijelovi spektrometra masa.....</i>	9
2.4. Program DryLab.....	11
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Popis polaznog materijala i kemikalija	13
3.2. Priprema mobilnih faza i diluenta.....	15
3.3. Priprema otopina za UHPLC analizu	16
3.4. Priprema otopina za forsiranu razgradnju	17
3.5. Uvjeti mjerenja za UHPLC analizu.....	18
3.6. Program DryLab.....	25
3.7. Uvjeti mjerenja za 2D-LC-MS analizu	26
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. Rezultati UHPLC analize.....	27
4.2. Rezultati DryLab analize	34
4.3. Rezultati forsirane razgradnje	39
4.4. Rezultati 2D-LC-MS analize.....	42
§ 5. ZAKLJUČAK.....	45
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	46
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	48
§ 8. DODATAK	VIII
8.1. Rezultati UHPLC analize.....	viii
8.1.1. <i>Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$.....</i>	viii

8.1.2. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$	x
8.1.3. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$	xii
8.1.4. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$	xiv
8.1.5. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$	xvi
8.1.6. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$	xviii
8.1.7. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$	xx
8.1.8. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$	xxii
8.1.9. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$	xxiv
8.1.10. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$	xxvi
8.1.11. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$	xxviii
8.1.12. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$	xxx
8.2. MS/MS spektri razgradnih produkata lijeka elvitegravira	xxxii
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

RAZVOJ METODE TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE ULTRAVISOKE DJELOTVORNOSTI ZA ANALIZU RAZGRADNIH PRODUKATA LIJEKA ELVITEGRAVIRA

Zlata Lasić

Elvitegravir je inhibitor HIV-1 integraze koji se u kombinaciji s drugim lijekovima koristi za liječenje virusa humane imunodeficijencije (HIV). Ispitivanje čistoće lijeka uključuje analitičke metode kojima je cilj detekcija, identifikacija, strukturna karakterizacija i kvantitativno određivanje onečišćenja. U ovom radu razvijena je brza i učinkovita metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) za analizu onečišćenja i razgradnih produkata lijeka elvitegravira. U svrhu optimizacije kromatografskih uvjeta (vremenskog gradijenta, temperature kolone i pH vrijednosti) koristio se računalni program DryLab. Za analizu razgradnih produkata, nastalih forsiranom razgradnjom, koristio se vezani sustav LC-MS/MS. Na temelju analize MS i MS/MS spektara pretpostavljene su strukture razgradnih produkata i način njihove fragmentacije.

(49 + XXXVI stranica, 28 + 56 slika, 20 tablica, 25 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: elvitegravir, forsirana razgradnja, MS/MS, onečišćenja, razgradni produkti, UHPLC

Mentor: prof. dr. sc. Nives Galić
Neposredni voditelj: Mislav Runje, dipl. kem. inž.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
 2. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič
 3. izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2018



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ANALYSIS OF ELVITEGRAVIR DEGRADATION PRODUCTS

Zlata Lasić

Elvitegravir is an HIV-1 integrase inhibitor and in combination with other drugs is used to treat a human immunodeficiency virus (HIV). The drug purity testing includes analytical methods aimed at detection, identification, structural characterization and quantitative determination of impurities. In this testis, a fast and efficient ultrahigh performance liquid chromatography (UHPLC) method for the analysis of pollution and degradation products of elvitegravir has been developed. Software DryLab has been used for optimizing of the chromatographic conditions: time gradient, column temperature and pH value. The LC-MS / MS coupled system has been used for analysis of the degradation products caused by forced degradation. By analysis of the obtained MS and MS/MS spectra, the structure of the degradation products and their fragmentation has been assumed.

(49 + XXXVI pages, 28 + 56 figures, 20 tables, 25 references, original in croatian)

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

Keywords: elvitegravir, MS/MS, degradation products, forced degradation, impurities, UHPLC

Mentor: Prof. Dr. Nives Galić

Assistant mentor: Mislav Runje, dipl. chem. ing.

Reviewers:

1. Prof. Dr. Nives Galić
 2. Dr. Ines Primožič, Associate Professor
 3. Dr. Biserka Prugovečki Associate Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 21th February 2018

Zlata Lasić

Diplomski rad

§ 1. UVOD

Kako bi korištenje lijeka bilo sigurno potrebno je poznavati onečišćenja koja se u njemu nalaze. Onečišćenja u lijekovima neželjene su tvari koje uz aktivnu farmaceutsku supstanciju mogu nastati uslijed proizvodnje lijeka ili njegovom razgradnjom. Ona mogu biti toksična i kancerogena te uzrokovati nuspojave i utjecati na aktivnost i stabilnost lijeka. Zbog toga su zakonom propisane granice za sve vrste onečišćenja i dane zakonske regulative koje zahtijevaju strogu kontrolu lijekova. Ispitivanja čistoće lijeka uključuju primjenu analitičkih metoda za detekciju, identifikaciju, strukturnu karakterizaciju i kvantitativno određivanje onečišćenja.¹

Aktivna farmaceutska tvar elvitegravir je inhibitor HIV-1 integraze.² U kombinaciji s drugim lijekovima koristi se za liječenje HIV-1 infekcije. Za analizu elvitegravira koristi se tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa.^{3,4}

U ovom radu razvijena je metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti za analizu onečišćenja i razgradnih produkata lijeka elvitegravira. Pomoću računalnog programa DryLab dobiveni su optimalni uvjeti metode: temperatura kolone, vrijeme gradijentnog eluiranja i pH mobilne faze. Ti uvjeti korišteni su za UHPLC i 2D-LC-MS analizu razgradnih produkata elvitegravira forsiranom razgradnjom. Forsirana razgradnja provodila se u lužini, kiseline, peroksidu te zagrijavanjem. Analizom rezultata dobivenih tehnikom 2D-LC-MS/MS pretpostavljene su strukture razgradnih produkata te njihova fragmentacija.

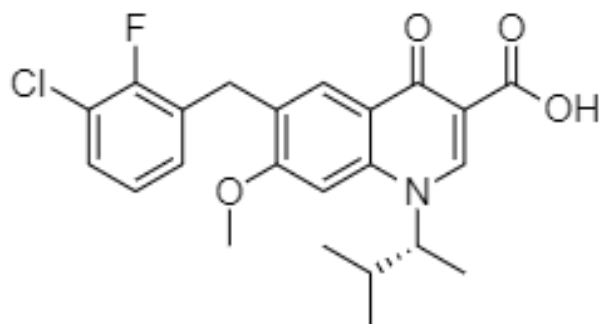
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Elvitegravir

Elvitegravir (ELV) je aktivna farmaceutska tvar koja se u kombinaciji s drugim lijekovima koristi za liječenje HIV-1 infekcije. Molekulska formula ELV-a je $C_{23}H_{23}ClFNO_5$, a njegova molarna masa iznosi $447,883 \text{ g mol}^{-1}$ (slika 1).

Gotovo 5000 ljudi svakog dana umre od posljedica infekcije virusom humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*, HIV), a zarazi se približno 7200 ljudi. Kombinirana upotreba lijekova dio je visokokomponentne antiretrovirusne terapije (engl. *Highly active antiretroviral treatment*, HAART) za liječenje HIV-1 infekcije. Pomoću HAART terapije replikacija virusa HIV-1 značajno je smanjena.^{5,6}

Elvitegravir je inhibitor HIV-1 integraze.² Integracija je prepoznatljiv i bitan proces infekcije virusom HIV-1. HIV-1 integraza je jedan od tri glavna enzima virusa HIV-1 i neophodan je za ugradnju provirusne DNA HIV-1 u genom stanice domaćina.⁷ Inhibitori integraze ne sprječavaju ulazak virusa u stanicu, već onemogućuju ugradnju virusnog genoma u genom stanice domaćina te u kombinaciji s drugim lijekovima mogu pridonijeti sprječavanju daljnjeg razvoja bolesti, smanjiti njene simptome, te produžiti životni vijek bolesnika.^{5,8}



Slika 1. Struktura Elvitegravira

2.1.1. HIV

Otkrićem i upotrebom antibiotika, u razdoblju nakon drugog svjetskog rata, zarazne su bolesti izgubile značaj kakav su imale kroz povijest. U zadnjim desetljećima dvadesetog stoljeća pojavili su se novi izazovi, prvenstveno u obliku virusnih patogena, među kojima je i HIV.⁹

HIV pripada lentivirusima, podskupini porodice Retroviridae, retrovirusa, koji uzrokuju spore infekcije i imaju dugu inkubaciju te je uzročnik stečenog sindroma imunodeficijencije (engl. *Acquired Immunodeficiency syndrome*, AIDS).¹⁰ Do danas su HIV i AIDS jedni od najvećih zdravstvenih problema u svijetu, koji su odnijeli više od 25 milijuna života, a trenutno s tim virusom živi 36,7 milijuna osoba.^{7,11}

HIV ima sferni oblik te sadrži dva identična lanca RNA i enzime nužne za replikaciju virusa i formiranje novih virona: reverznu transkriptazu (RT), integrazu (p32) i proteazu. Ovijen je lipidnim omotačem koji na svojoj površini ima glikoproteinske izdanke gp 120 i gp 41. Nakon ulaska virusa u citoplazmu stanice, virusna reverzna transkriptaza prevodi jednolančanu genomsku RNA u dvolančanu DNA. Nastala provirusna DNA pomoću virusne integraze ugrađuje se u stanični genom jezgre.¹⁰

Postoje dva tipa virusa: HIV-1 i HIV-2. Oba tipa virusa potječu iz središnje Afrike. Istraživanja pokazuju da HIV-1 potječe od virusa imunodeficijencije majmuna (engl. *Simian immunodeficiency virus*, SIV) koji izaziva imunodeficijenciju čimpanza. Pretpostavlja se da je evolucijski prijelaz s čimpanzi na ljude trajao nekoliko stotina godina.¹²

HIV-1 infekcija započinje ulaskom virusa u organizam seksualnim putem, preko inficirane krvi, vertikalnim prijenosom s majke na dijete putem placente ili dojenjem. HIV-1 ulaskom u krv inficira specifičnu vrstu bijelih krvnih stanica, T-limfocite koji na svojoj površini imaju CD4 proteine, koji su receptori za virus. Virus se množi, uništava ih i postepeno dolazi do slabljenja imuniteta te pojave različitih infekcija i tumora.⁷

Liječenje HIV-1 infekcija vrlo je učinkovito. U liječenju se koristi HAART terapija koja se pokazala djelotvornom u kontroliranju progresije virusa.¹³ Glavni cilj primjene antivirusnih lijekova je poboljšanje kvalitete života bolesnika i produljenje životnog vijeka. Prevencija se odnosi na promjenu seksualnih navika i obavezno testiranje krvi davatelja.

2.2. Kromatografija

Kromatografija je široko primjenjiva metoda koja omogućuje razdvajanje, identifikaciju i određivanje spojeva u smjesi. Najčešće je korištena analitička tehnika u farmaceutskoj industriji.

Sustav za kromatografsko razdvajanje sastoji se iz dvije faze, mobilne (pokretne) i stacionarne (nepokretne) faze. Uslijed kromatografskih analiza mobilna faza nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu, a razdvajanje komponenti temelji se na njihovim različitim brzinama kretanja kroz stacionarnu fazu.¹⁴

S obzirom na pojedina svojstva, kromatografske tehnike mogu se podijeliti na više načina. Uobičajene su tri podjele: prema agregatnom stanju pokretne faze, prema obliku kromatografske podloge i prema fizikalno-kemijskim procesima.

Osnovna podjela prema obliku kromatografske podloge je na plošnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu.

S obzirom na agregatno stanje pokretne faze, kromatografske tehnike dijele se na: tekućinsku kromatografiju (pokretna faza tekućina), plinsku kromatografiju (pokretna faza plin) i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (pokretna faza fluid).¹⁵

Prema fizikalno-kemijskim procesima, odnosno prema mehanizmu odvajanja kromatografija se dijeli na: adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu, ionsko-izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem (tablica 1).

Tablica 1. Podjela kromatografije prema mehanizmu odjeljivanja

Vrsta kromatografije	Mehanizam odvajanja
Adsorpcijska kromatografija	Različita adsorpcija sastojaka uzorka na površini čvrstog adsorbensa
Razdjelna kromatografija	Razlika u topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi (plinska kromatografija); razlika u topljivosti sastojaka uzorka u pokretnoj i nepokretnoj fazi (tekućinska kromatografija)
Afinitetna kromatografija	Specifične biološke interakcije analita i liganda na nepokretnoj fazi
Ionsko-izmjenjivačka kromatografija	Razlika u afinitetu sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni
Kromatografija isključenjem	Isključenje na temelju razlika u veličini i/ili obliku molekula

2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) najšire je korištena kromatografska metoda zahvaljujući brzini i vrlo niskoj granici detekcije.¹⁴ U današnjoj farmaceutskoj industriji zauzima važnu ulogu, pri čemu se primjenjuje u fazi otkrića, razvoja i proizvodnje lijekova.¹⁶ Tehnikom HPLC provjerava se čistoća i kvaliteta lijekova te se uspješno primjenjuje za razdvajanje, kvalitativno i kvantitativno određivanje aktivne farmaceutske tvari, degradacijskih produkata, reakcijskih onečišćenja i sintetskih intermedijera.¹⁷ Također, koristi se u svrhu praćenja sintetskih reakcija u kontroli kvalitete. Razdvajanje se temelji na interakciji analita između stacionarne i mobilne faze, a razliku od tekućinske kromatografije čini primjena tlaka od 50 do 350 bara.

Uspješna primjena metode HPLC zahtijeva kombinaciju različitih uvjeta kao što su vrsta punjenja kolone i sastav pokretne faze, duljina i promjer kolone, protok pokretne faze, temperatura kolone i količina uzorka. Kako bi odabrali najbolju kombinaciju kromatografskih uvjeta, potrebno je razumjeti razne faktore koji mogu utjecati na razdvajanje.

Naime, HPLC se sastoji od jednog ili više spremnika otapala, pumpe koja omogućuje protok mobilne faze, injektora za unošenje uzorka, kolone, različitih vrsta detektora te programa za obradu podataka.

Sustav za unošenje uzoraka injektira uzorak u mobilnu fazu kontinuiranog protoka koja ga donosi na kolonu, a nakon toga na detektor. Protok mobilne faze kroz sustav može biti izokratan, što znači da je sastav mobilne faze tijekom cijelog trajanja analize istog sastava ili gradijentan, što znači da se sastav mobilne faze mijenja tijekom analize.

Dokazivanje i određivanje sadržaja provodi se primjenom različitih detektora, poput spektrofotometra, detektora s nizom fotosenzitivnih dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD), fluorescencijskog detektora (engl. *Fluorescence Detector*, FLD), elektrokemijskog detektora (engl. *Electrochemical Detector*, ED), detektora indeksa loma (engl. *Refractive Indeks Detector*, RID) ili detektora raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD).¹ Detektor je spojen na računalni sustav za obradu podataka koji pomoću električnog signala generira grafički zapis na ekranu, kromatogram. Dobar detektor osjetljiv je na niske koncentracije analita, nije osjetljiv na promjene temperature i sastav mobilne faze te osigurava linearan odgovor u širokom koncentracijskom području.

Danas se HPLC tehnika povezuje u složene sustave s nizom drugih načina dokazivanja i određivanja razdvojenih sastojaka smjese, poput vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS), nuklearne magnetske rezonancije (LCNMR) ili infracrvene spektroskopije (LC-IR) i dr.

HPLC ima niz prednosti među kojima se ističe brzina, visoka rezolucija, osjetljivost, ponovljivost, točnosti i automatiziranost, zbog čega je postala nezaobilaznom tehnikom kako u farmaceutskoj industriji, tako i u analitici općenito.

2.2.2. Kromatografski parametri

Prilikom razvoja kromatografske metode postoji niz parametara koje treba optimizirati kako bi se postigli željeni rezultati. Također, poznato je da je sastavni dio svake metode ispitivanje prikladnosti sustava u svrhu osiguravanja valjanog provođenja kromatografskog postupka. Razdvajanje komponenti smjese tekićinskom kromatografijom ovisi o prirodi sastojaka, pH-

vrijednosti mobilne faze, punilu kolone, protoku, volumenu injektiranja, temperaturi kolone te tlaku.

Kromatogram je grafički prikaz odziva detektora u ovisnosti o volumenu ili vremenu. Položaj kromatografskog pika koristi se za kvalitativnu, a visina odnosno površina pika za kvantitativnu analizu.¹⁸

Jedan od glavnih parametara je vrijeme zadržavanja (t_R) koje daje kvalitativne informacije o analiziranom spoju. Vrijeme zadržavanja je vrijeme potrebno analiziranom spoju da nakon injektiranja dođe do detektora. Često se koristi prilagođeno vrijeme zadržavanja (t'_R), a ono predstavlja razliku vremena zadržavanja i vremena zadržavanja nezadržavanog sastojka (t_M).

Vrijeme potrebno analiziranom spoju da prođe kroz kolonu ovisi o faktoru zadržavanja (k), koji predstavlja omjer vremena koje sastojak provede u nepokretnoj fazi i vremena u kojemu putuje u pokretnoj fazi.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Parametri procjene djelotvornost kolone su razlučivanje (R_S) i faktor razdvajanja (α). Razlučivanje predstavlja mjeru djelotvornosti separacije dvaju kromatografskih pikova. Ukoliko je veće od 1,5 utoliko su dva susjedna pika na baznoj liniji odijeljeni. Računa se prema jednadžbi (2) gdje je su w_{b1} i w_{b2} širine pikova pri osnovici.

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (2)$$

Faktor razdvajanja je mjera razdvajanja dva spoja, pokazuje kako će dobro kromatografska kolona razdvojiti te spojeve i prema dogovoru, vrijednost mu je uvijek veća od 1.¹⁸

Djelotvornost kolone se izražava brojem teorijskih tavana (N) i njihovom visinom (H). Broj teorijskih tavana je broj uspostavljenih ravnoteža između mobilne i stacionarne faze, a računa se prema jednadžbi (3).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (3)$$

Djelotvornost kolone može se povećati smanjenjem visine tavana i povećanjem broja teorijskih tavana. Visina tavana predstavlja omjer dužine kolone (L) i broja teorijskih tavana (4).

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

Važan parametar je i odabir pogodnih otapala za mobilnu fazu. Treba uzeti u obzir polarnost otapala i pH-vrijednost koja bi trebala biti dvije jedinice oko pK_a analita.

2.2.3. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC) modificirani je oblik HPLC-a. UHPLC instrumenti mogu podnijeti tlakove do 10^8 Pa što je dvostruko veće u odnosu na HPLC instrumente. Veličine čestica kolone promjera su manjeg od 2 μm . Zbog malih veličina čestica otopine koje se koriste za mobilne faze moraju biti ultračiste. Razvoj UHPLC tehnike donosi velike prednosti pred HPLC tehnikom. Kao što je primjerice potrošnja reagensa, vrijeme analize te je omogućeno bolje razlučivanje između pikova, povećana je selektivnost te osjetljivost metode.

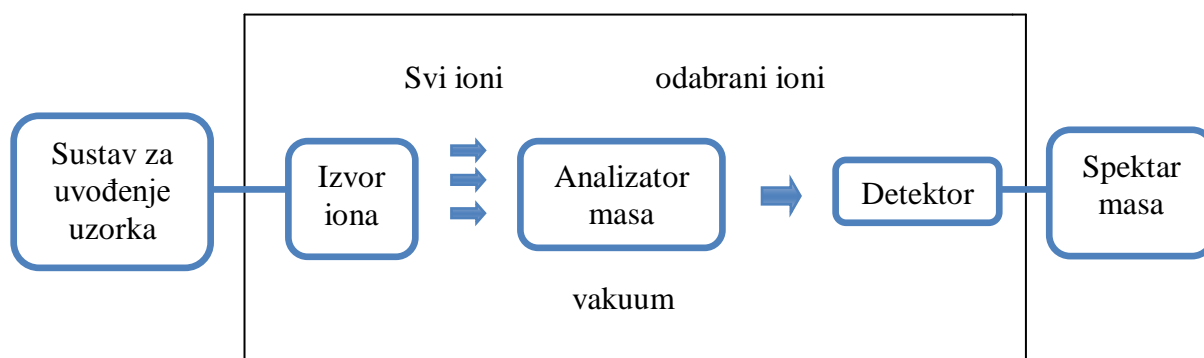
2.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (MS) analitička je tehnika kojom se molekule ioniziraju, nakon čega se ioni odvajaju na temelju omjera njihove mase i naboja. Na ovaj način određuje se molekulska masa spoja, molekulska formula i struktura molekule. Koristi se za identifikaciju i kvantifikaciju farmaceutskih aktivnih tvari te njihovih razgradnih produkata.

Spektrometrija masa uključuje dva procesa. U prvom procesu dolazi do ionizacije uzorka, dok se u drugom provodi razdvajanje i identifikacija iona. Ova metoda je izrazito osjetljiva pri čemu je moguće analizirati volumene uzorka manje od 10 μL . Jedna od prednosti ove metode je mogućnost sprežavanja s drugim analitičkim tehnikama. Od velike važnosti za analizu i identifikaciju farmaceutskih spojeva je i mogućnosti povezivanja tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa (LC-MS).¹⁹

2.3.1. Dijelovi spektrometra masa

Spektrometar masa sastoji se od tri dijela: ionskog izvora, analizatora masa i detektora (slika 2).



Slika 2. Osnovni dijelovi spektrometra masa

U ionskom izvoru molekule se ioniziraju na različite načine. Prilikom ionizacije mogu nastati pozitivno i negativno nabijeni ioni, ali se najčešće prate samo pozitivni ioni, odnosno kationi. Postoje različiti postupci ioniziranja, a najviše se primjenjuju ionizacija elektronima i kemijska ionizacija. Molekulski ioni nastali ionizacijom elektronima često fragmentiraju na manje ione. Na temelju fragmentnih iona moguće je odrediti strukturu molekule. Kemijska

ionizacija predstavlja ionizaciju reakcijom molekula uzorka s ionima nastalim u nekom drugom procesu. Budući da se koristi manja energija nego u ionizaciji elektronima, veća je vjerojatnost određivanja molekulske mase, jer je vjerojatnije dobivanje molekuskog iona.²⁰

Još jedan način ionizacije je bombardiranje brzim atomima (engl. *Fast Atom Bombardment*, FAB). Ovom tehnikom se uzorak bombardira snopom atoma, prilikom čega dolazi do izbijanja iona iz analiziranog uzorka. Koristi se za analizu uzoraka u čvrstom stanju.

Najvažnija tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS je ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI). Ova tehnika ima širok spektar primjene ovisno o prirodi analiziranog uzorka na polarne, nepolarne spojeve te termički nestabilne spojeve.²¹

Razdvajanje iona različitih masa odvija se u analizatoru masa. Prilikom prolaska kroz magnetno polje, ioni se odvajaju na temelju njihovih omjera mase i naboja. Od analizatora najvažniji su analizatori masa koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of flight*, TOF) i kvadrupolni analizator masa. Analizator koji mjeri vrijeme leta razdvaja ione na temelju vrijednosti odnosa mase i naboja, ali i brzine. Ioni s većim omjerom mase i naboja putuju sporije od onih s manjim omjerom, iako je početno ubrzanje za sve ione isto. Razdvajaju se u cijevi kad ne djeluje električno polje te se masa iona računa na temelju vremena koje je potrebno da od izvora dođu na detektor.

Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri elektrode koje stvaraju oscilirajuće električno polje. Dvije suprotne elektrode pozitivno su nabijene, a druge dvije negativno. Ioni koji nastaju u ionizacijskoj komori dovode se u prostor između elektroda te se primjenjuje kombinacija izmjeničnog i radiofrekventnog potencijala. Ioni, s određenom vrijednošću omjera mase i naboja, rezoniraju s kvadrupolnom frekvencijom i usmjeravaju se ka detektoru. Kvadrupolni analizatori mogu se spojiti u seriju.

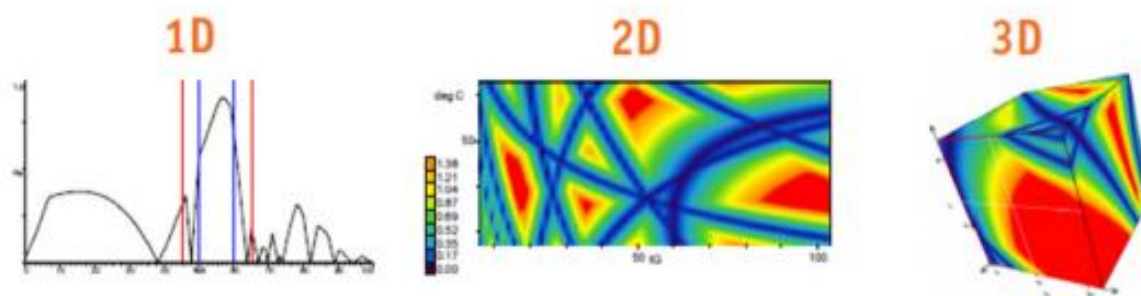
Detektor je zadnji dio masenog spektrometra i u njega dolaze samo određeni ioni koji prođu analizator masa. Zbog malog broja iona koji uspije proći kroz analizator masa, nužno je pojačati signale koje daje detektor. Najpoznatiji detektori su Faradayev cilindar, fotografska ploča te multiplikatori elektrona.

2.4. Program DryLab

Drylab je softverski program koji se koristi prilikom razvoja i optimizacije HPLC i UHPLC metoda u analitičkoj kemiji.²² Korištenjem ovog programa ubrzava se i poboljšava efikasnost analize. Određuju se eksperimentalni parametri poput pH-vrijednosti mobilne faze, protoka pokretne faze, temperature kolone, načina i trajanja eluiranja. Vrijeme rutinske analize smanjuje se te se omogućava bolja rezolucija na kromatografskoj koloni. Prvi korak, u korištenju ovog programa, definiranje je ciljanog analitičkog profila, nakon čega DryLab softverski program predlaže sistematični pristup i početne uvjete metode.

Ciljani analitički profil određuje se nakon nekoliko provedenih eksperimenata. Potrebno je mijenjati jedan ili više parametara te proučavati retencijska vremena komponenti u određenom uzorku. Nakon analiza, u softver je potrebno unijeti površine signala komponenti uzorka i retencijska vremena. Važno je imati konstantan volumen uzorka tijekom analize, zbog automatskog prepoznavanja pikova u DryLab programu. Moguće su pogreške u softveru koje su posljedica velikog broja komponenti te slične površine.²³ Najčešće se mijenjaju temperatura kolone, vrijeme analize i pH-vrijednost pokretne faze, čime se dobiva trodimenzionalni prikaz ovisnosti jednog parametra o druga dva.²⁴

Pored trodimenzionalnog prikaza ili 3D, koriste se i 2D (dvodimenzionalni prikaz) te 1D (jednodimenzionalni prikaz) (slika 3). Dvodimenzionalni grafički prikaz predstavlja dvodimenzionalni graf ovisnosti promjene dva parametra, dok je 1D prikaz promjene jednog parametra na y-osi. Trodimenzionalni prikaz je najčešće korišteni prikaz u obliku kocke, gdje se preko njene površine očitavaju kritične vrijednosti. Takav prikaz pruža više informacija o rezoluciji i selektivnosti uvjeta prilikom razdvajanja pikova. Plavo obojene površine predstavljaju mjesta gdje je rezolucija kritična, tj. gdje su moguća preklapanja pikova ili neki drugi problemi u analizi, dok crveno obojene površine znače dobre uvjete za razdvajanje pikova.²⁵



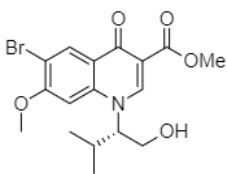
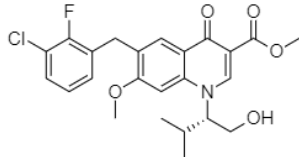
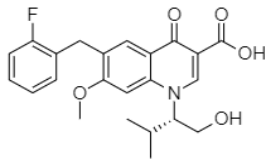
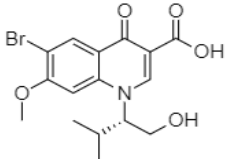
Slika 3. Grafički prikaz 1D, 2D i 3D kritičnih rezolucija²⁵

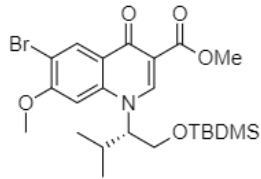
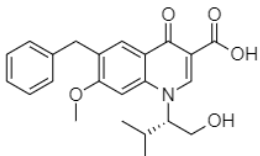
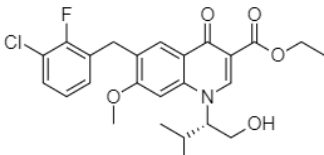
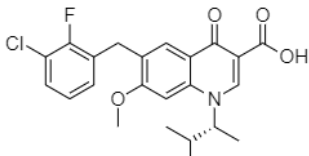
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Popis polaznog materijala i kemikalija

Polazni materijali sintetizirani su i dobiveni bez prethodnog pročišćavanja. Strukture ELV i ostalih 7 poznatih onečišćenja nalaze se u tablici 2, a popis korištenih kemikalija nalazi se u tablici 3.

Tablica 2. Popis i strukture analiziranih spojeva

Oznaka uzorka	Kratica	Struktura	Proizvođač
OF-3095-21	ON 1		TAPI Pliva Hrvatska
OF-3095-89-K	ON 1a		TAPI Pliva Hrvatska
DŠ 144/XVI	ON 1b (DeCl ELV)		TAPI Pliva Hrvatska
OF-3095-18	ON 2		TAPI Pliva Hrvatska

OF-3095-37-K	ON 3		TAPI Pliva Hrvatska
OF-3095-107-K	ON 3b		TAPI Pliva Hrvatska
OF-3095-149-K	ON 7a		TAPI Pliva Hrvatska
OF-3095-27	ELV		TAPI Pliva Hrvatska

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Proizvođač	CAS broj*	Rok valjanosti
KH₂PO₄	J. T. Baker	0000028739	09/2020
ACN	J. T. Baker	1708008005	05/2019
HCl	Sigma-Aldrich	07102-1L	01/2018
NaOH	Kemika	14525 06	11/2020
30 % H₂O₂	Merck	1.07298.1000	4/2018
NH₄HCO₃	Fluka	17843-50G	02/2022

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

3.2. Priprema mobilnih faza i diluenta

Kao mobilna faza A pripremljeni su puferi. Pripremljena je po 1 litra pufera koncentracije 10 mmol L^{-1} pH-vrijednosti 2,1, 6,8 i 8,9. Odvagano je 1,37g KH_2PO_4 na *Ohaus explorer* vagi i do oznake nadopunjeno MiliQ (engl. *Ultrapurewater*) vodom. Vrijednost pH mjerena je na *Metrohm 781* pH-metru, a pomoću H_3PO_4 prilagođena je na 2,1, odnosno pomoću KOH na 6,8 i 8,9. Koristilo se gradijentno eluiranje, pri čemu su puferi bili mobilna faza A dok je mobilna faza B bio acetonitril (ACN).

Kao diluent korištena je smjesa MiliQ vode, etanola (EtOH) i metanola (MeOH) u omjeru 50:25:25. Pomješano je 500 mL MiliQ vode, 250 mL EtOH i 250 mL MeOH.

3.3. Priprema otopina za UHPLC analizu

Za analizu je pripremljena otopina ELV koncentracije 1 mg mL^{-1} . Odvagano je 200 mg ELV u tikvici od 200 mL na *MettlerToledo XP205* vagi i nadopunjeno diluentom do oznake. Za otapanje je korištena ultrazvučna kupelj *Bandelin Sonorex* te vortex miješalica *IKA Vortex 4 basic*. Nadalje su pripremljene otopine 7 onečišćenja koncentracije $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Na analitičkoj je vagi *MettlerToledo UMX2* odvagano po 5 mg svakog onečišćenja u tikvicu od 25 mL i nadopunjeno diluentom. Za otapanje je korištena ultrazvučna kupelj i vortex miješalica. Također je pripremljena otopina RS koja je sadržavala $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ svih onečišćenja u otopini ELV tako što je u odmjernu tikvicu od 10 mL dodano po 500 mL prethodno pripremljenih onečišćenja te je do oznake nadopunjeno otopinom ELV i promiješano na vortex miješalici. U nastavku su pripremljene četiri otopine u odmjernim tikvicama od 10 mL koje su sadržavale različite koncentracije 6 onečišćenja u otopini ELV (tablica 4).

Sve pripremljene otopine korištene su za UHPLC analizu čiji su se rezultati koristili za razvoj metode pomoću DryLab računalnog programa.

Tablica 4. Otopine onečišćenja različitih koncentracija

Onečišćenja	IMP 1.1	IMP 1.2
ON 1a	1500 μL	100 μL
ON 2	400 μL	400 μL
ON 3b	100 μL	1500 μL
	IMP 2.1	IMP 2.2
ON 7a	1500 μL	100 μL
ON 1b	400 μL	400 μL
ON 1	100 μL	1500 μL

3.4. Priprema otopina za forsiranu razgradnju

Forsirana razgradnja provedena je na ELV pomoću 5 mol L^{-1} NaOH, 5 mol L^{-1} HCl i 30% H_2O_2 te zagrijavanjem.

5 mol L^{-1} otopina HCl pripravljena je tako što je u odmjernu tikvicu od 20 mL dodano MiliQ vode, zatim je otpipetirano 8,3 mL koncentrirane HCl digitalnom pipetom *Eppendorf Xplorer* (0,5 – 10 mL) u odmjernu tikvicu i nadopunjeno MiliQ vodom do oznake. Za pripremu 5 mol L^{-1} otopine NaOH odvagano je 20 mg NaOH u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjeno MiliQ vodom do oznake.

Pripremljene su otopine ELV koncentracije 1 mg mL^{-1} . Odvagano je 25 mg ELV u odmjernu tikvicu od 25 mL. Otapanje se provodilo u 5 mL diluenta na ultrazvučnoj kupelji. Nakon toga su otopine ELV podvrgnute forsiranoj razgradnji. U jednu je tikvicu dodano 5 mL 5 mol L^{-1} otopine HCl, u drugu 5 mL 5 mol L^{-1} otopine NaOH, u treću 5 mL 30 % H_2O_2 , a četvrta tikvica je nadopunjena diluentom do oznake. Nakon toga otopine su grijane 24 sata na $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon 24 sata, tikvice tretirane kiselinom i lužinom neutralizirane su pomoću lužine odnosno kiseline jednakog molariteta i volumena te nadopunjene diluentom do oznake. Također je pripravljena otopina ELV koncentracije 1 mg mL^{-1} , koja je služila kao provjera. Odvagano je 25 mg ELV u odmjernu tikvicu od 25 mL i nadopunjeno diluentom do oznake.

Sve pripravljene otopine korištene su za UHPLC i 2D-LC-MS analizu.

3.5. Uvjeti mjerenja za UHPLC analizu

Prethodno pripremljeni uzorci preliveni su u viala i postavljeni na UHPLC instrument, *Agilent Technologies 1290 Infinity II* s kvaternom pumpom i detektorom s nizom dioda (DAD). Prvo je provedena analiza na 3 različite kolone. Nakon toga je odabrana kolona koja je pokazala najbolje razdvajanje, *Waters Aquity UPLC BEH C18* 1,7 μm ; 2,1 mm \times 100 mm, te su napravljene analize pri različitim pH vrijednostima mobilne faze, temperaturama kolone i vremenima gradijenta. Kromatografski parametri analize ELV i njegovih onečišćenja prikazani su u tablicama od 5 do 16.

Tablica 5. Parametri prvog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Kolona i punilo	Kinetex C8 100A 1,7 μm ; 2,1 mm \times 100 mm		
Kolona i punilo	Zorbax SB-PHENYL 1,8 μm ; 2,1 mm \times 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 2,1		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	15,00	10,00	90,00
	15,10	90,00	10,00
	20,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	30 °C		

Tablica 6. Parametri drugog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 2,1		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	30,00	10,00	90,00
	30,10	90,00	10,00
	35,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	30 °C		

Tablica 7. Parametri trećeg eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 2,1		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	15,00	10,00	90,00
	15,10	90,00	10,00
	20,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

Tablica 8. Parametri četvrtog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 2,1		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	30,00	10,00	90,00
	30,10	90,00	10,00
	35,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

Tablica 9. Parametri petog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 6,8		
Eluens faza A	pufer		
Eluens faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	15,00	10,00	90,00
	15,10	90,00	10,00
	20,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	30 °C		

Tablica 10. Parametri šestog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 6,8		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	30,00	10,00	90,00
	30,10	90,00	10,00
	35,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	30 °C		

Tablica 11. Parametri sedmog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 6,8		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	15,00	10,00	90,00
	15,10	90,00	10,00
	20,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

Tablica 12. Parametri osmog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 6,8		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	30,00	10,00	90,00
	30,10	90,00	10,00
	35,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

Tablica 13. Parametri devetog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm \times 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 8,9		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	15,00	10,00	90,00
	15,10	90,00	10,00
	20,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	30 °C		

Tablica 14. Parametri desetog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 8,9		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	30,00	10,00	90,00
	30,10	90,00	10,00
	35,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 mL		
Protok	0,4 $\mu\text{L min}^{-1}$		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	30 °C		

Tablica 15. Parametri jedanaestog eksperimenta za UHPLC analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 8,9		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	15,00	10,00	90,00
	15,10	90,00	10,00
	20,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

Tablica 16. Parametri dvanaestog eksperimenta za UHPLC analizu

	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 8,9		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	90,00	10,00
	30,00	10,00	90,00
	30,10	90,00	10,00
	35,00	90,00	10,00
Volumen injektiranja	1 μL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

3.6. Program DryLab

Nakon provedenih UHPLC analiza kromatogrami su integrirani koristeći Empower računalni program te su dalje obrađeni pomoću računalnog programa DryLab. Za program DryLab koristili su se isti uvjeti kao kod UHPLC analiza opisanih u poglavlju 3.5. - temperatura kolone 30 °C i 60 °C, vrijeme trajanja analize 15 i 30 minuta te pH-vrijednosti mobilne faze 2,1, 6,8 i 8,9. Protok mobilne faze iznosio je 0,4 mL min⁻¹, a volumen injektiranja uzorka bio je 1 µL. Pomoću programa DryLab dobiven je 3D prikaz koji pokazuje ovisnost jednog parametra o druga dva. U ovom slučaju to su temperatura kolone, vremenski gradijent analize i pH-vrijednost mobilne faze. Pomoću DryLab-a dobivena je optimalna metoda za analizu ELV, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata. Na temelju podataka dobivenih programom ponovila se je UHPLC analiza.

3.7. Uvjeti mjerenja za 2D-LC-MS analizu

Analiza vezanim sustavom dvodimenzionalna tekućinska kromatografija - spektrometrija masa provedena je pomoću tekućinskog kromatografa *Agilent UHPLC 1290 Infinity* s binarnom pumpom, kolonom *Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm; 2,1 mm × 100 mm* i DAD detektorom spregnutog s *Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF LC/MS*. Mobilna faza A bila je 10 mmol L⁻¹ amonijev formijat pH vrijednosti 2,1 a mobilna faza B bila je ACN. Uvjeti analize dobiveni su pomoću DryLab metode (tablica 17).

Provedene su MS/MS analize tako da su ioni s izabranim omjerima *m/z* fragmentirani pri različitim energijama sudara (0, 10, 20 i 30 eV).

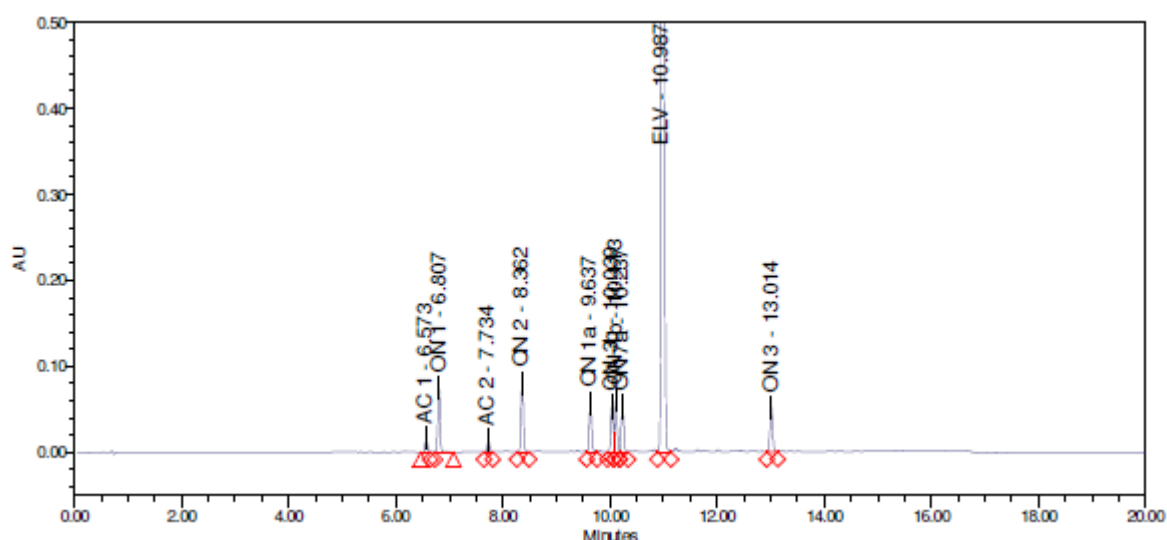
Tablica 17. Parametri eksperimenta za 2D-LC-MS analizu

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 μm; 2,1 mm 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ amonijev formijat, pH 2,1		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	94,00	6,00
	2,00	63,00	37,00
	9,33	58,93	41,07
	11,55	18,21	81,79
	13,00	18,21	81,79
	13,05	94,00	6,00
	15,00	94,00	6,00
Volumen injektiranja	1 μl		
Protok	0,8 mL min ⁻¹		
Detektor	240 nm		
Temperatura kolone	60 °C		

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

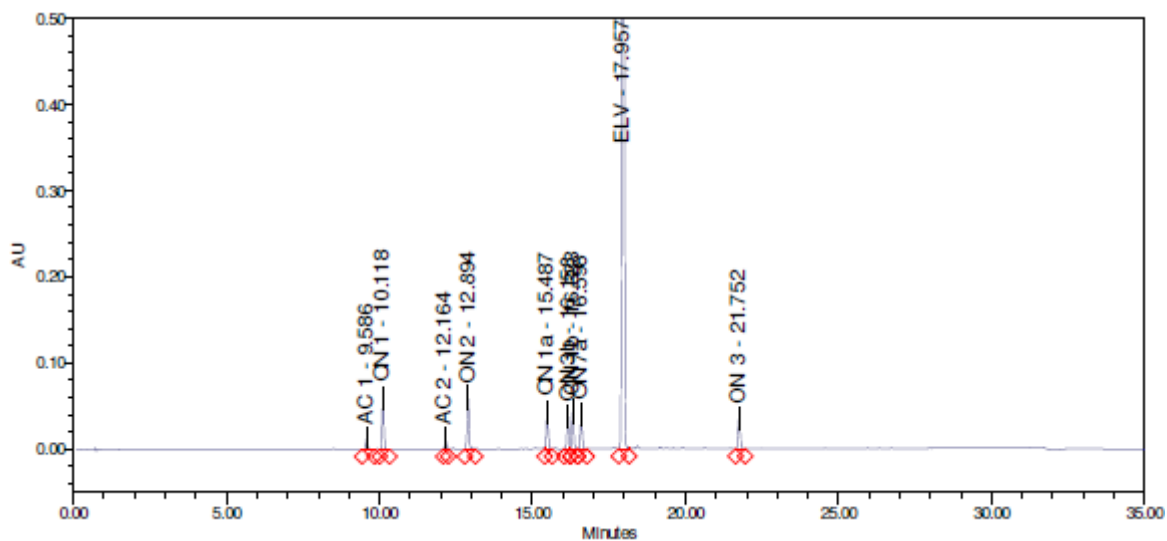
4.1. Rezultati UHPLC analize

Prvo su provedene tri UHPLC analize ELV i onečišćenja na tri različite kolone. Temperatura kolone (T) bila je $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme gradijentnog eluiranja (t) 15 minuta, a mobilna faza 10 mmol L^{-1} fosfatni pufer pH-vrijednosti 2,1. Pregledom i usporedbom kromatograma ustanovljeno je da je na koloni *Waters Aquity UPLC BEH C18* $1,7\text{ }\mu\text{m}$; $2,1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ najbolje razdvajanje ELV i onečišćenja, te se ta kolona koristila u nastavku analize, odnosno za razvoj UHPLC metode (slika 4).

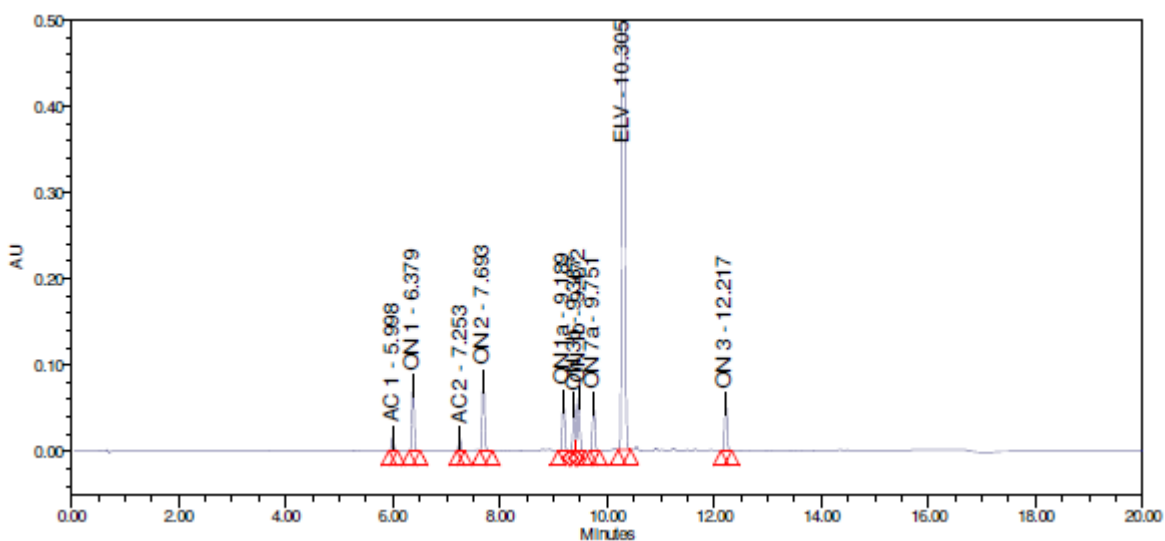


Slika 4. Kromatogram ELV i onečišćenja na koloni *Waters Aquity UPLC BEH C18* $1,7\mu\text{m}$; $2,1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ pri uvjetima $t = 15\text{ min}$, $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$

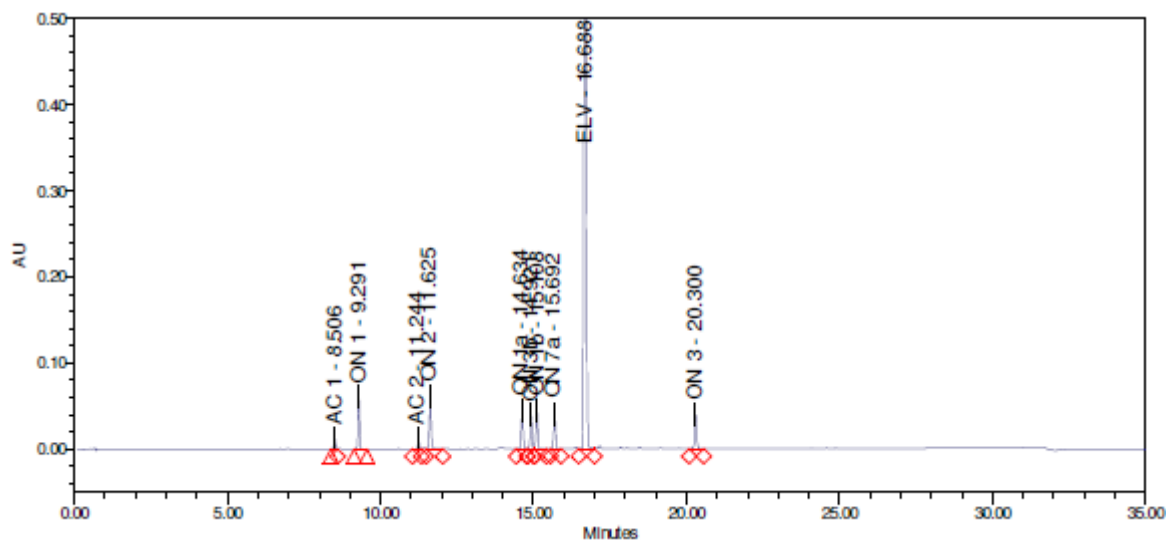
Na odabranoj koloni provedeno je 12 eksperimenata u kojima su se mijenjala tri parametra, a to su temperatura ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $60\text{ }^{\circ}\text{C}$), vrijeme gradijentnog eluiranja (15 i 30 min) i pH-vrijednost fosfatnog pufera (2,1, 6,8 i 8,9) (slike 5-15, D1-D48). Dobiveni rezultati obrađeni su pomoću računalnog programa DryLab u svrhu dobivanja 3D modela i optimalne metode za analizu ELV, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata.



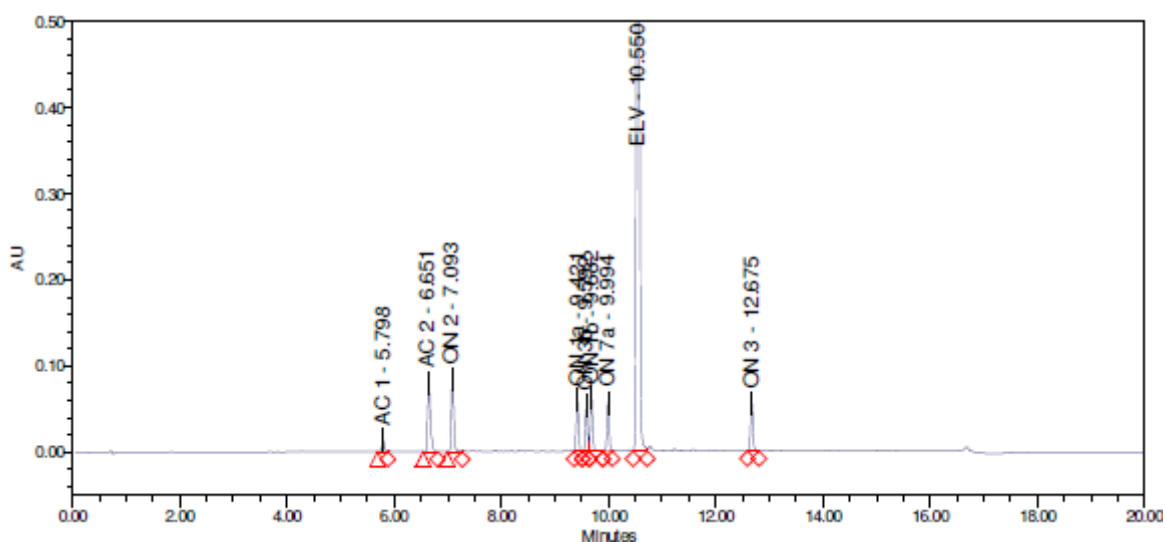
Slika 5. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i $\text{pH} = 2,1$



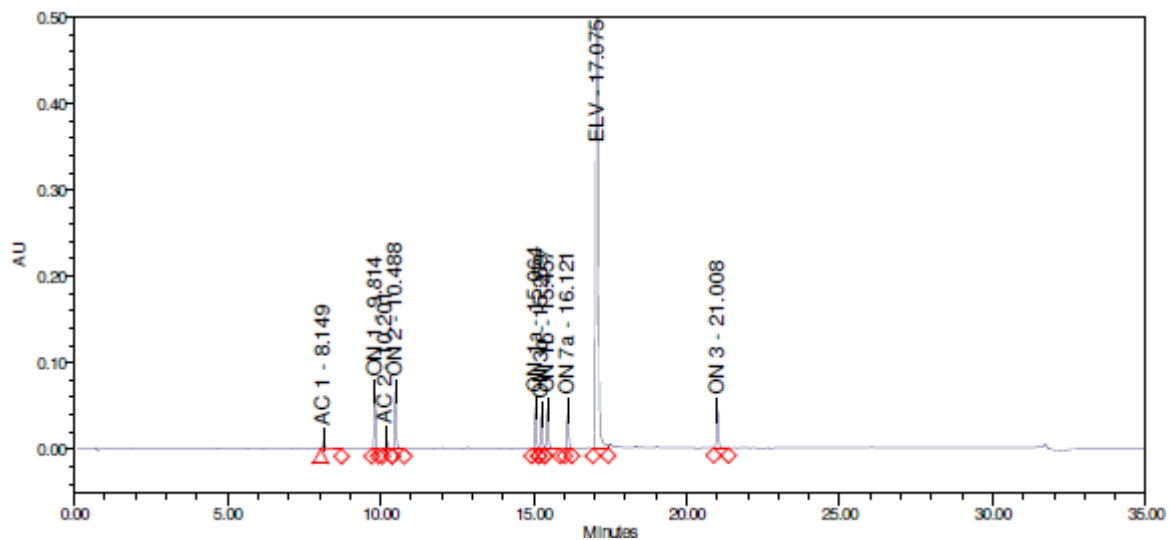
Slika 6. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$



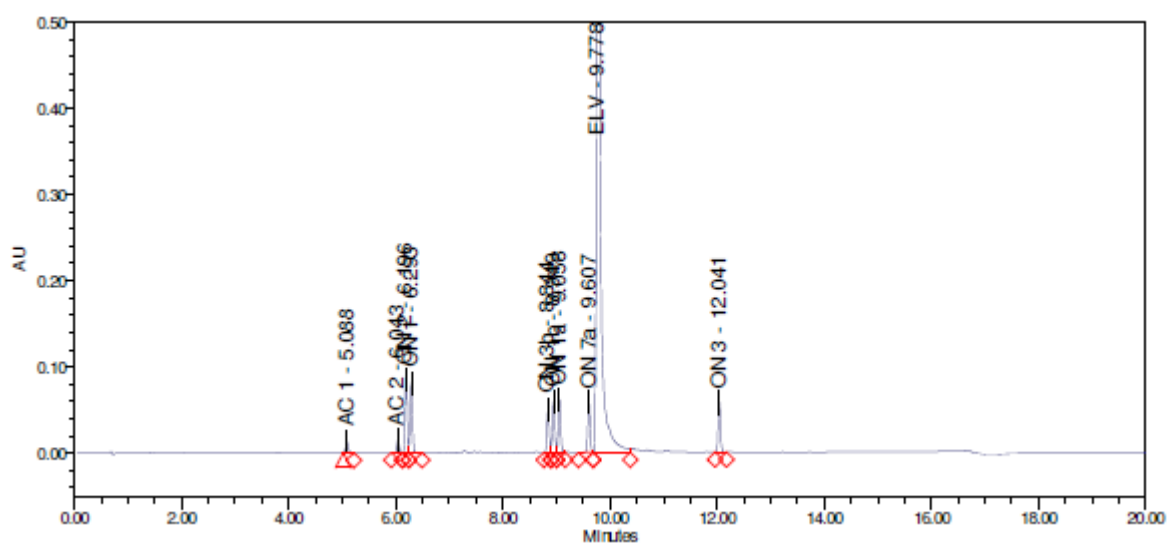
Slika 7. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$



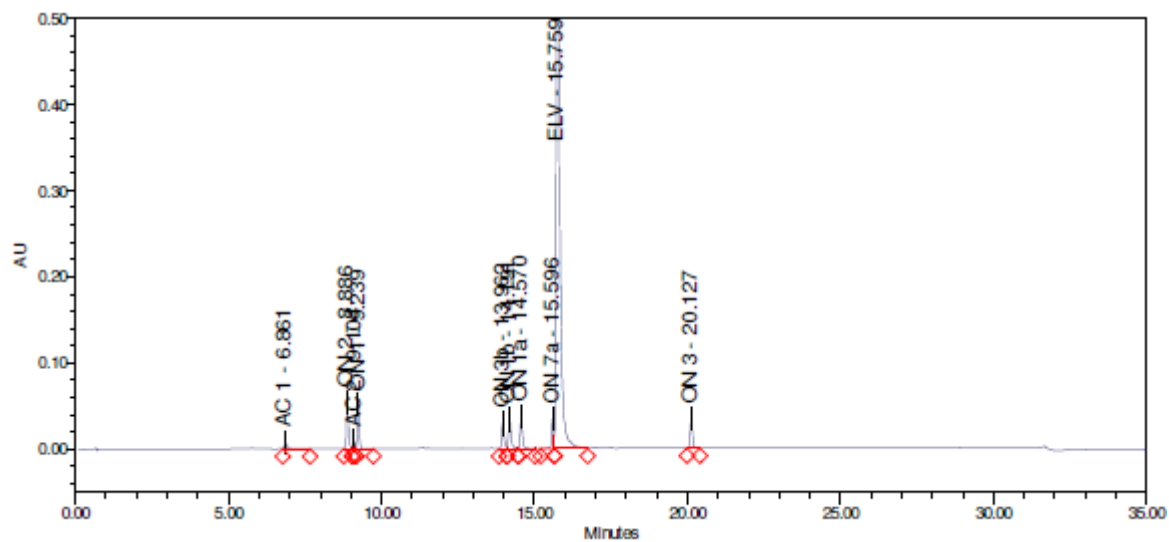
Slika 8. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i $\text{pH} = 6,8$



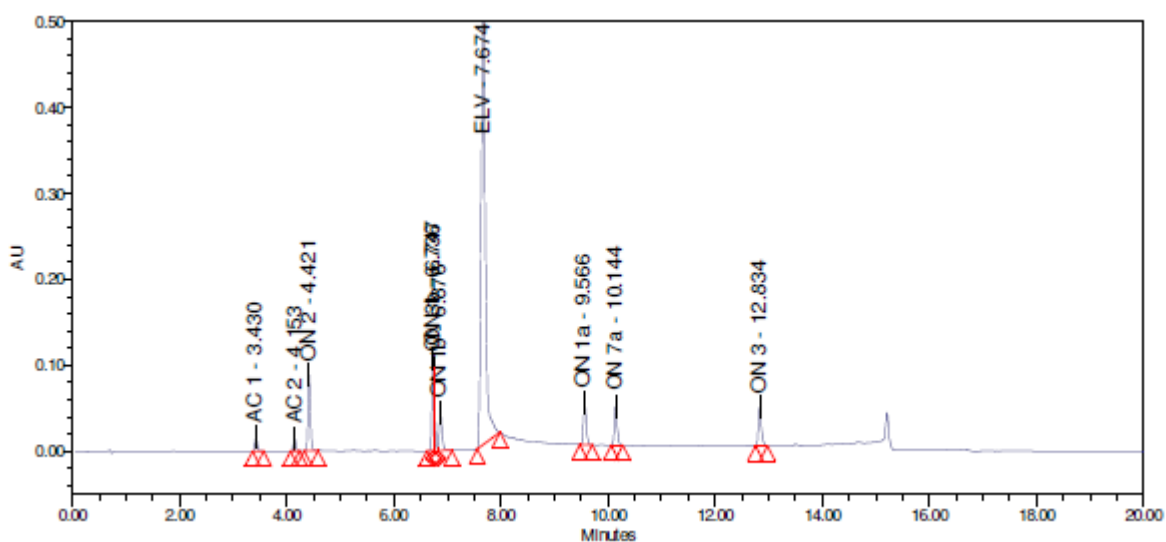
Slika 9. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 6,8



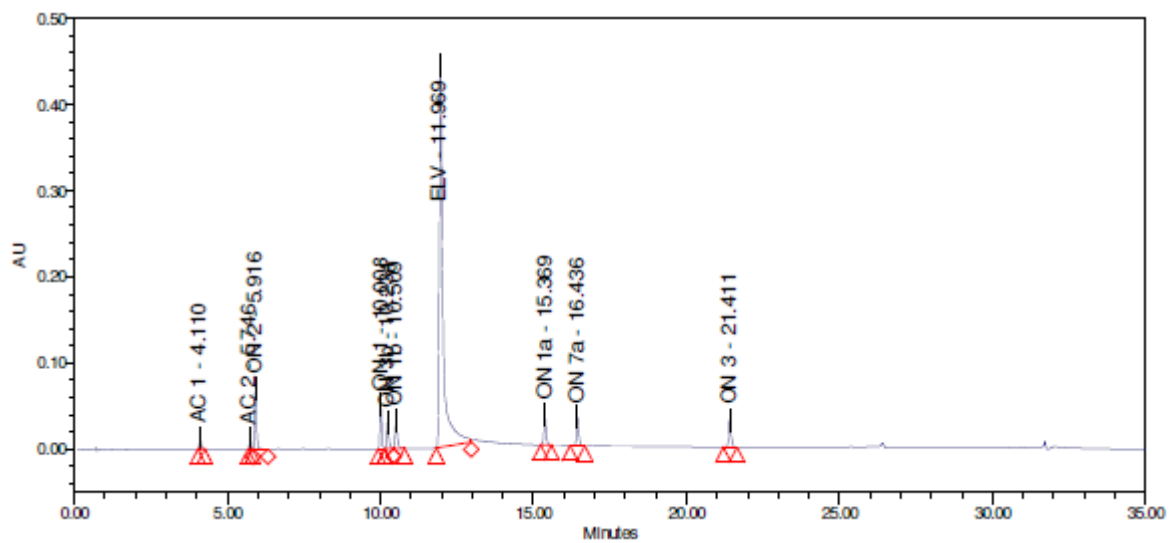
Slika 10. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 6,8



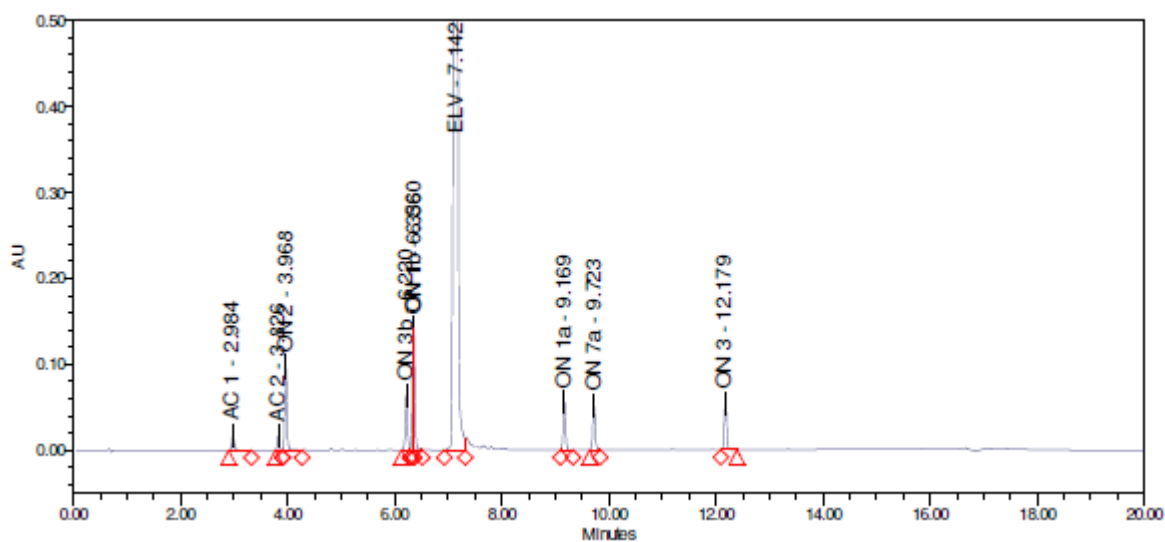
Slika 11. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 6,8$



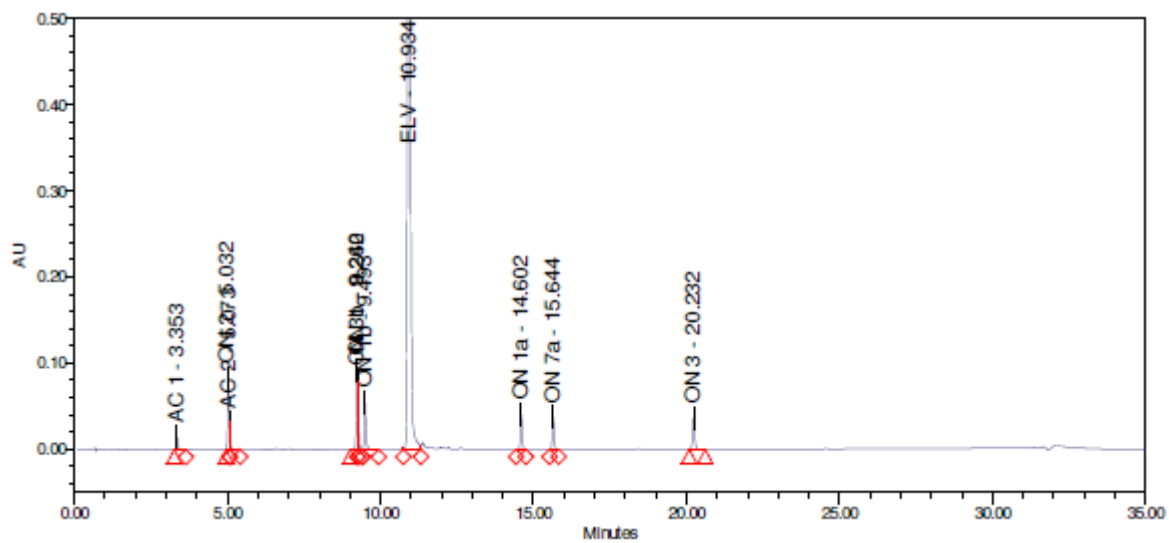
Slika 12. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i $\text{pH} = 8,9$



Slika 13. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i $\text{pH} = 8,9$



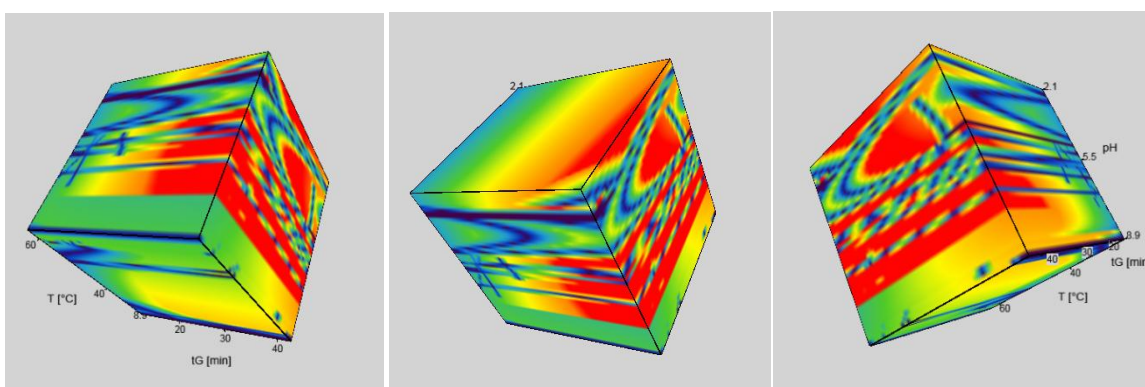
Slika 14. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 8,9$



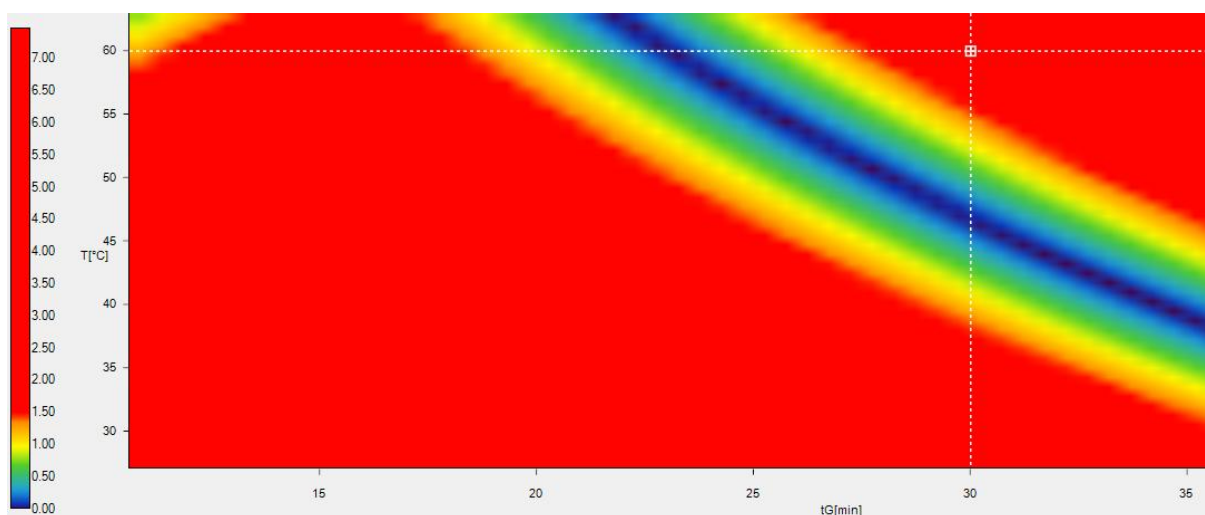
Slika 15. Kromatogram ELV i onečišćenja pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 8,9$

4.2. Rezultati DryLab analize

Rezultati dobiveni UHPLC analizama na odabranoj koloni *Waters Aquity UPLC BEH C18* 1,7 μm ; 2,1 mm \times 100 mm obrađeni su računalnim programom DryLab te je dobiven 3D model koji pokazuje ovisnost parametara t , T i pH-vrijednosti mobilne faze jedan o drugom (slike 16 i 17). Daljnjom obradom rezultata dobiveni su optimalni uvjeti za UHPLC analizu (tablica 18). Kako bi se smanjilo vrijeme analize i dobilo ujednačeno odjeljivanje, protok mobilne faze povećan je s 0,4 mL min⁻¹ na 0,8 mL min⁻¹ (tablica 19).



Slika 16. Grafički prikaz 3D računalnog modela dobivenog računalnim programom DryLab



Slika 17. Grafički prikaz 2D računalnog modela dobivenog računalnim programom DryLab pri pH pufera 2,1

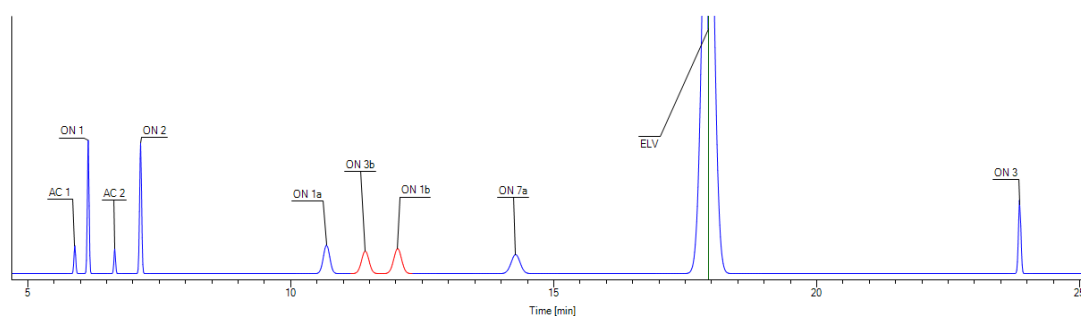
Tablica 18. Optimalni uvjeti dobiveni računalnim programom DryLab pri protoku od 0,4 mL min⁻¹

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 µm; 2,1 mm × 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 2,1		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	94,00	6,00
	4,00	63,00	37,00
	18,66	58,93	41,07
	23,10	18,21	81,79
	26,00	18,21	81,79
	26,00	94,00	6,00
	30,00	94,00	6,00
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,4 mL min ⁻¹		
Detektor	240 (nm)		
Temperatura kolone	60 °C		

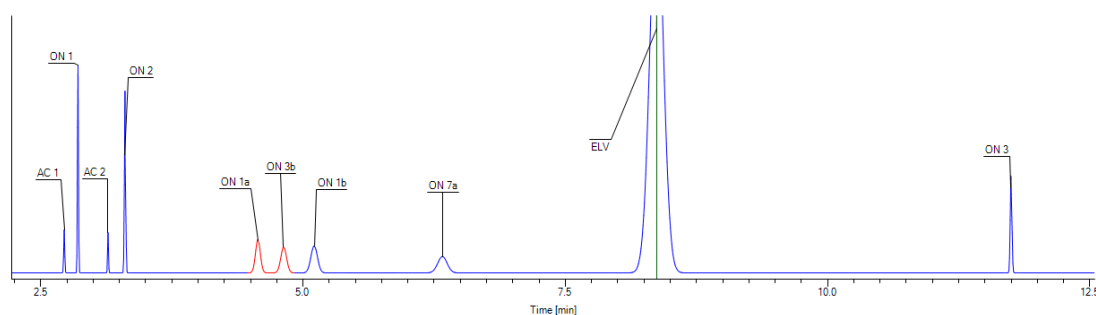
Tablica 19. Optimalni uvjeti dobiveni DryLab računalnim programom pri protoku od 0,8 mL min⁻¹

Kolona i punilo	Waters Aquity UPLC BEH C18 1,7 µm; 2,1 mm × 100 mm		
Pufer	10 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 2,1		
Mobilna faza A	pufer		
Mobilna faza B	ACN		
Gradijent	Vrijeme / min	% eluens A	% eluens B
	0,00	94,00	6,00
	2,00	63,00	37,00
	9,33	58,93	41,07
	11,55	18,21	81,79
	13,00	18,21	81,79
	13,05	94,00	6,00
	15,00	94,00	6,00
Volumen injektiranja	1 µL		
Protok	0,8 mL min ⁻¹		
Detektor	240 (nm)		
Temperatura kolone	60 °C		

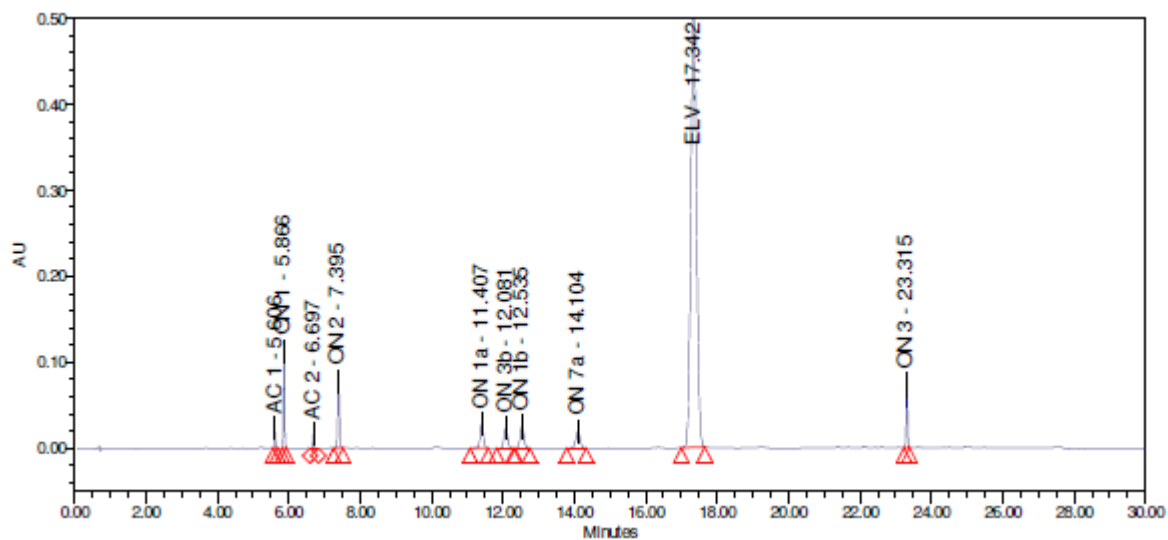
Koristeći podatke dobivene računalnim programom DryLab provedene su dvije UHPLC analize ELV i njegovih onečišćenja (tablica 18 i 19). Dobiveni kromatogrami programom DryLab prikazani su na slikama 18 i 19, a eksperimentalni na slikama 20 i 21. Usporedbom kromatograma dobivenih DryLab računalnim programom i kromatograma dobivenih UHPLC analizom vidi se dobro podudaranje retencijskih vremena ELV i onečišćenja te dobro odjeljivanje. Pomoću računalnog programa DryLab uspješno je razvijena metoda za analizu ELV i njegovih onečišćenja pri čemu je razlučivanje iznosilo 2,21.



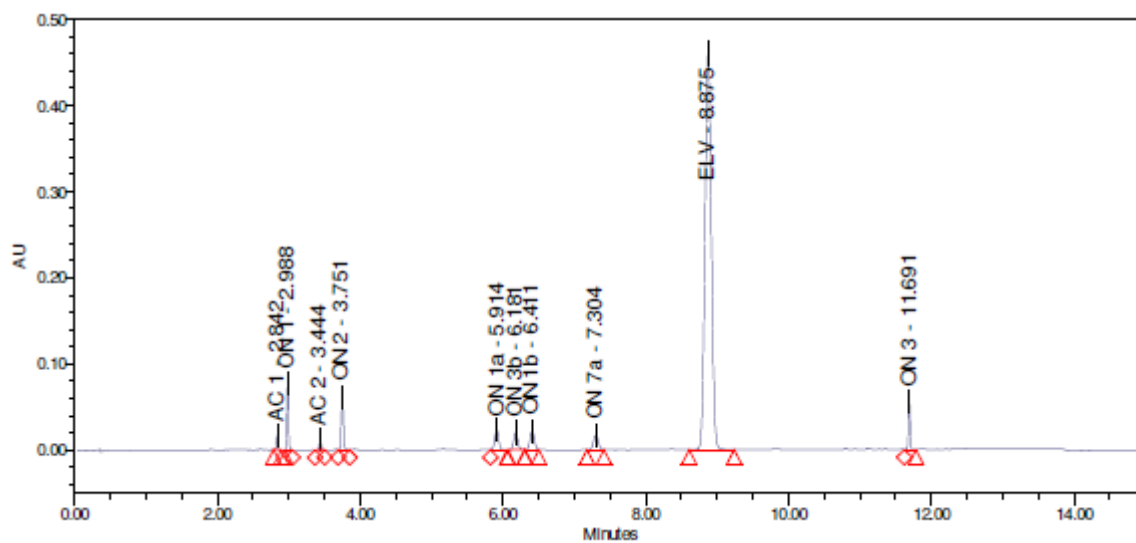
Slika 18. DryLab kromatogram pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C, pH = 2,1 i protok $0,4$ mL min^{-1}



Slika 19. DryLab kromatogram pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C, pH = 2,1 i protok $0,8$ mL min^{-1}



Slika 20. Kromatogram ELV i onečišćenja pri optimalnim uvjetima dobivenih pomoću DryLab, $t = 30$ min, $T = 60$ °C, pH = 2,1 i protok $0,4$ mL min^{-1}

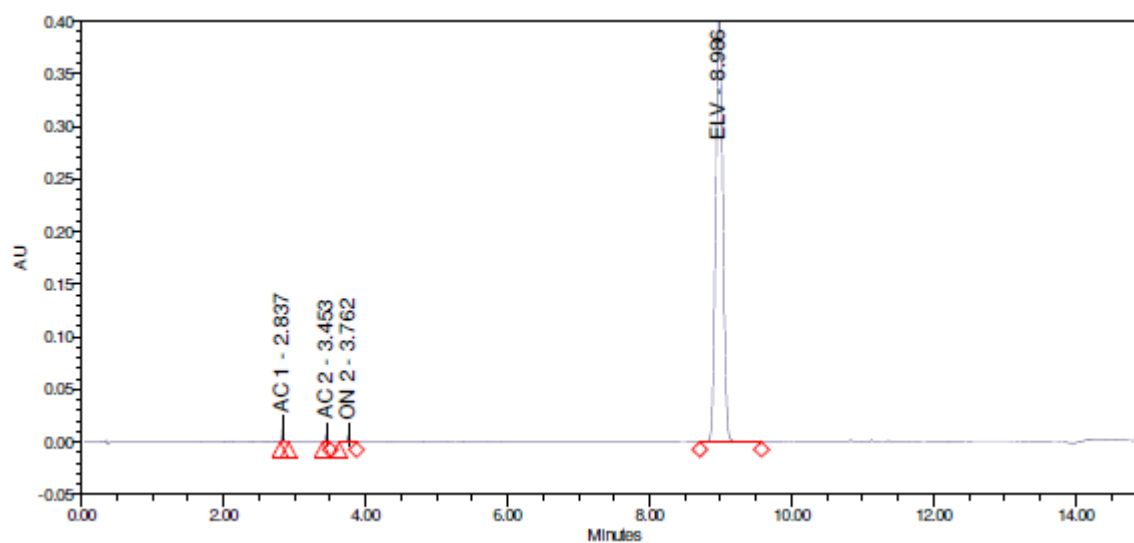


Slika 22. Kromatogram ELV i onečišćenja pri optimalnim uvjetima dobivenih pomoću DryLab, $t = 15$ min, $T = 60$ °C, $\text{pH} = 2,1$ i protok $0,8 \text{ mL min}^{-1}$

4.3. Rezultati forsirane razgradnje

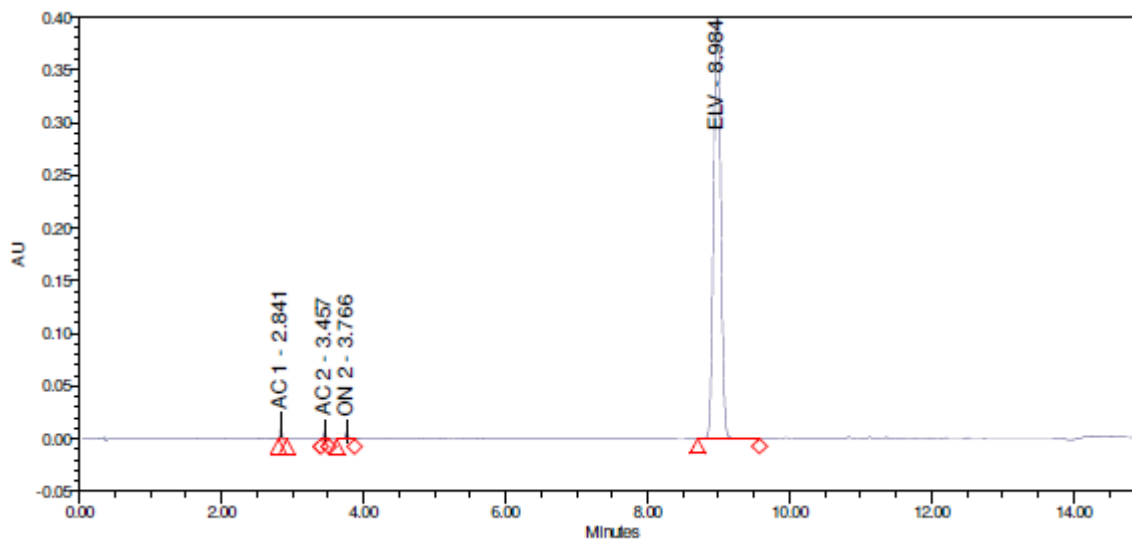
Kako bi se provjerilo je li postignuta zadovoljavajuća razgradnja, prije same analize vezanim sustavom 2D-LC-MS otopine su analizirane UHPLC-om, pri čemu su se koristili uvjeti dobivenih računalnim programom DryLab. Forsirana razgradnja elvitegravira provedena je 24 sata pri temperaturi od 70 °C te korištenjem otopina 5 mol L⁻¹ HCl, 5 mol L⁻¹ NaOH i 30 % H₂O₂.

Prvo je snimljen kromatogram otopine ELV koncentracije 1 mg mL⁻¹ (slika 22).

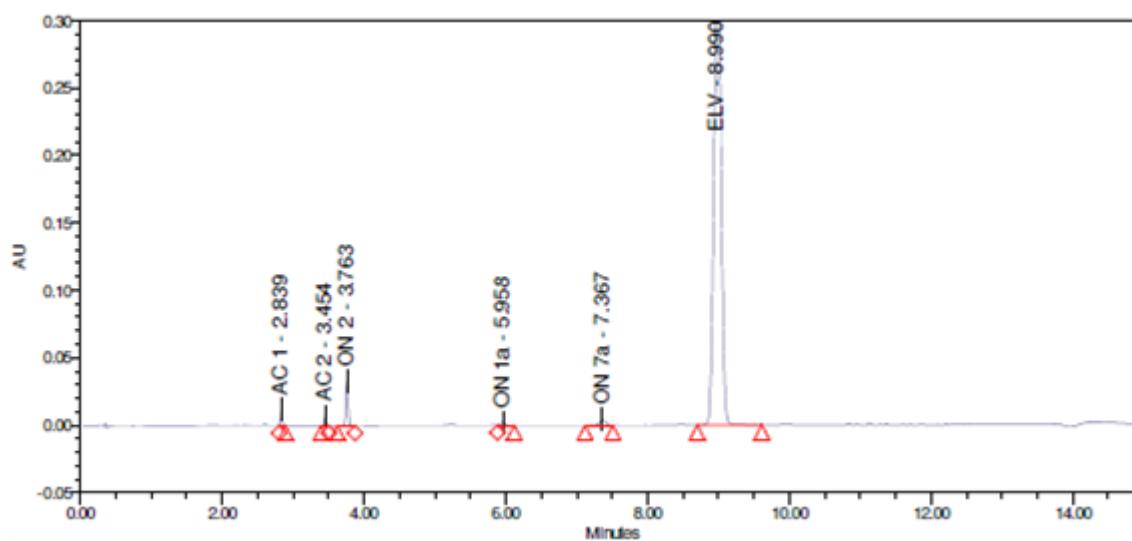


Slika 22. Kromatogram otopine ELV koncentracije 1 mg mL⁻¹
($t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 2,1)

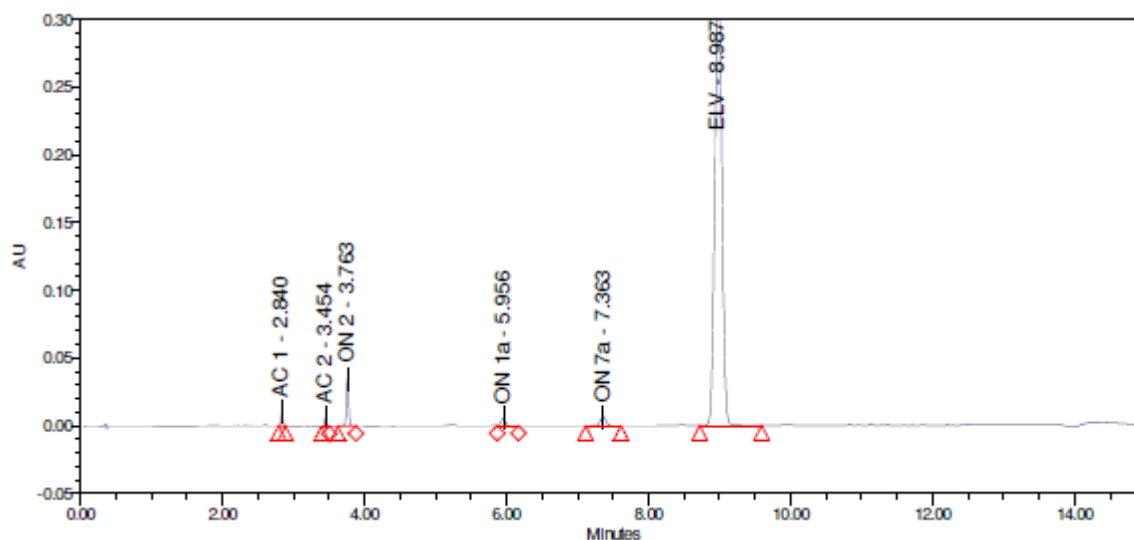
Nakon toga snimljeni su kromatogrami otopine ELV podvrgnute forsiranoj razgradnji pomoću topline, 5 mol L⁻¹ HCl, 5 mol L⁻¹ NaOH i 30 % H₂O₂ (slike 23-26).



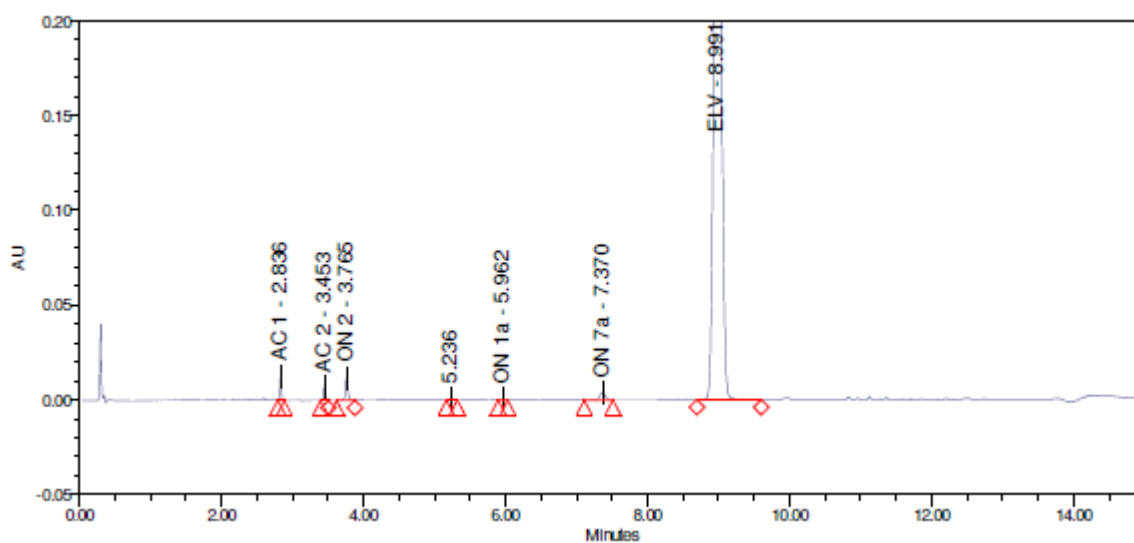
Slika 23. Kromatogram otopine ELV podvrgnute forsiranoj razgradnji pomoću topline ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$)



Slika 24. Kromatogram otopine ELV podvrgnute forsiranoj razgradnji u $5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ ($t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$)



Slika 25. Kromatogram otopine ELV podvrgnute forsiranoj razgradnji u 5 mol L^{-1} NaOH ($t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$)



Slika 26. Kromatogram otopine ELV podvrgnute forsiranoj razgradnji u $30\% \text{ H}_2\text{O}_2$ ($t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$)

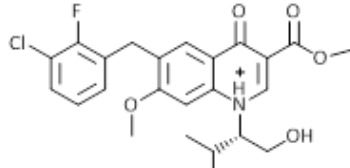
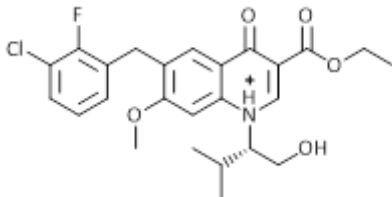
Pri povišenoj temperaturi nije došlo do razgradnje elvitegravira. Nastanak razgradnih produkata uočen je pri kiseloj i lužnatoj razgradnji te oksidacijom u peroksidu. Ovom analizom uspješno je potvrđeno da pri određenim uvjetima forsirane razgradnje nastaju razgradni produkti.

4.4. Rezultati 2D-LC-MS analize

2D-LC-MS analiza koristi se kako bi se odredila struktura i masa razgradnih produkata. Nakon što je UHPLC analizom prikazana forsirana razgradnja elvitegravira, uzorci forsirane razgradnje analizirani su 2D-LC-MS-om. Korišteni su uvjeti UHPLC analize dobiveni računalnim programom DryLab.

Analizirani su uzorci elvitegravira podvrgnuti forsiranoj razgradnji te uzorak čistog ELV. Forsiranom razgradnjom pri povišenoj temperaturi nije došlo do razgradnje. Pri razgradnji s $5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$, $5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ i $30 \% \text{ H}_2\text{O}_2$ nastali su razgradni produkti koji su se dalje analizirali. Razgradni produkti posljedica su reakcije MeOH i EtOH iz diluenta s ELV. Na temelju dobivenih spektara masa određene su vrijednosti m/z fragmenata koji su nakon toga izolirani i fragmentirani. Pri MS/MS analizi korištene su energije sudara od 0, 10, 20 i 30 eV. Na osnovu masa fragmenata pretpostavljena je struktura razgradnih produkata ELV i njihova fragmentacija. (tablica 19 i 20).

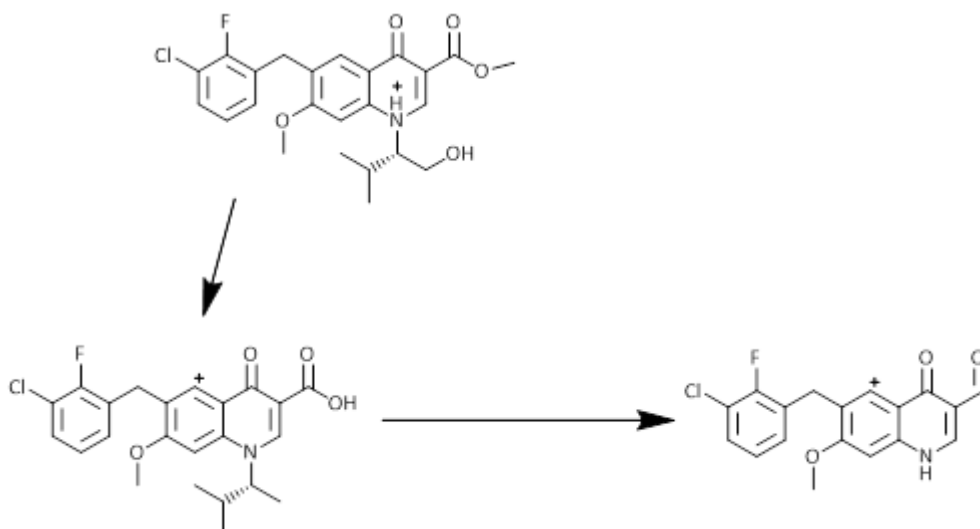
Tablica 19. Nastali razgradni produkti i njihove strukture

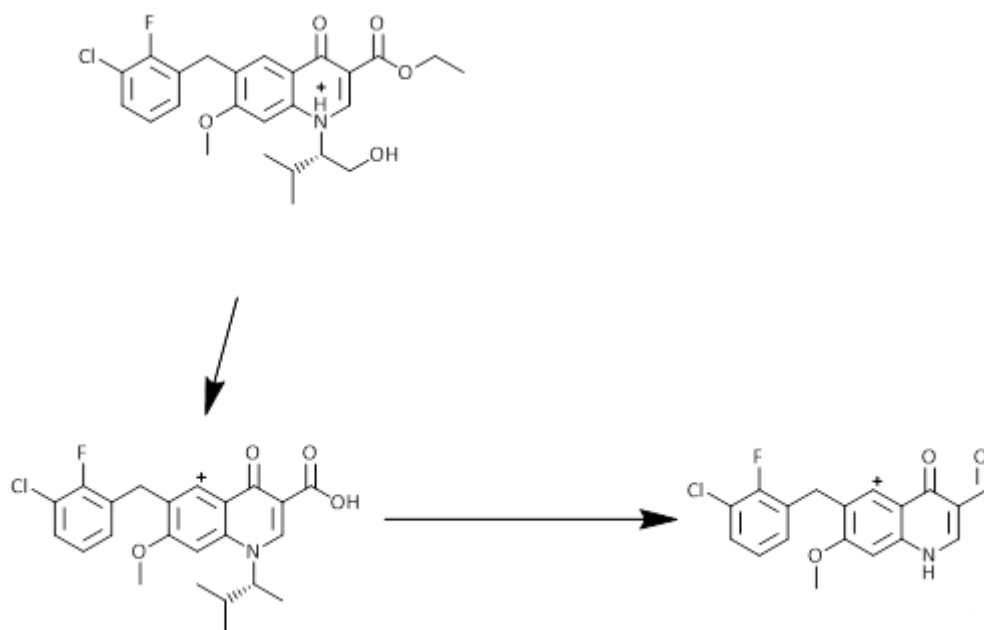
Ime razgradnog produkta	Kemijska formula	Masa	Struktura
ON 1a	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{ClFNO}_5^+$	462,0	
ON 7a	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{ClFNO}_5^+$	476,0	

Tablica 20. Razgradni produkti i njihovi ionski fragmenti nakon MS/MS analize

Razgradni produkt	t_r , min	Prekursor ion / m/z	Energija sudara / eV	Ioni produkti
ON 1a	5,8	462,0	30	429,9
				343,9
ON 7a	7,27	476,0	20	430,0
				343,9

U tablici 20 nalaze se mase nastalih fragmenata nakon MS/MS analize. Svi MS/MS spektri iona prikazani su u dodatku (slike D49-D56). Na temelju rezultata MS/MS analize pretpostavljeni su načini fragmentacije razgradnih produkata (slike 27 i 28).

**Slika 27.** Fragmentacija razgradnog produkta ON 1a



Slika 28. Fragmentacija razgradnog produkta ON 7a

§ 5. ZAKLJUČAK

Cilj rada bio je razviti učinkovitu i djelotvornu metodu za analizu lijeka elvitegravira, njegovih onečišćenja i razgradnih produkata. Za razdvajanje i kvantitativno određivanje onečišćenja i razgradnih produkata elvitegravira koristio se tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda.

Računalnim programom DryLab obrađeni su podaci dobiveni UHPLC analizama u svrhu optimizacije kromatografskih uvjeta. Dobiveni su sljedeći uvjeti: vremenski gradijent 15 minuta, temperatura kolone 60 °C i pH mobilne faze 2,1 koji su provjereni UHPLC analizom te su korišteni za analizu uzoraka elvitegravira nakon proveden forsirane razgradnje i za 2D-LC-MS analizu. Ovim je programom uspješno razvijena metoda za određivanje onečišćenja i razgradnih produkata elvitegravira. DryLab se pokazao kao odličan program kojim se znatno skraćuje vrijeme potrebno za razvoj metode.

Forsirana razgradnja provedena je u kiselini, lužini, peroksidu te zagrijavanjem. UHPLC analizom potvrđeno je da nastaju razgradni produkti pri određenim uvjetima forsirane razgradnje. Elvitegravir se raspada u kiselini i lužini te oksidacijom u peroksidu. Zagrijavanjem nije došlo do razgradnje.

Za analizu razgradnih produkata korištena je 2D-LC-MS analiza. Na temelju MS i MS/MS spektara pretpostavljene su strukture razgradnih produkata i način fragmentacije.

Uspješno je razvijena brza i učinkovita UHPLC metoda za analizu onečišćenja i razgradnih produkata lijeka elvitegravira.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Oznaka	Naziv
2D-LC-MS	dvodimenzijaska tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
α	faktor odjeljivanja
ACN	acetonitril
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije
API	aktivna farmaceutska tvar
DAD	detektor s nizom dioda
ED	elektrokemijski detektor
ELSD	detektor raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku
ELV	elvitgravir
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
EtOH	etanol
FAB	bombardiranje brzim atomima
FLD	fluorescencijski detektor
H	visina kromatografskog pika
HAART	visokokomponentna antiretrovirusna terapija
HCl	klorovodična kiselina
HIV	virus humane imunodeficijencije
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
H₂O₂	vodikov peroksid
k	faktor zadržavanja
KH₂PO₄	kalijev dihidrogen fosfat
L	dužina kromatografske kolone
LC-IR	tekućinska kromatografija spregnuta s infracrvenom spektroskopijom
LC-MS	tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

LC-MS/MS	tekućinska kromatografija spregnuta sa tandemnom spektrometrijom masa
LCNMR	tekućinska kromatografija spregnuta s nuklearnom magnetskom rezonancijom
MeOH	metanol
N	broj teorijskih tavana
NaOH	natrijev hidroksid
NH₄HCO₃	amonijev formijat
R_s	razlučivanje
RID	detektor indeksa loma
SIMS	ionizacija bombardiranjem iona
SIV	Sindrom majmunske imunodeficijencije
t_M	vrijeme zadržavanja nezadržavanog sastojka
T	temperatura kromatografske kolone
t	vrijeme gradijentnog eluiranja
TOF	analizator koji mjeri vrijeme leta
t_R	vrijeme zadržavanja
UHPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
w	širina osnovice kromatografske krivulje

§ 7. LITERATURNI IZVORI

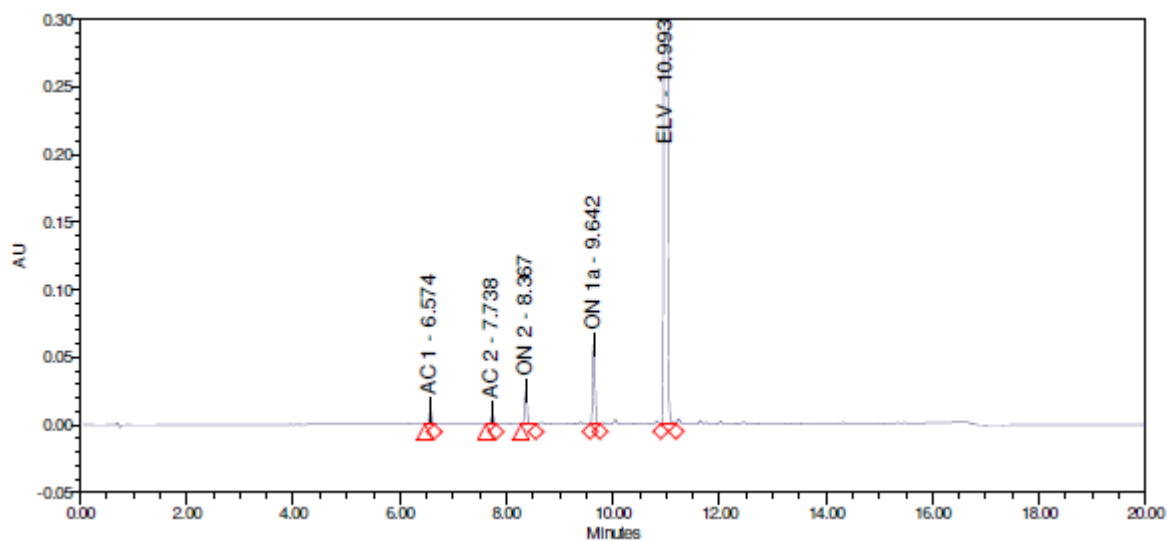
1. M. Sertić, *Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina*, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013, str. 16.
2. T. Wills, V. Vega, *Expert Opin. Investig. Drugs* **21** (2012) 395-401.
3. M. Simiele, A. Ariaudo, A. De Nicolò, F. Favata, M. Ferrante, C. Carcieri, S. Bonora, G. Di Perri, A. D'Avolio, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **138** (2017) 223–230.
4. Z. Djerada, C. Feliu, C. Tournois, D. Vautier, L. Binet, A. Robinet, H. Marty, C. Gozalo, D. Lamiable, H. Millart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **86** (2013) 100–111.
5. F. J. Palella, K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, J. Aschiman, S. D. Holmberg, *N. Engl. J. Med.* **338** (1998) 853–860.
6. K. Shimura, E. N. Kodama, *Antivir Chem Chemoth* **20**(2009) 79–854.
7. Z. Hajimahdi, A. Zarghi, *Iran. J. Pharm. Res.* **15** (4) (2016) 595–628.
8. A. Planinić, *Mutacije povezane s rezistencijom virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 16.
9. B. Kolarić, *Druga generacija nadzora nad hiv infekcijom – seroprevalencija u grupama s povećanim rizikom*, Medicinski fakultet, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, 2007, str. 10.
10. Ž. Cvetnić, M. Ostojić, A. Kvesić: *Mikrobiologija i parazitologija*, Mostar 2013., str. 176-177.
11. *AIDS epidemic update 2016.*, UNAIDS, Geneva, 2016.
12. B. F. Keele, F. Van Heuverswyn, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters, B. H. Hahn, *Science* **313** (2006) 523–526.
13. P. A. Volberding, S. G. Deeks, *Lancet* **376** (2010) 49–62.
14. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb 1999, str. 645–674.
15. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Zagreb, 2006

16. Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, New Jersey 2007, str. 3.
17. S. K. Bhardway, K. Dwivedi, D. D. Agarwal, *Int. J. Anal. Bioanal. Chem* **5** (2015) 7–81.
18. M. Kaštelan-Macan, *Enciklopedijski riječnik analitičkog nazivlja*, Mentor d.o.o., Zagreb, 2014, 97–99.
19. A. Horvatić, M. Cindrić, *Analysis of therapeutic peptides by mass spectrometry*, Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za sistemsku biomedicinu, Zagreb, (2008) 258–263.
20. S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 1121.
21. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, New Jersey, 2007, str. 33–36.
22. *DryLab[®]V4.O*, Molnar-institute, <http://molnar-institute.com/drylab/> (datum pristupa 06. siječnja 2018.)
23. I. Molnar, *J. Chromatogr. A*, **965** (2002) 175–194.
24. K. Jayaraman, A. J. Alexander, Y. Hu, F. P. Tomasella, *Anal. Chim. Acta* **696** (2011) 116–124.
25. J. Terzić, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, *Arh. farm.* **64** (2014) 205–219.

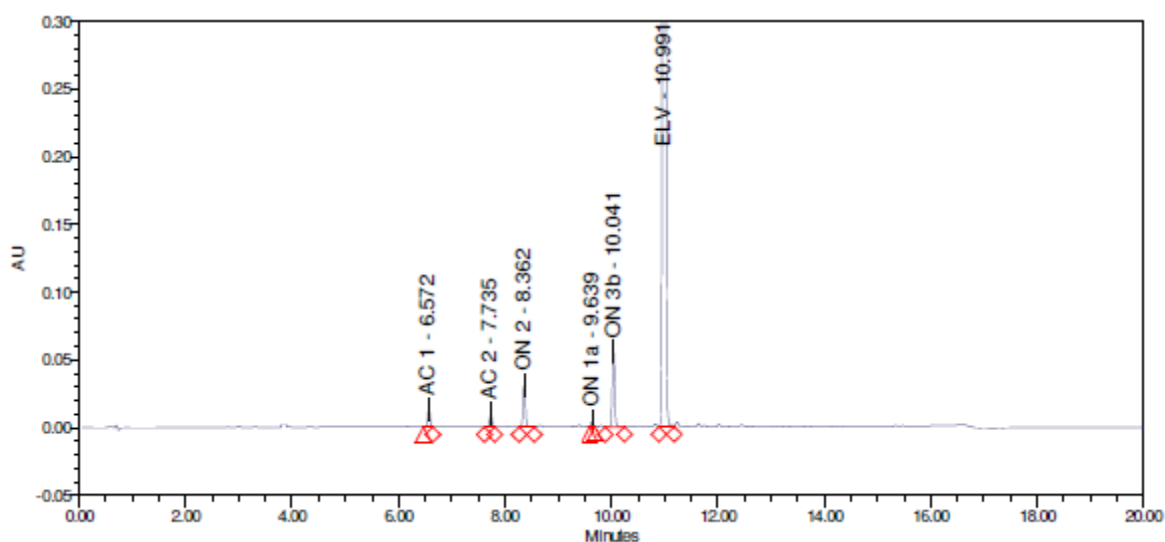
§ 8. DODATAK

8.1. Rezultati UHPLC analize

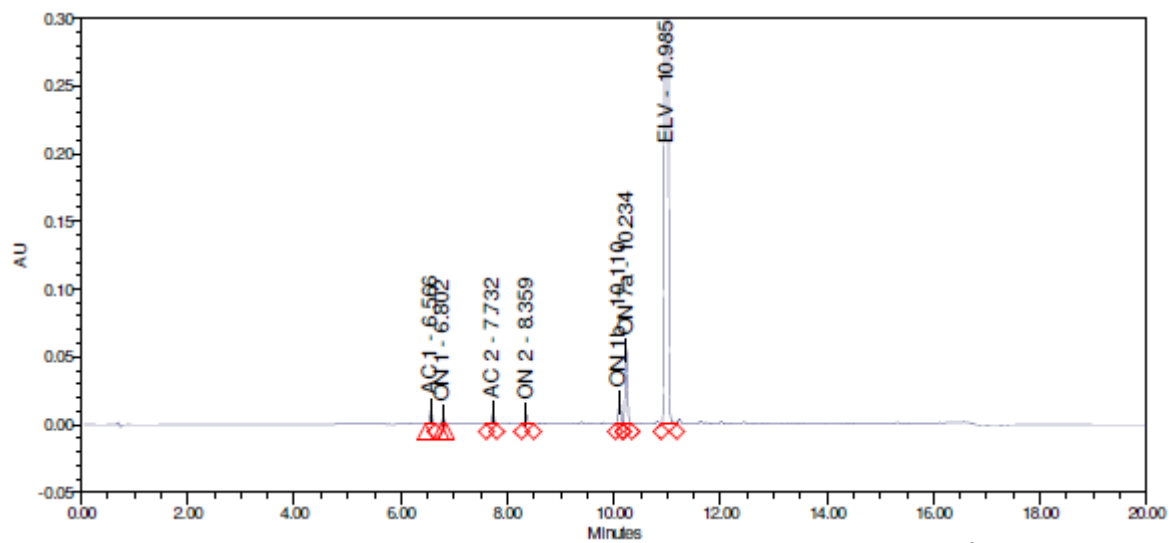
8.1.1. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i $pH = 2,1$



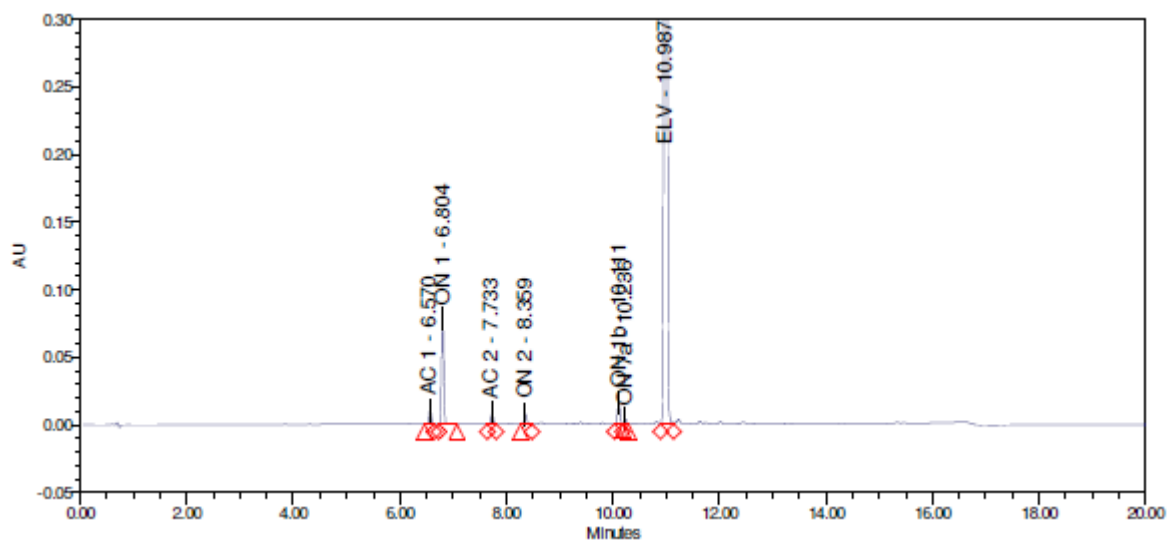
Slika D1. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i $pH = 2,1$



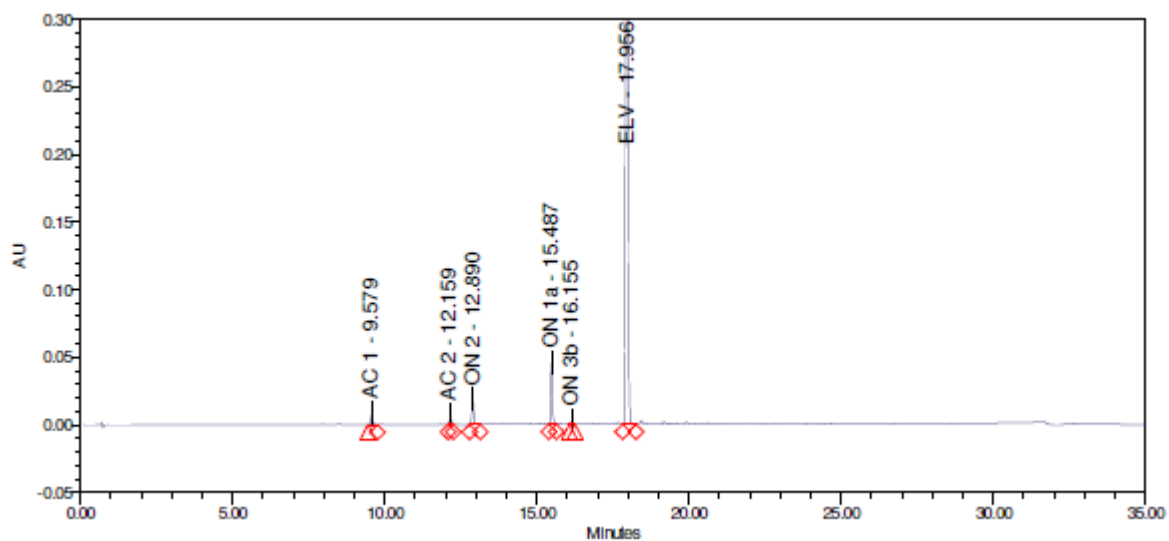
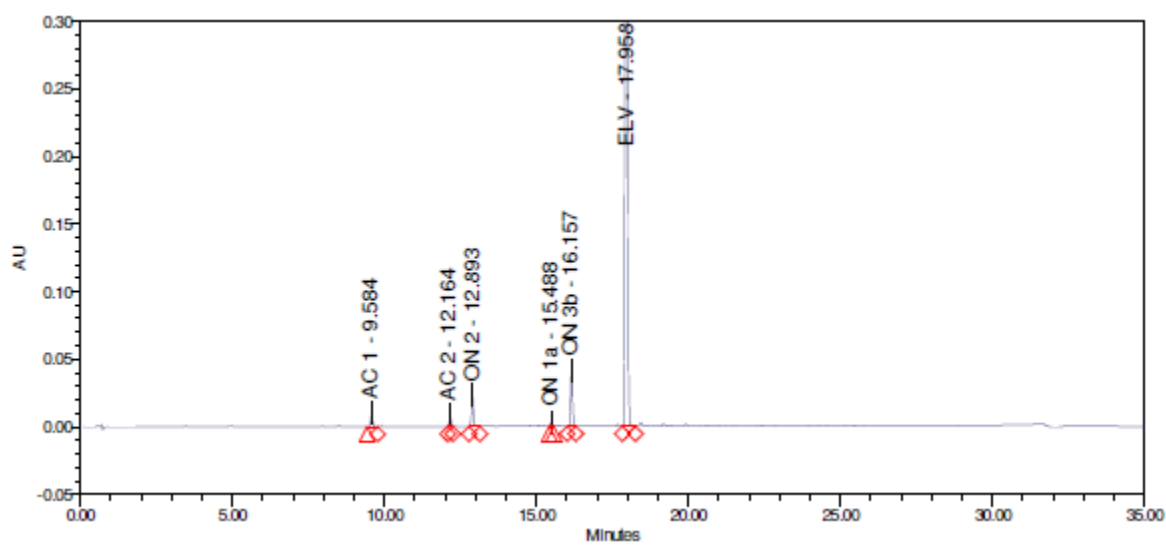
Slika D2. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i $pH = 2,1$

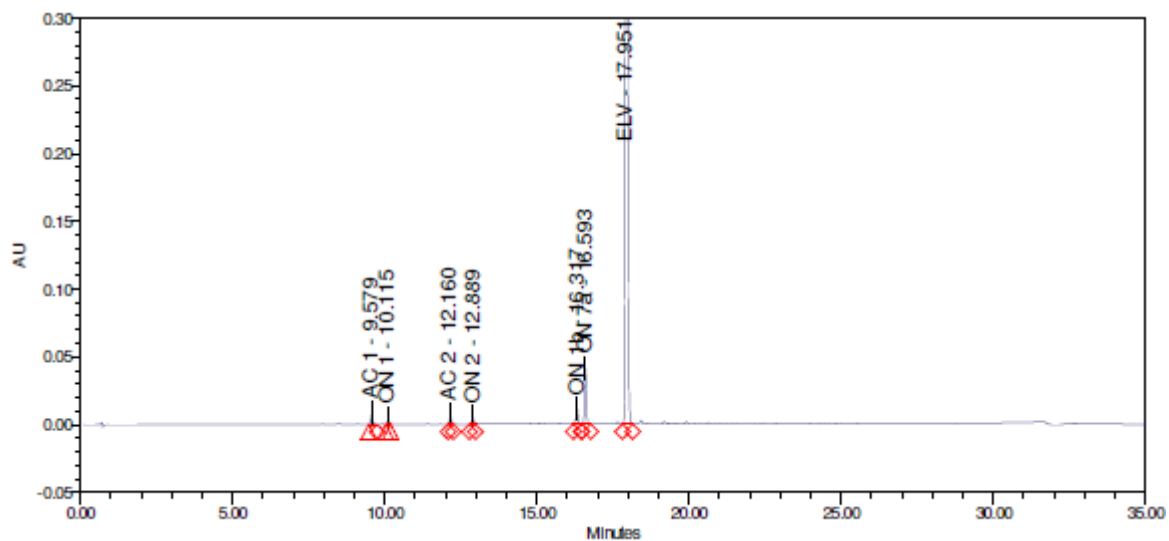


Slika D3. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i $\text{pH} = 2,1$

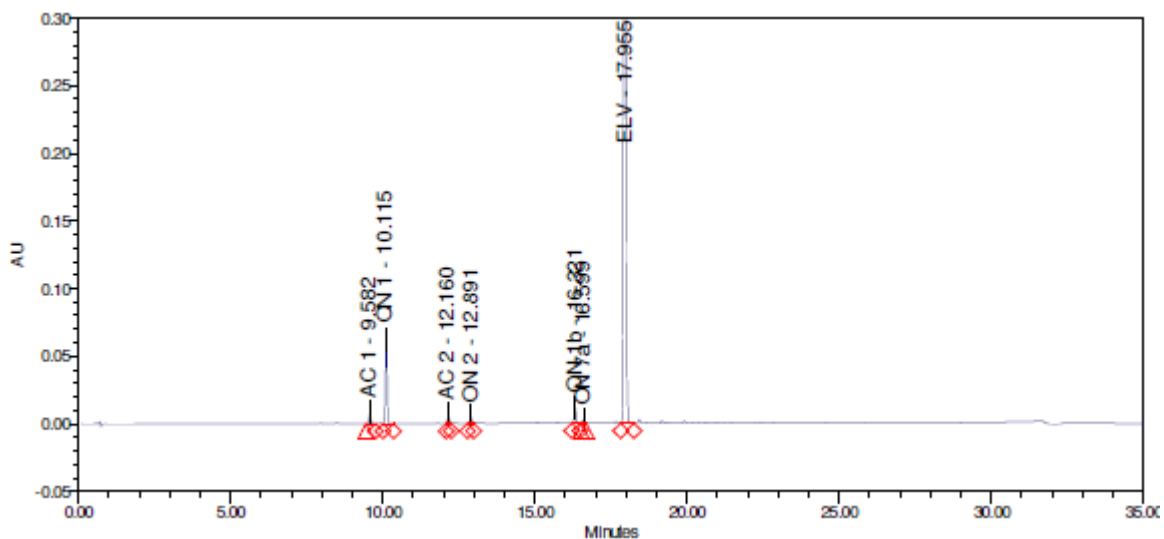


Slika D4. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i $\text{pH} = 2,1$

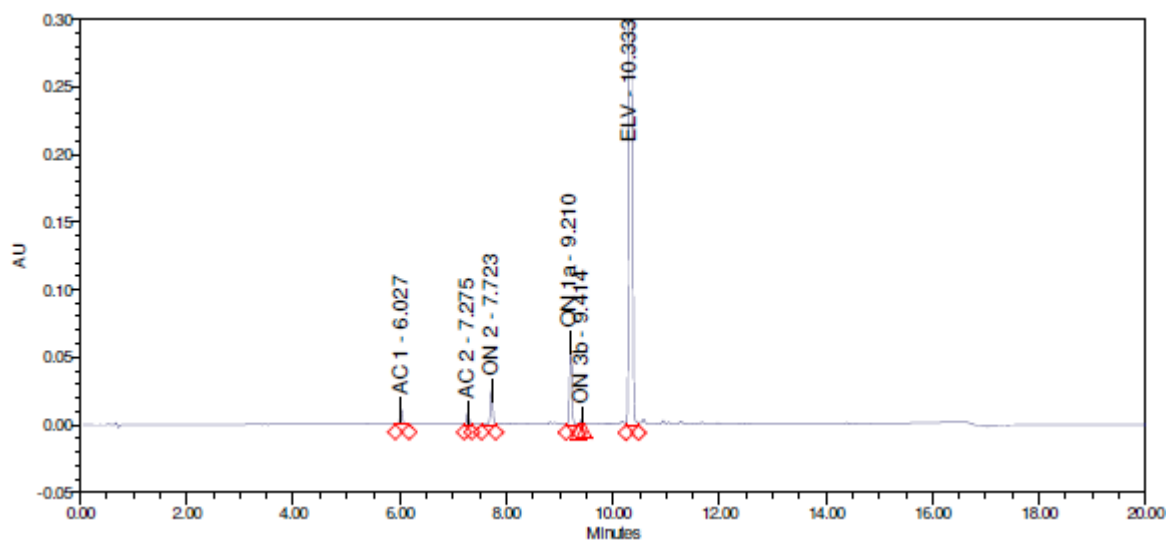
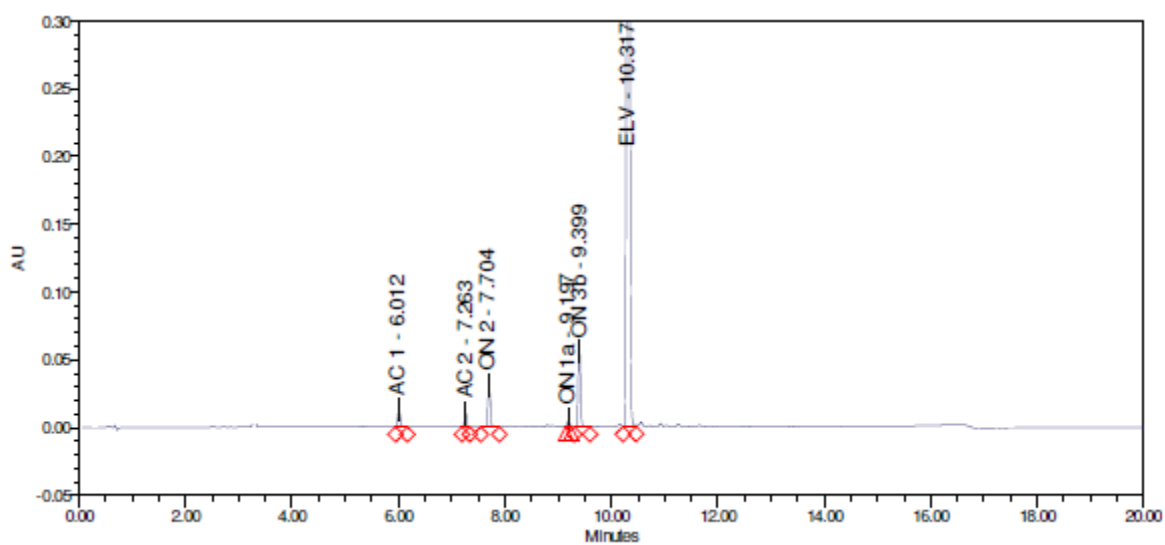
8.1.2. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$ Slika D5. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$ Slika D6. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$

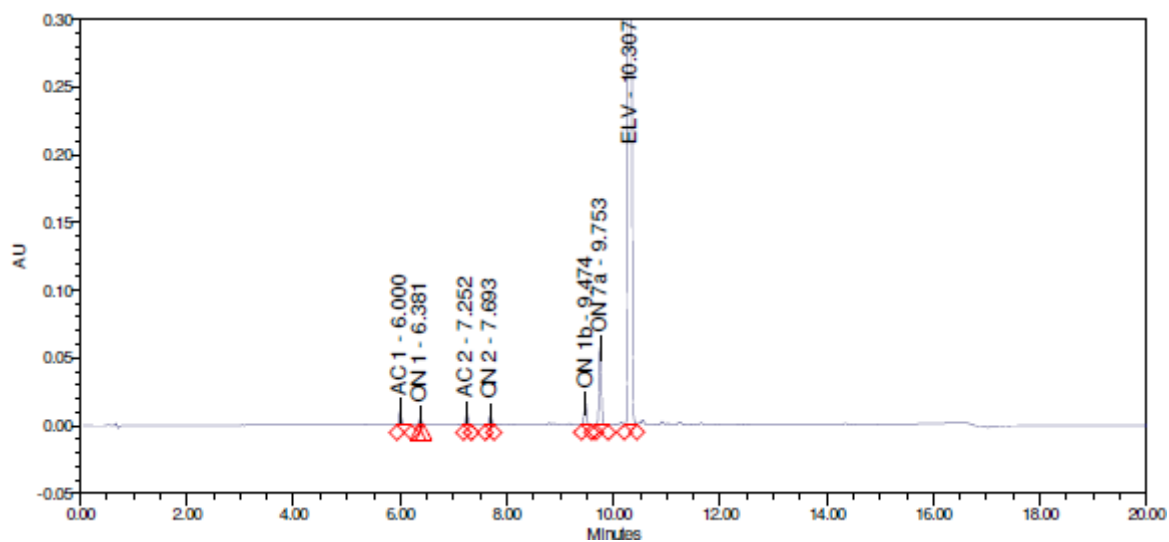


Slika D7. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 2,1

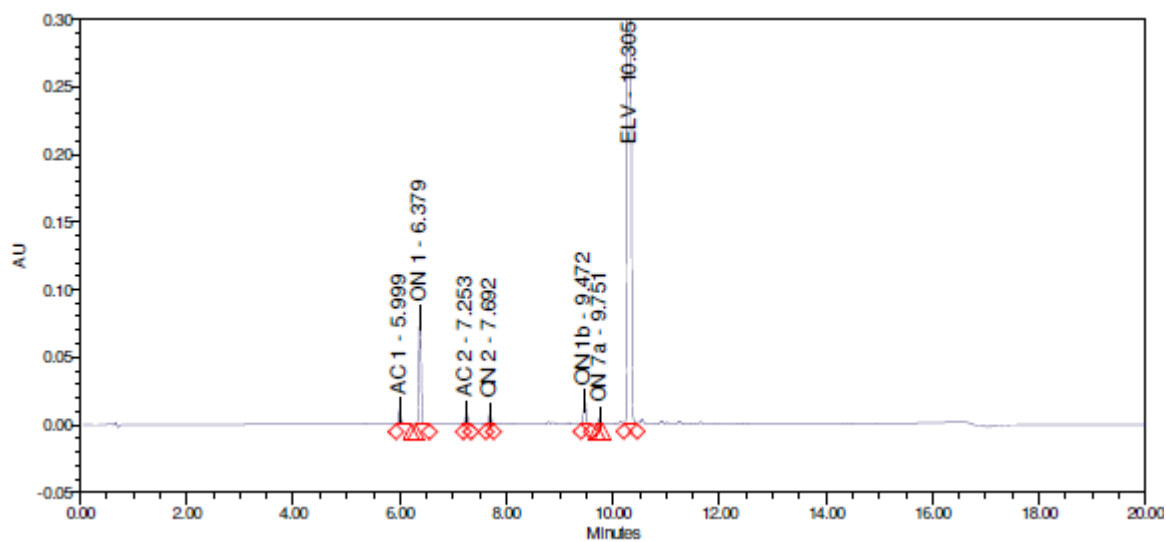


Slika D8. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 2,1

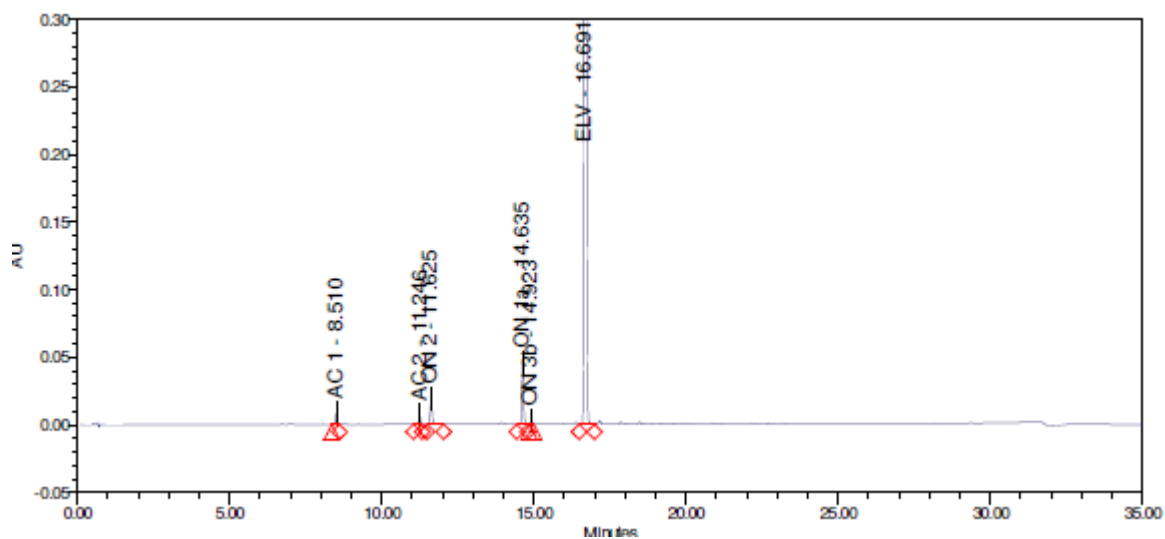
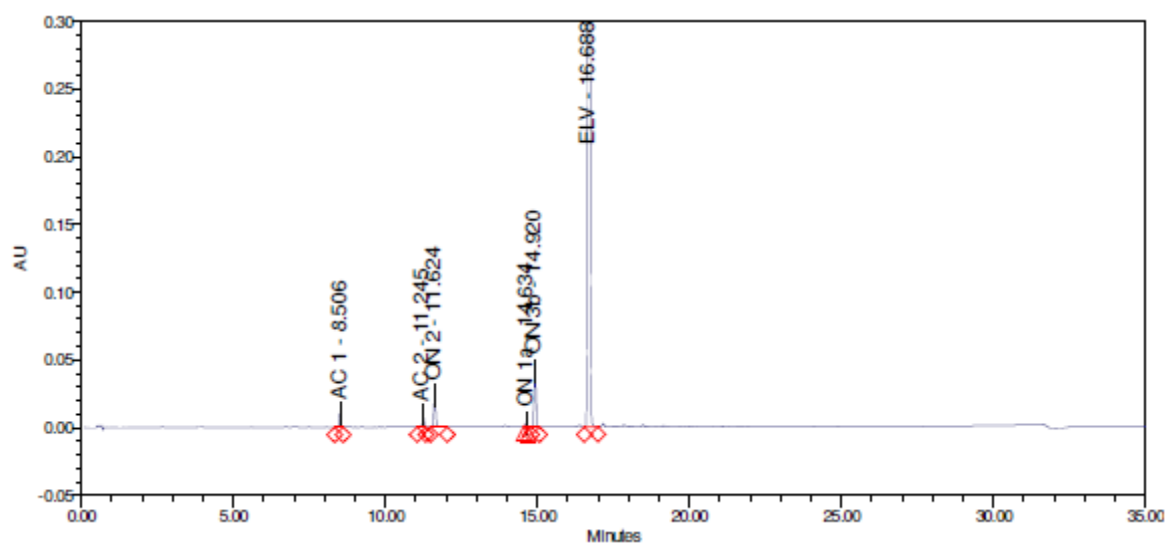
8.1.3. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$ Slika D9. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$ Slika D10. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$

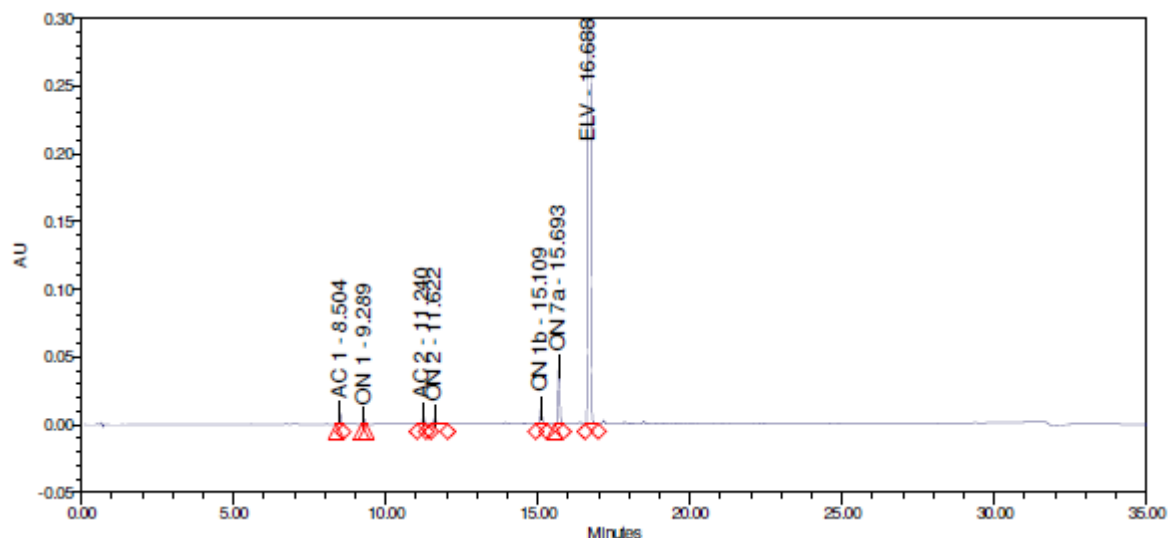


Slika D11. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$

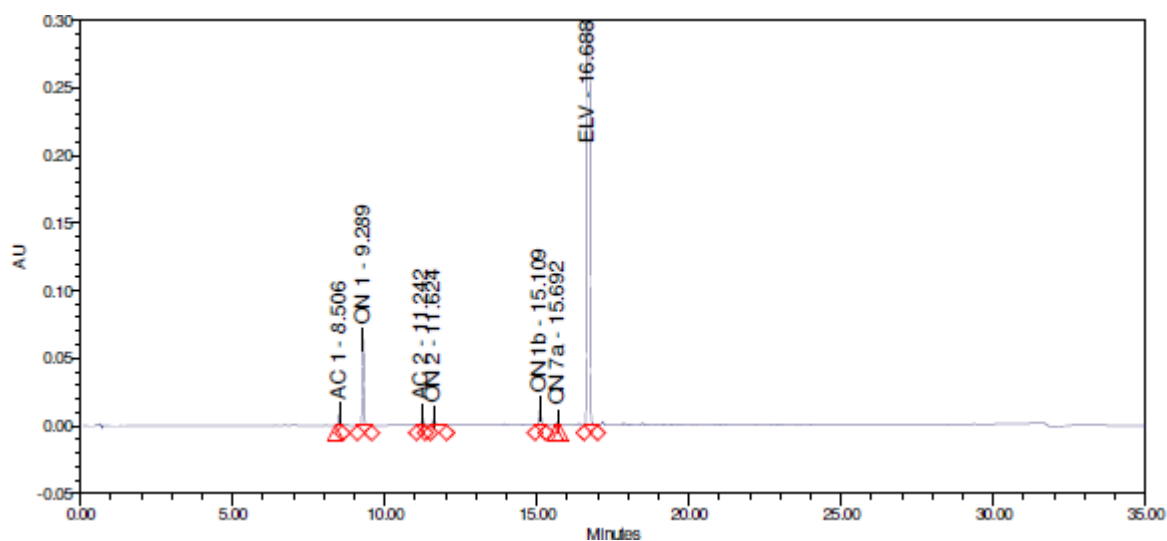


Slika D12. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$

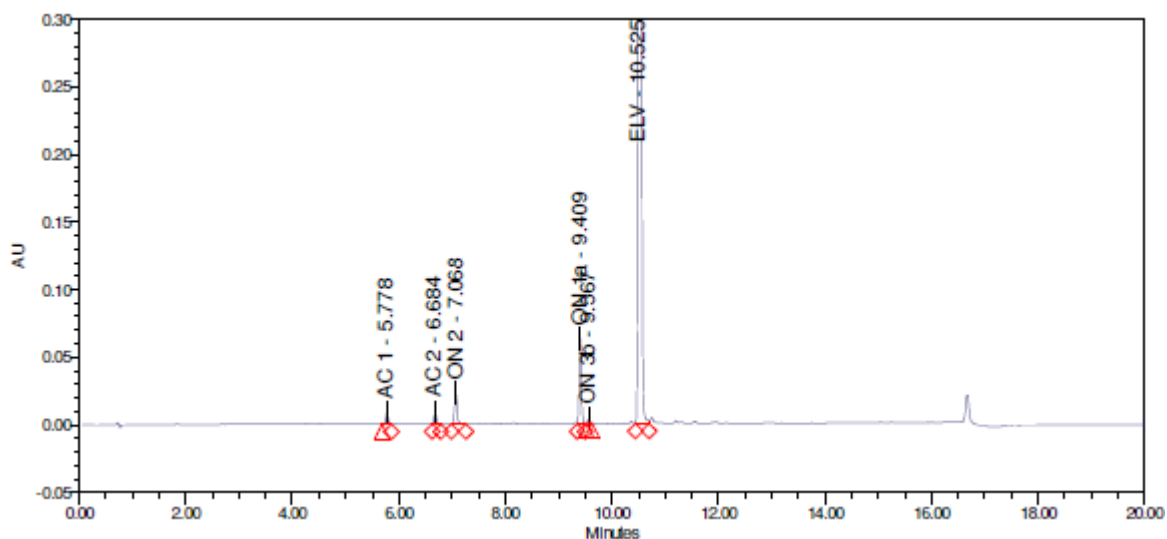
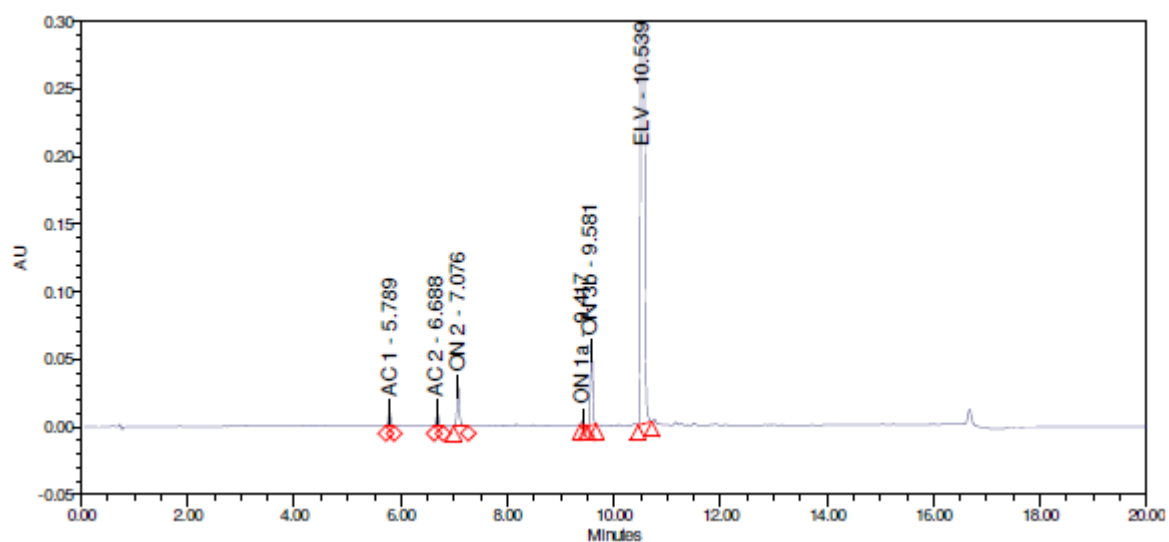
8.1.4. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$ Slika D13. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$ Slika D14. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 2,1$

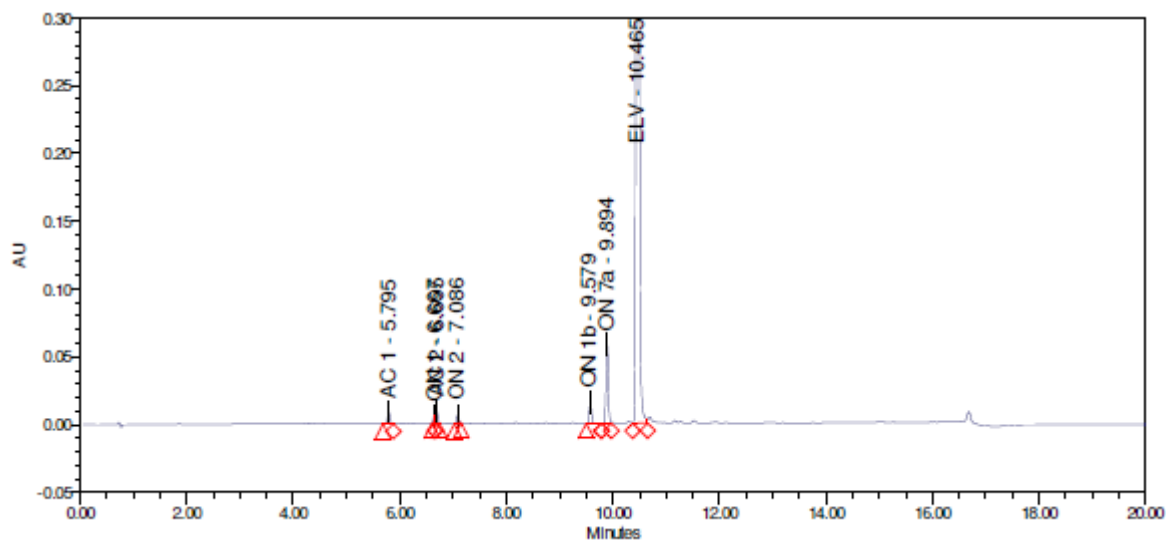


Slika D15. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$

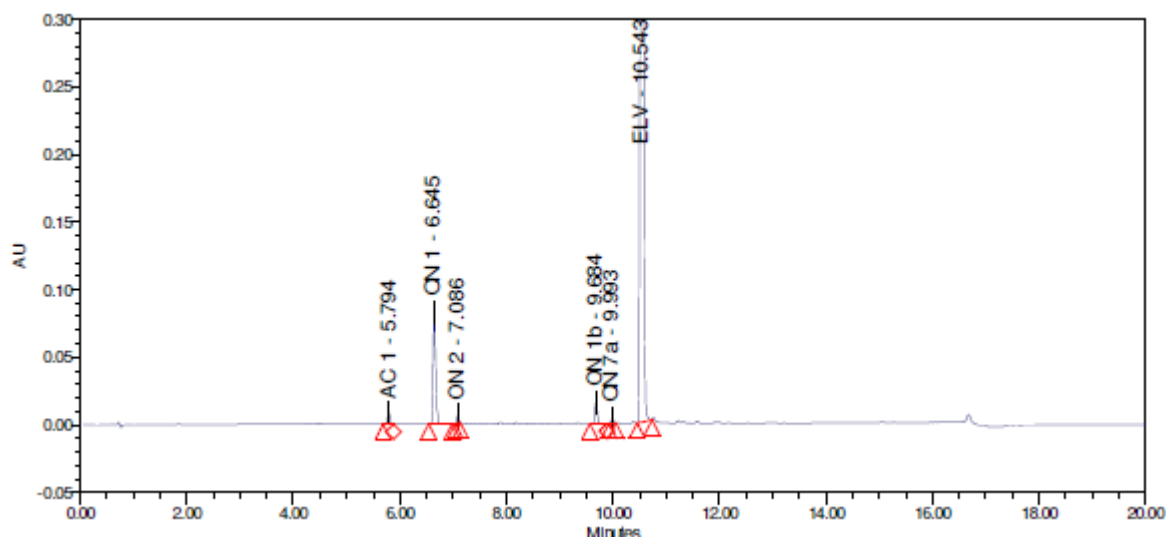


Slika D16. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 2,1$

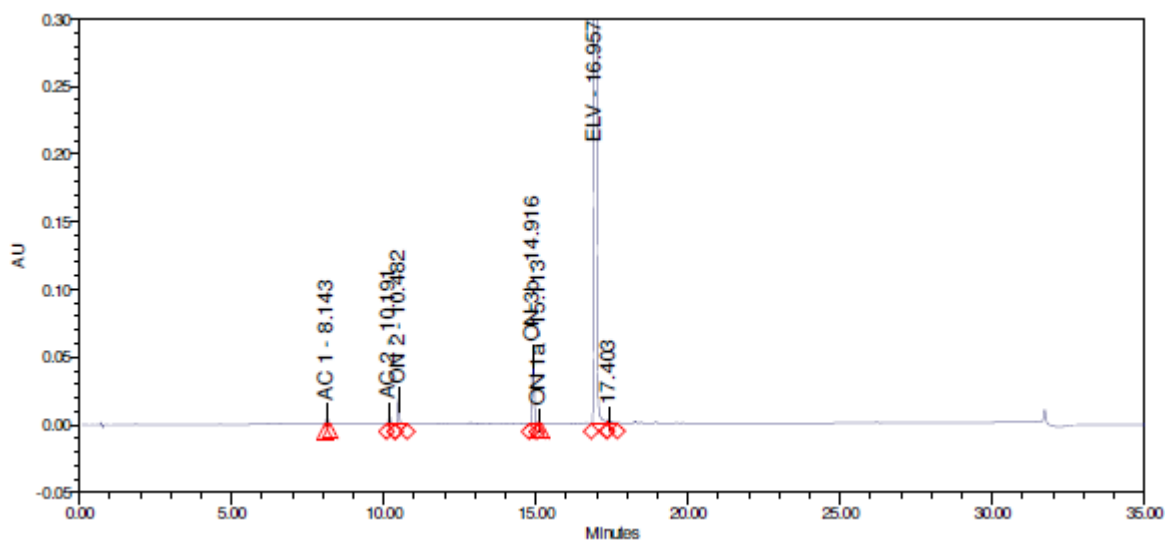
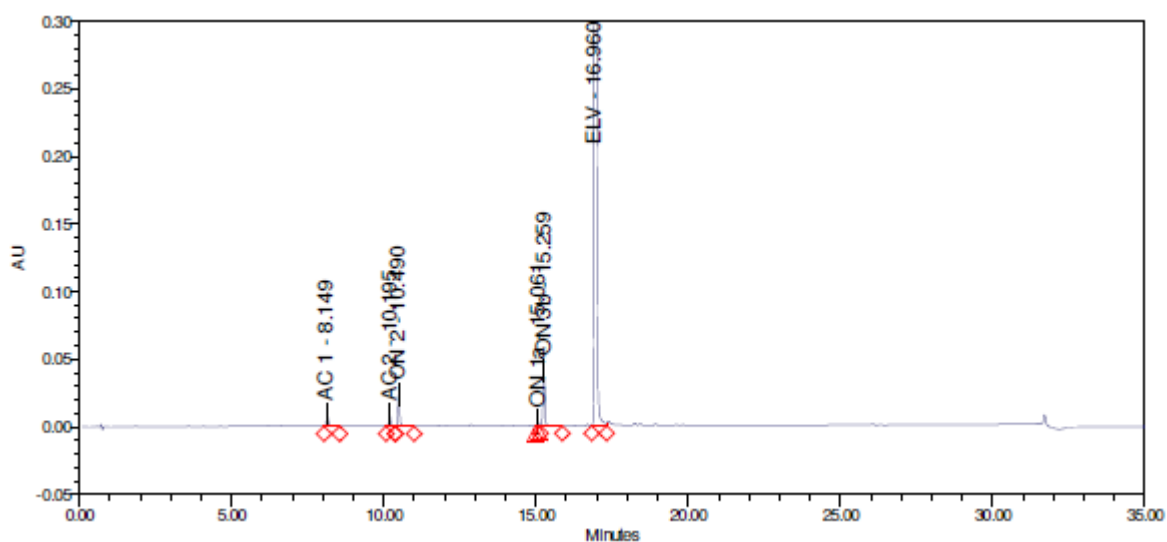
8.1.5. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D17. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D18. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$

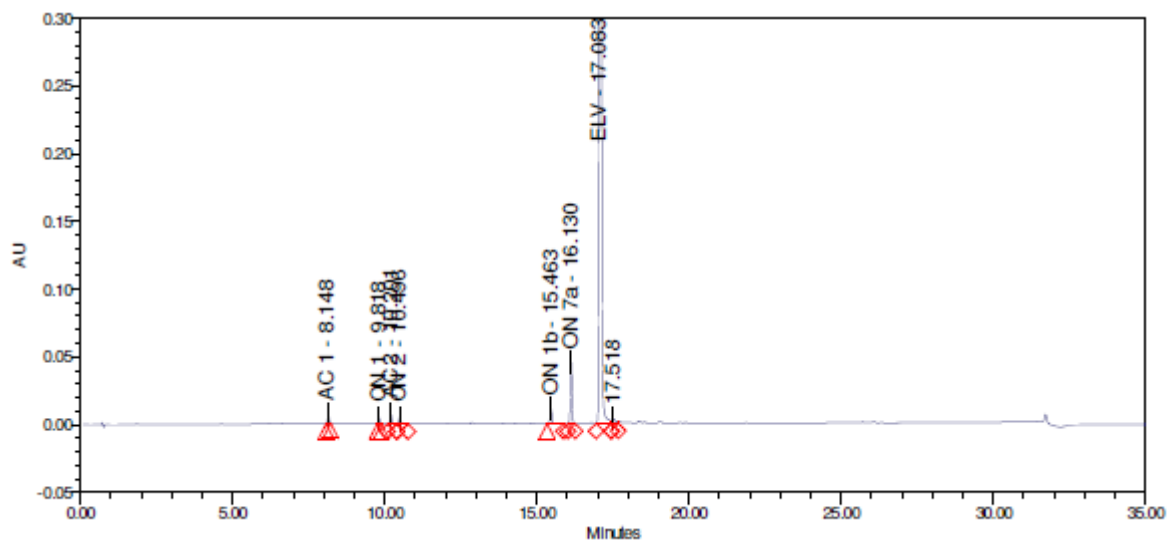


Slika D19. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i pH = 6,8

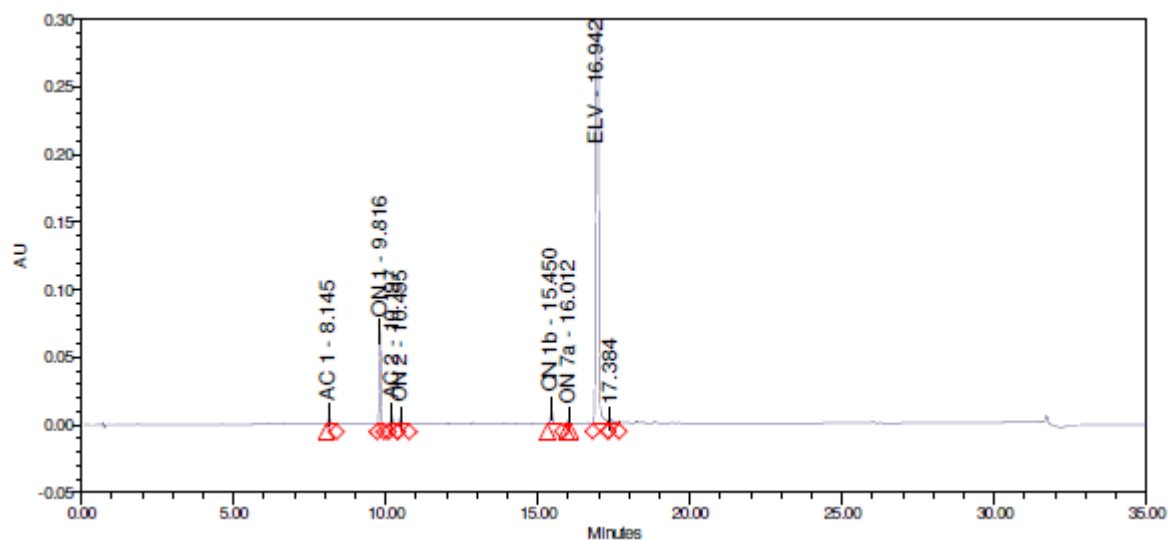


Slika D20. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i pH = 6,8

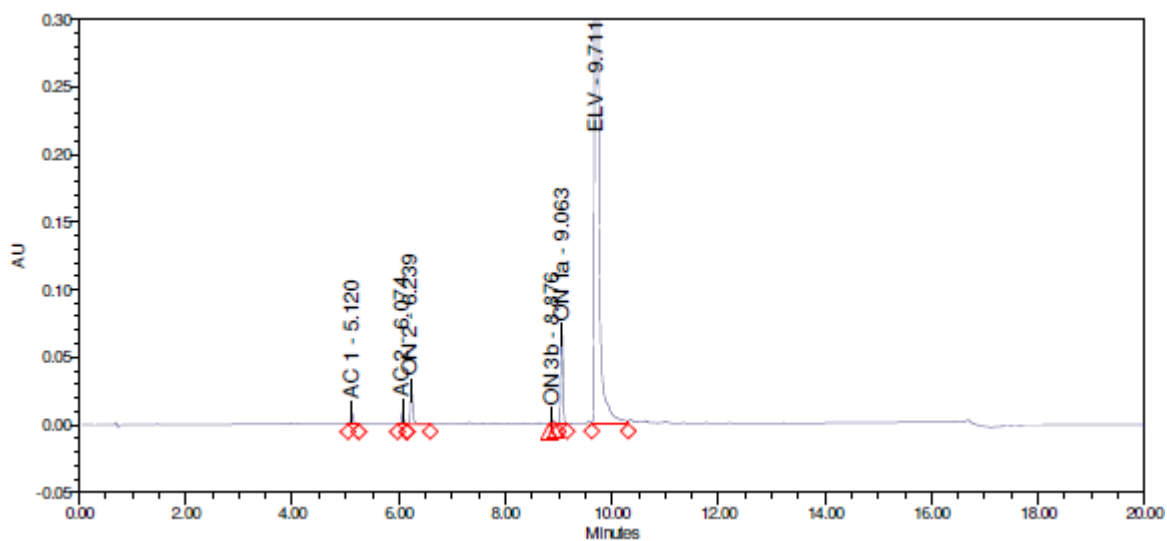
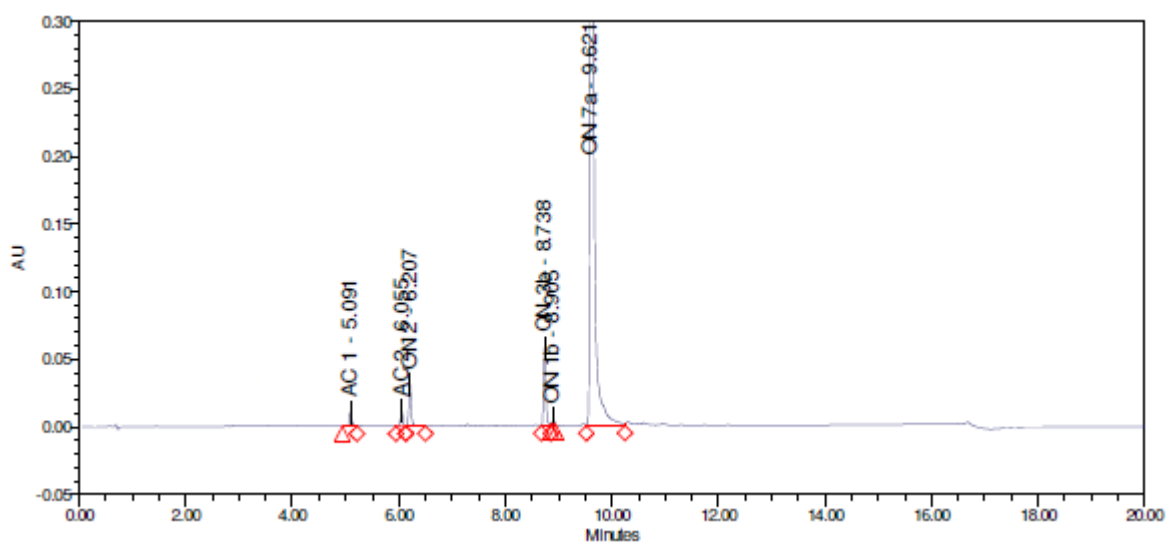
8.1.6. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D21. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D22. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$

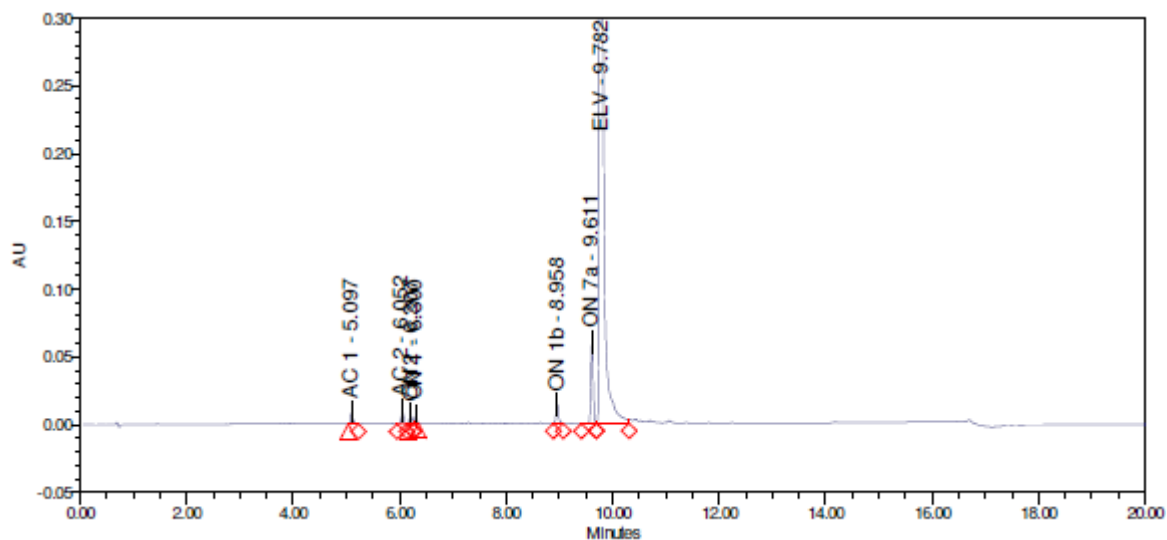


Slika D23. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 6,8

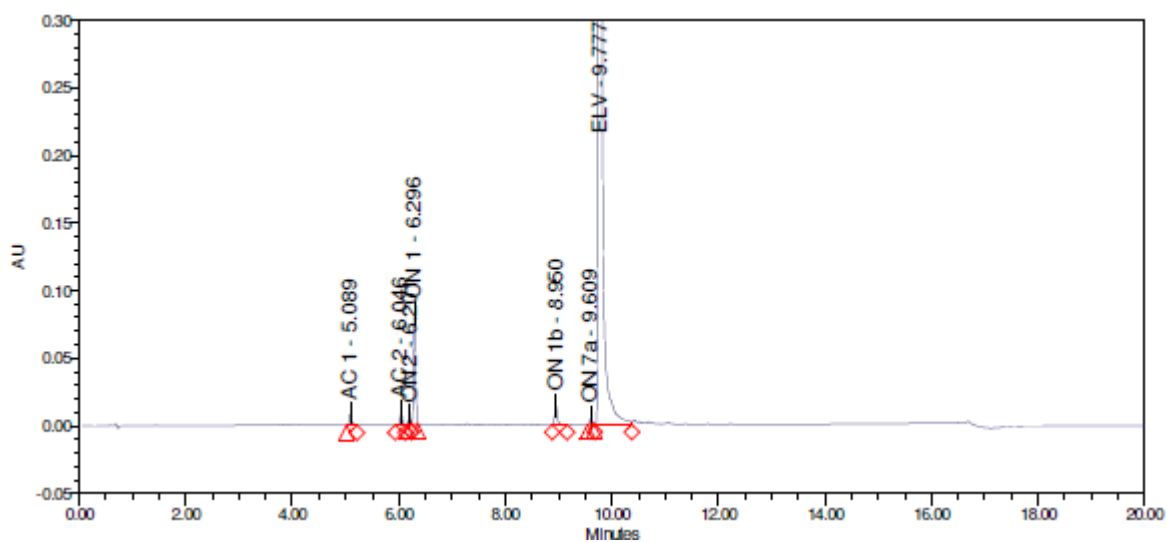


Slika D24. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 6,8

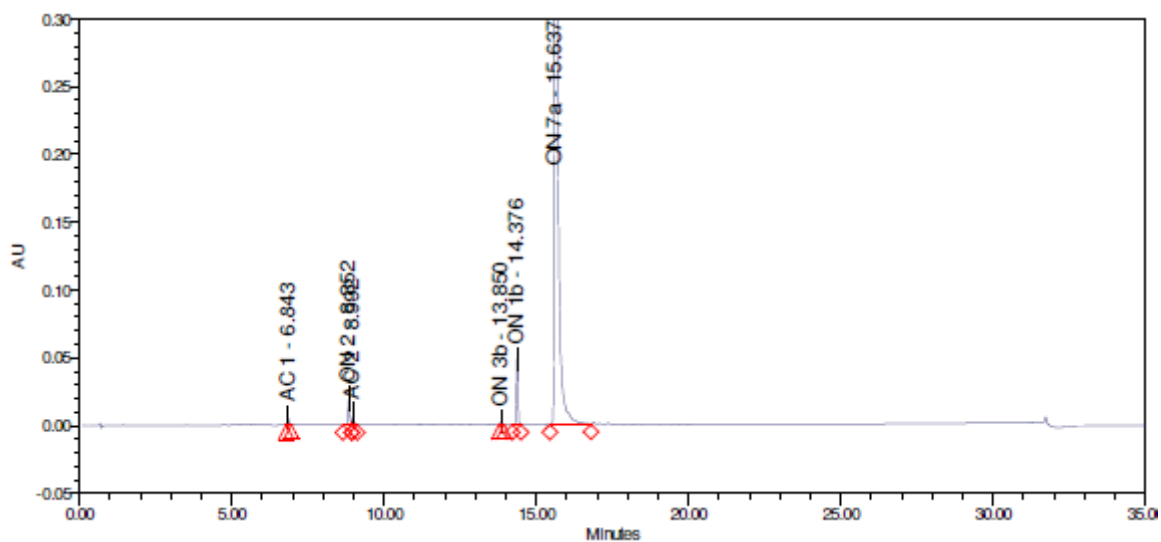
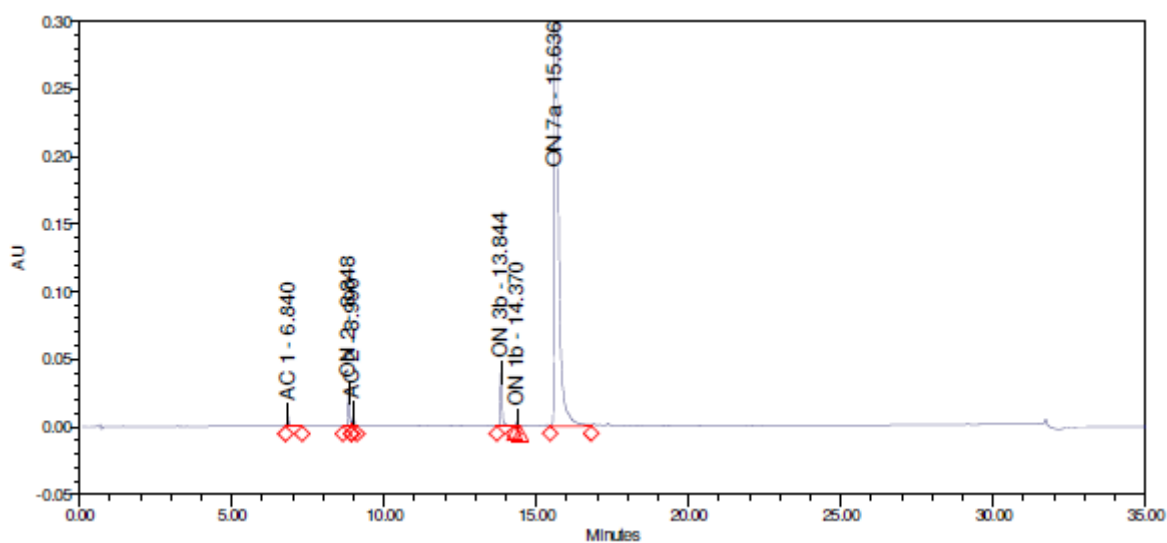
8.1.7. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D25. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D26. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$

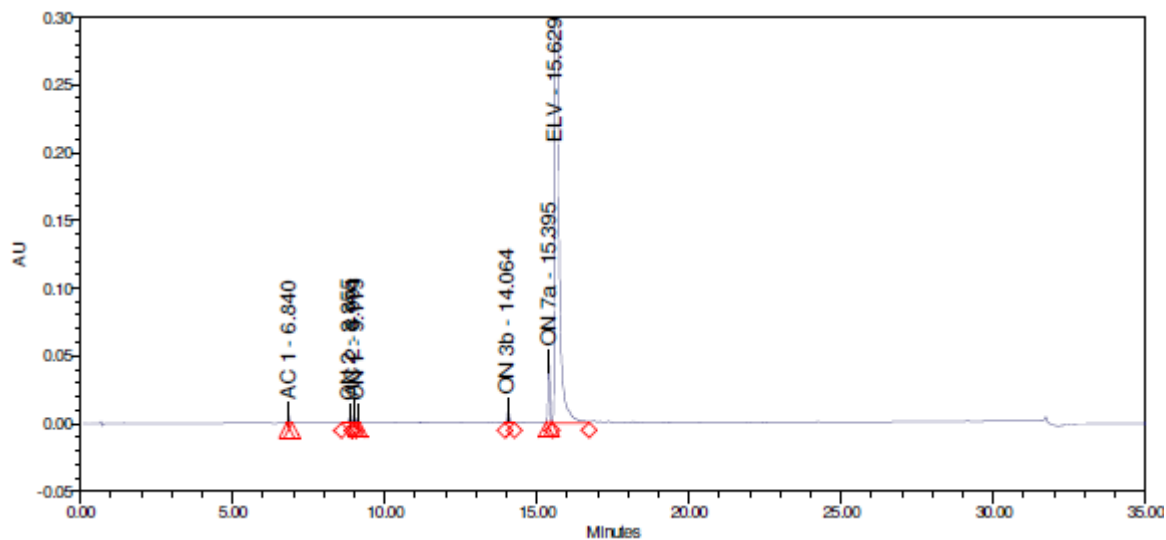


Slika D27. Kromatogram otopine IMP 2.1. pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 6,8

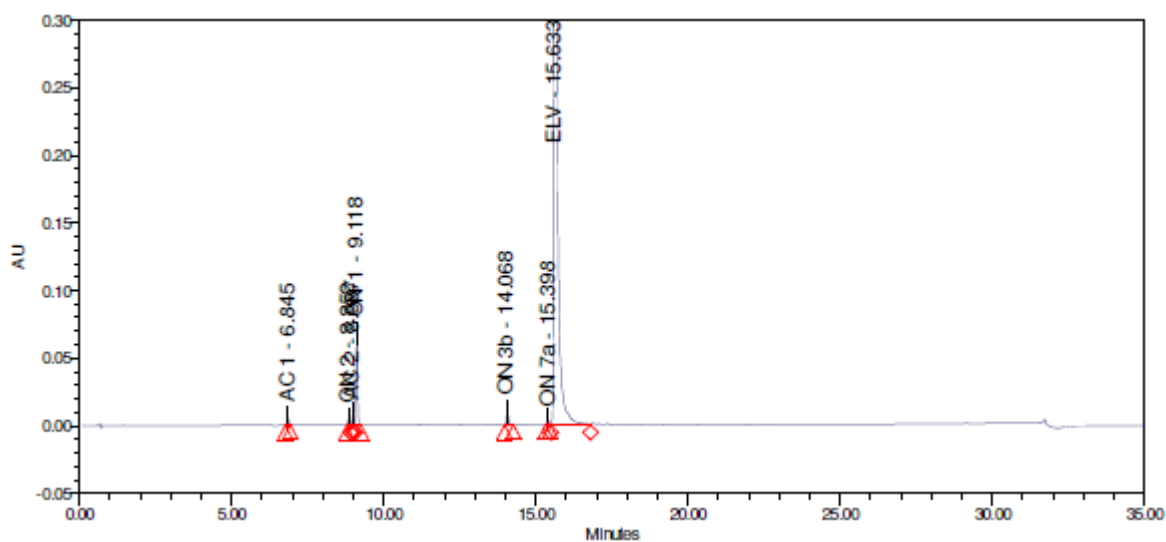


Slika D28. Kromatogram otopine IMP 2.2. pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i pH = 6,8

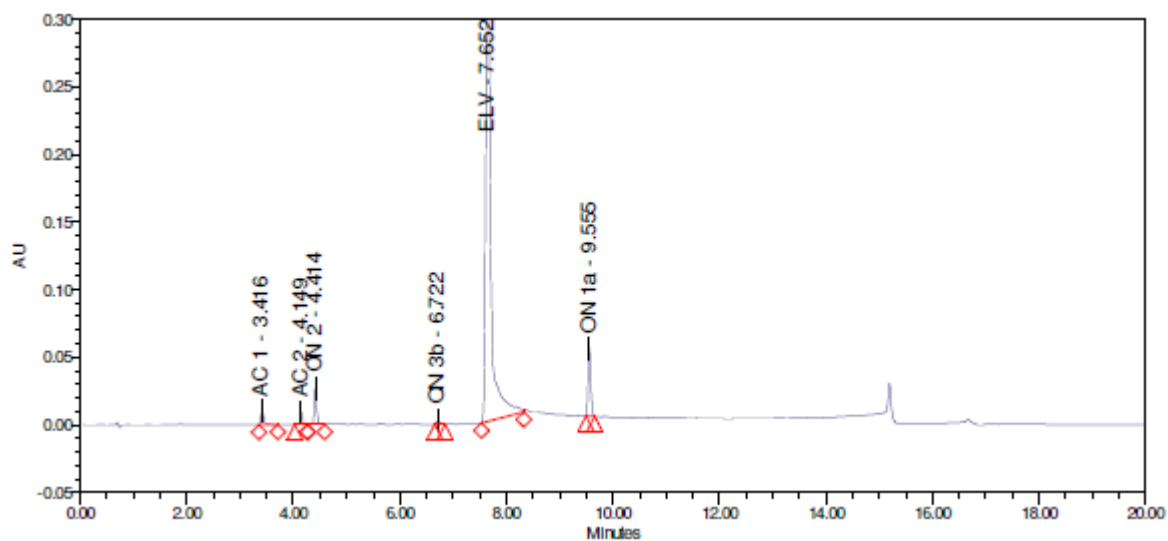
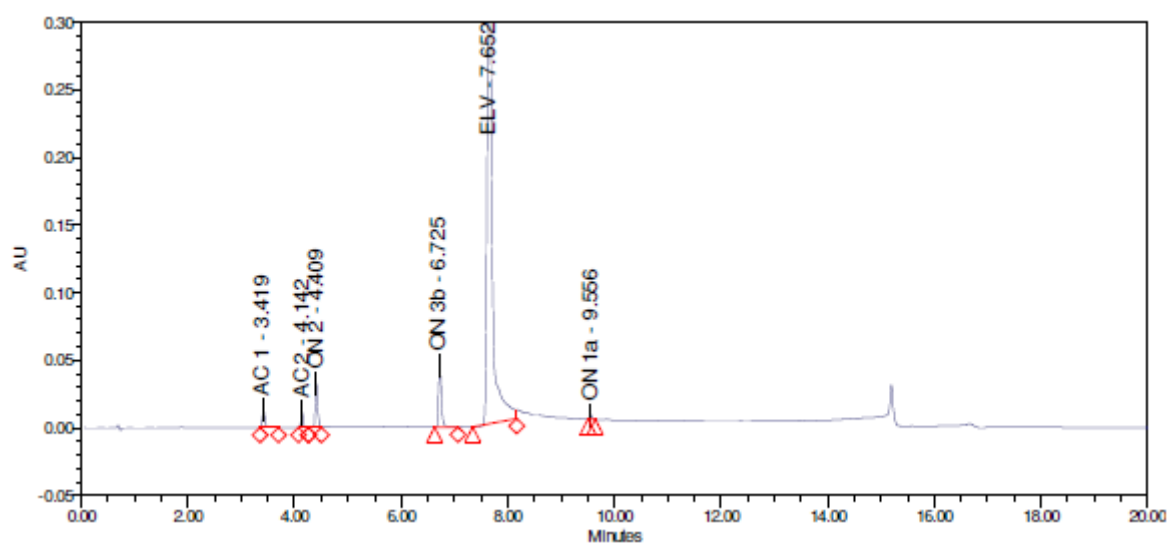
8.1.8. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D29. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$ Slika D30. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 6,8$

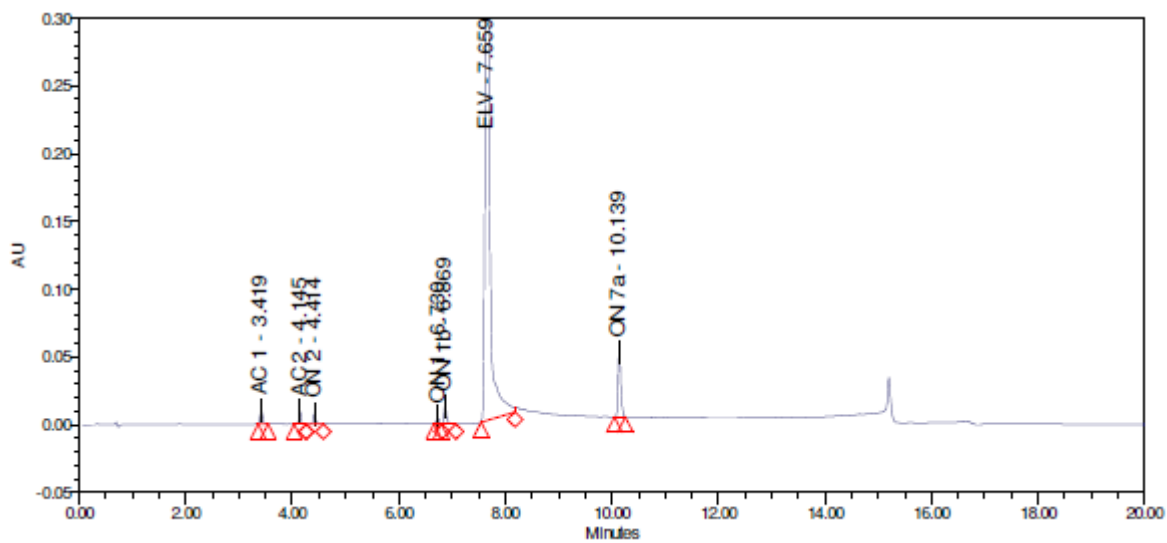


Slika D31. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i pH = 6,8

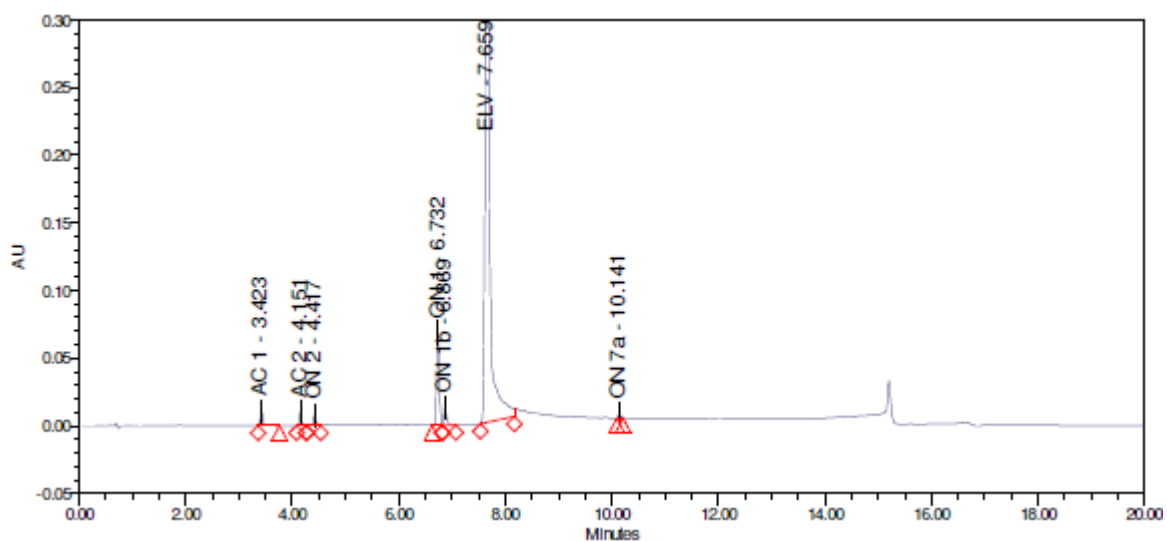


Slika D32. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i pH = 6,8

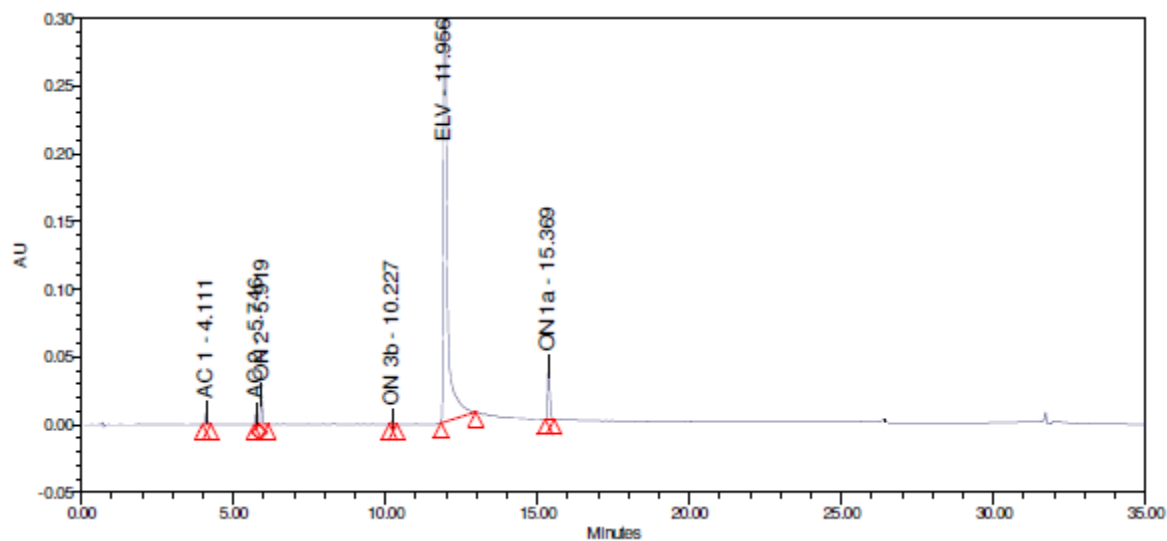
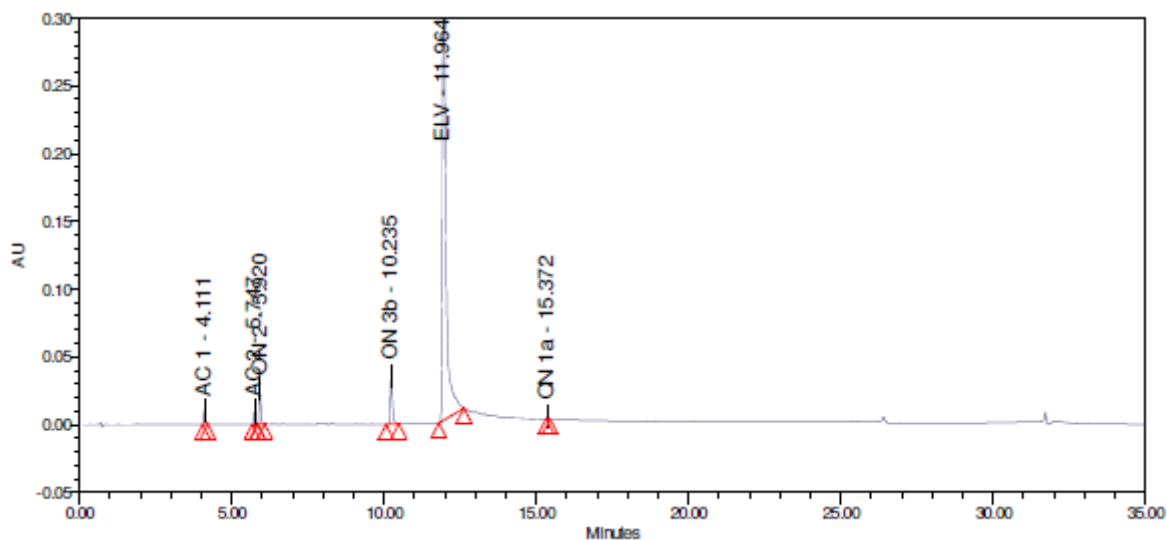
8.1.9. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D33. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D34. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$

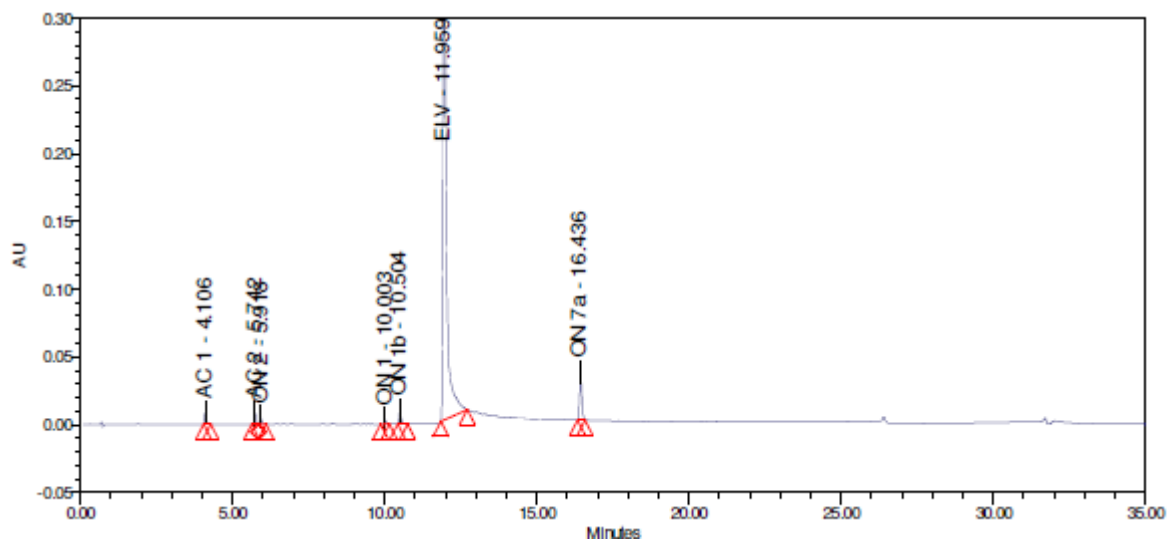


Slika D35. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i pH = 8,9

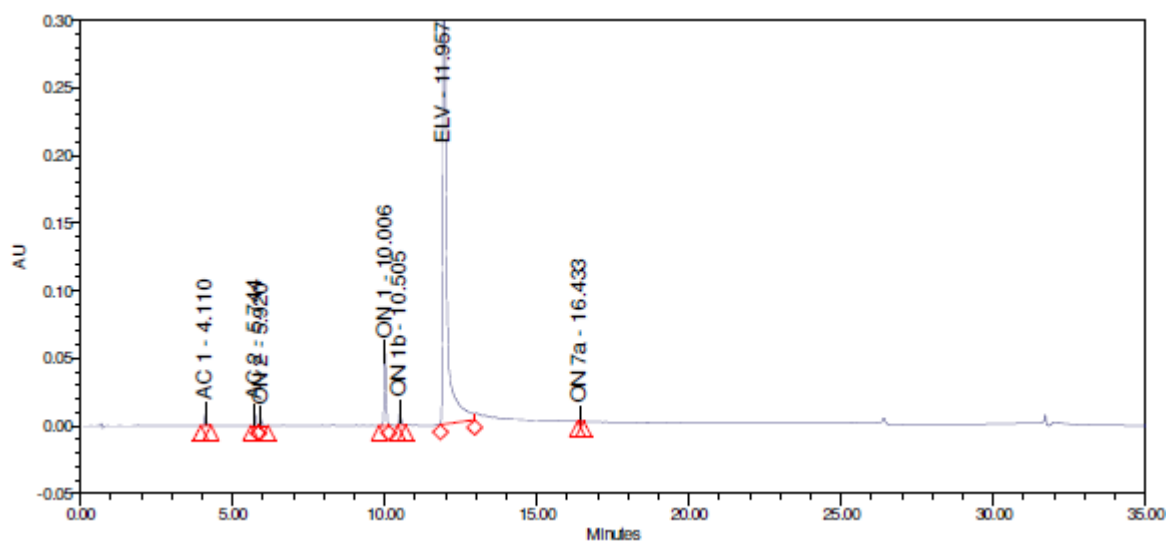


Slika D36. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 30$ °C i pH = 8,9

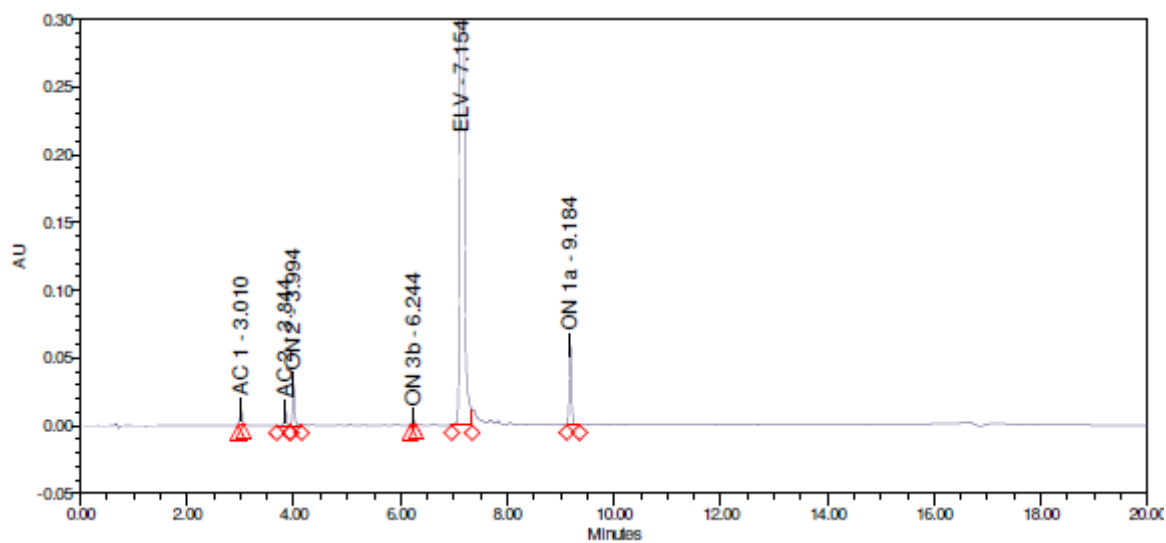
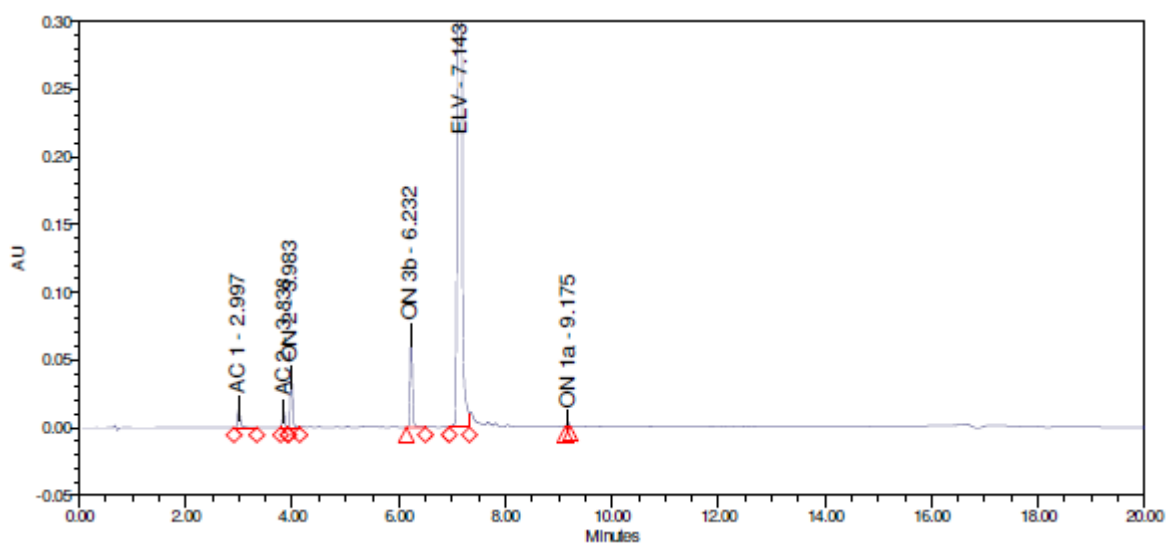
8.1.10. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D37. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D38. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$

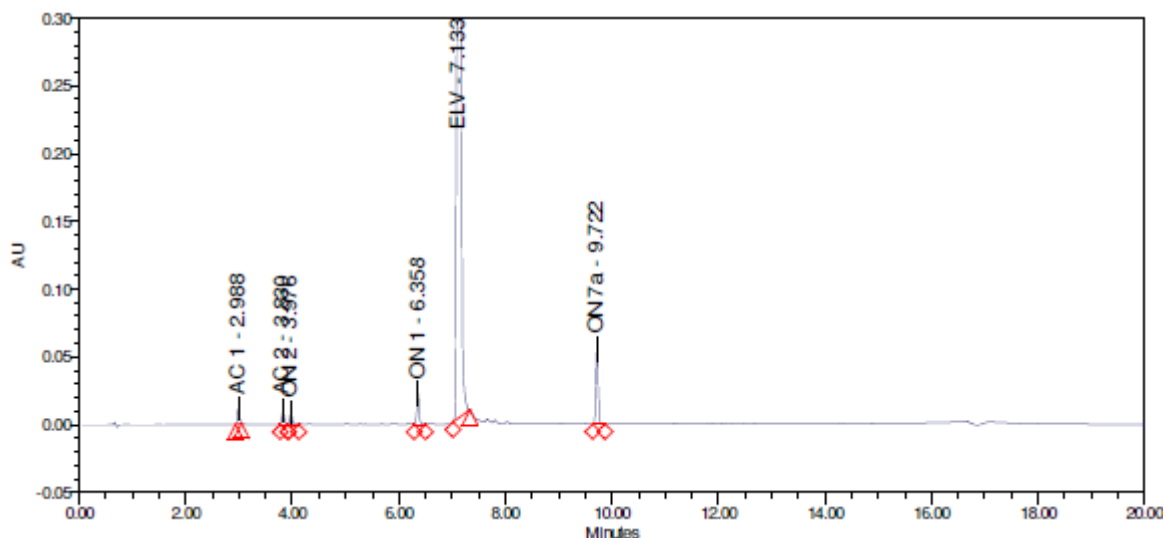


Slika D39. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 8,9

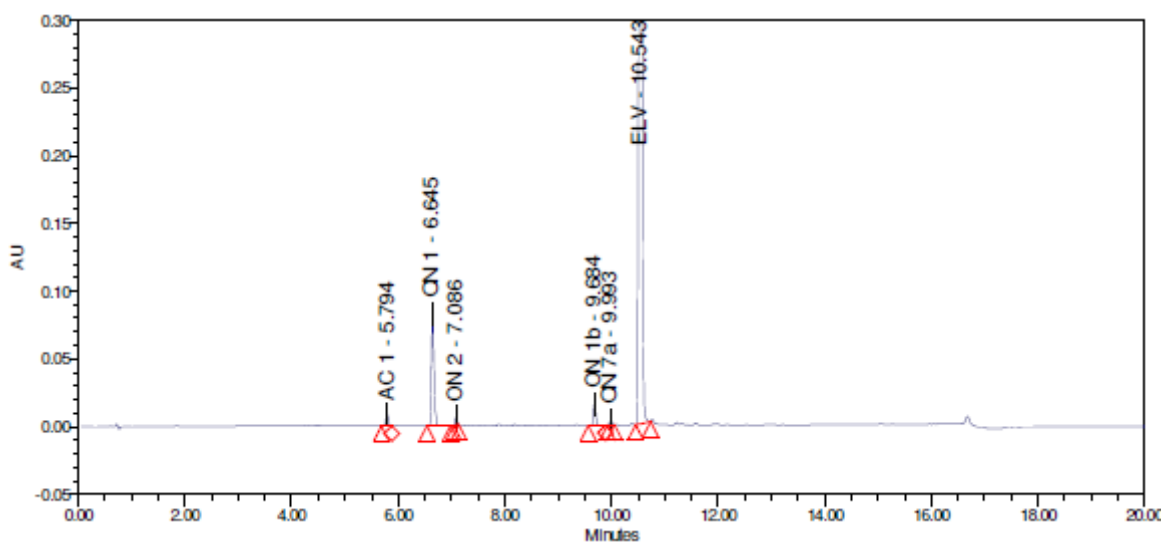


Slika D40. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 30$ °C i pH = 8,9

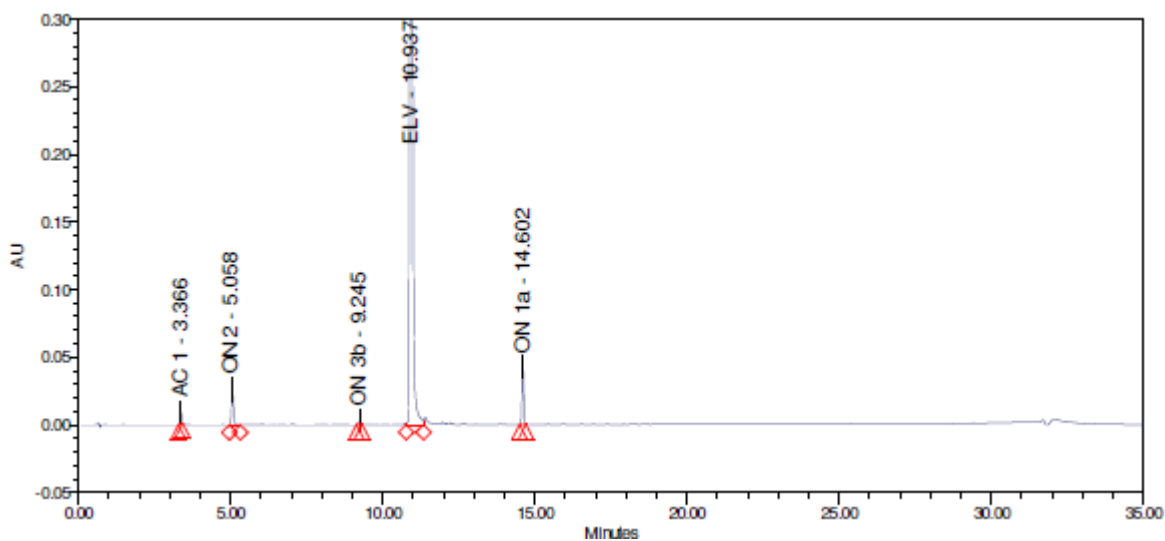
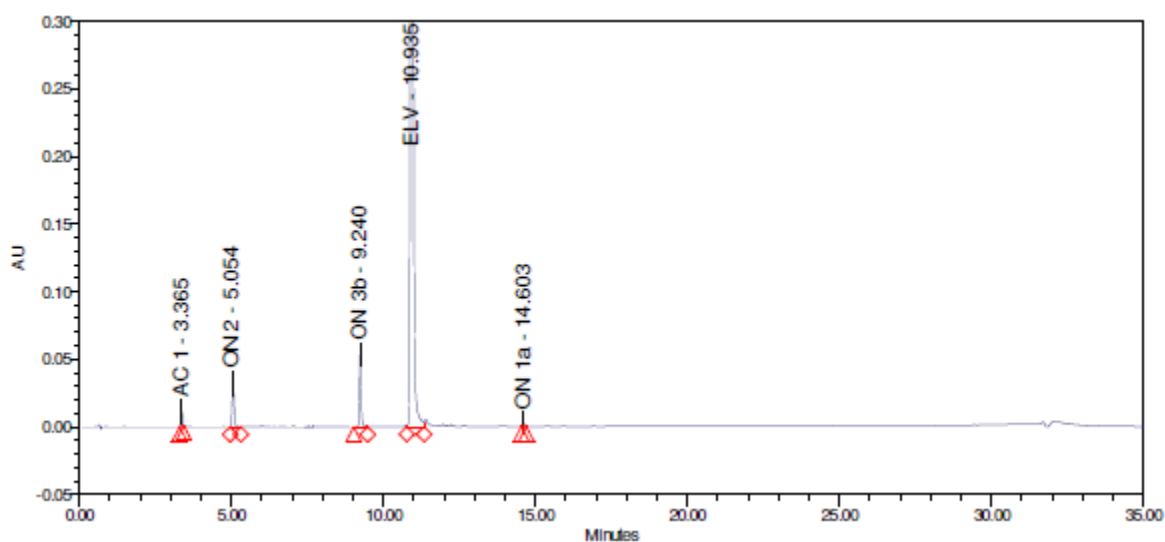
8.1.11. Kromatogrami pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D41. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D42. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 15 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$

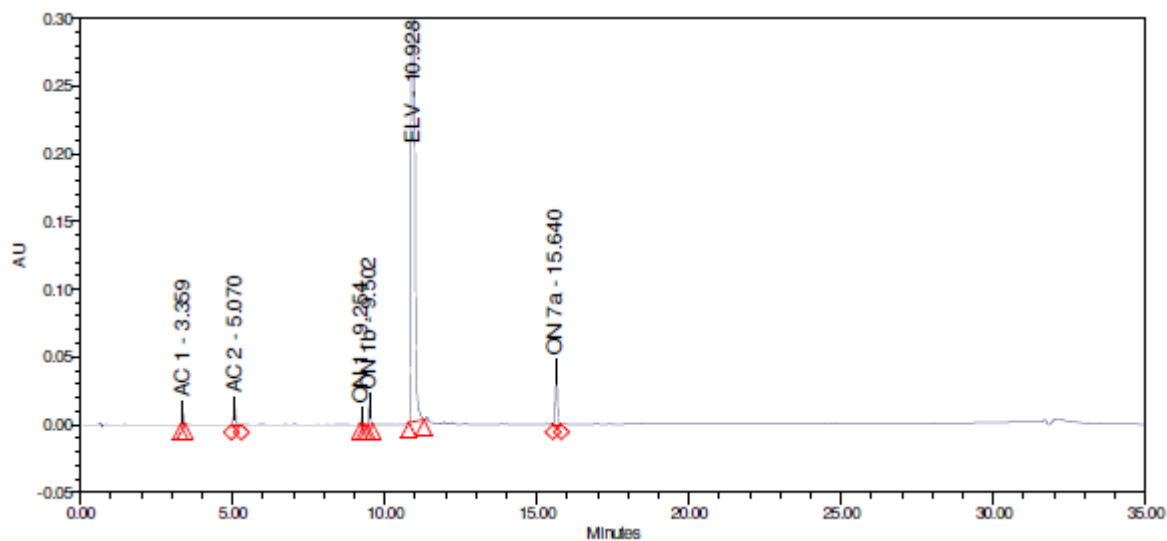


Slika D43. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 8,9$

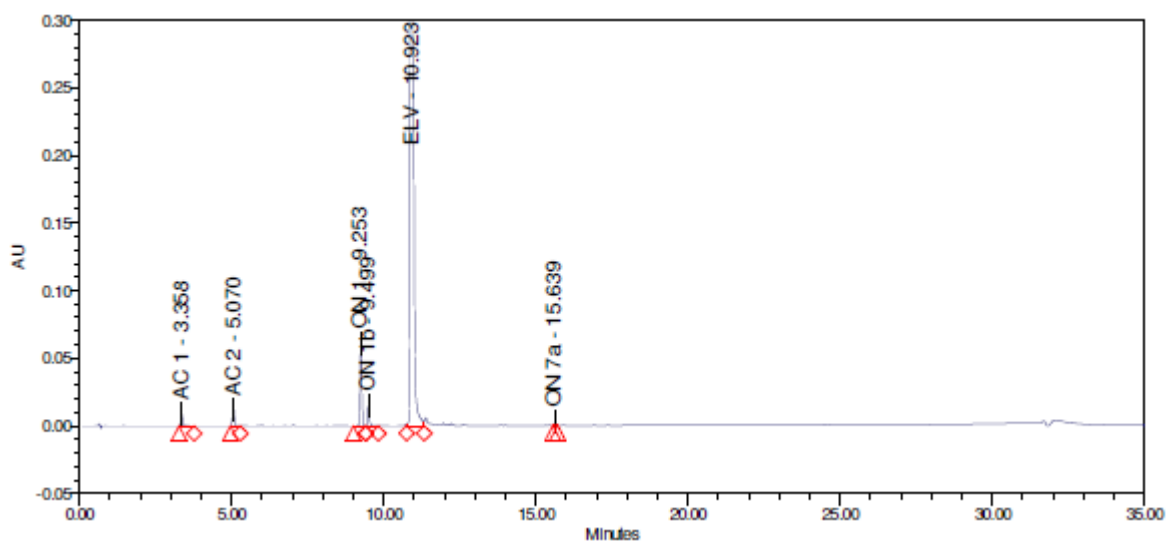


Slika D44. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 15$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 8,9$

8.1.12. Kromatogrami pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D45. Kromatogram otopine IMP 1.1 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$ Slika D46. Kromatogram otopine IMP 1.2 pri uvjetima $t = 30 \text{ min}$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 8,9$

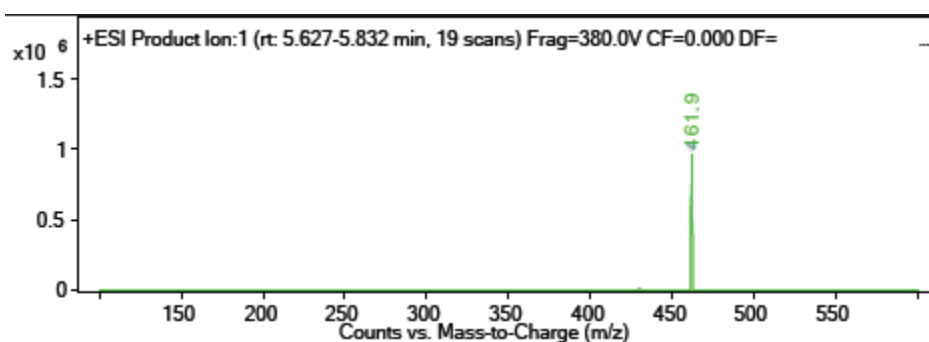


Slika D47. Kromatogram otopine IMP 2.1 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 8,9$

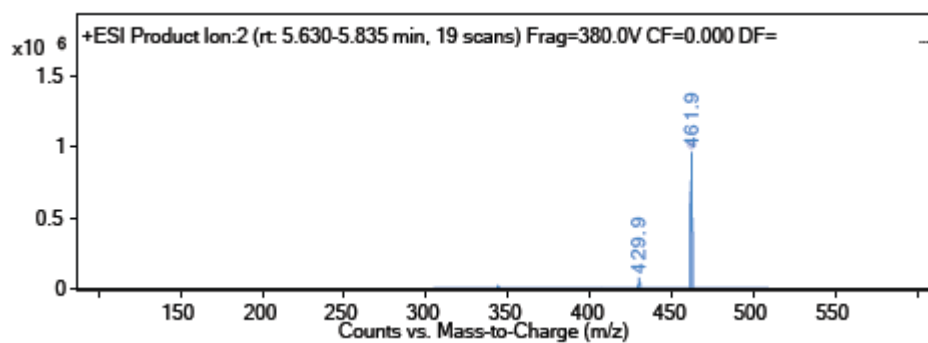


Slika D48. Kromatogram otopine IMP 2.2 pri uvjetima $t = 30$ min, $T = 60$ °C i $\text{pH} = 8,9$

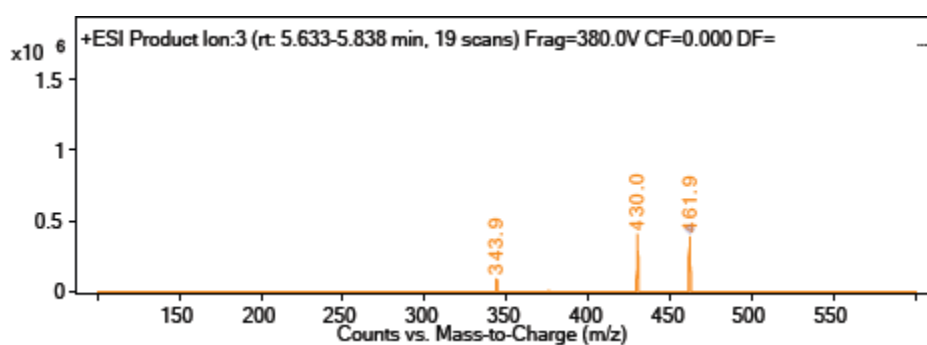
8.2. MS/MS spektri razgradnih produkata lijeka elvitegravira



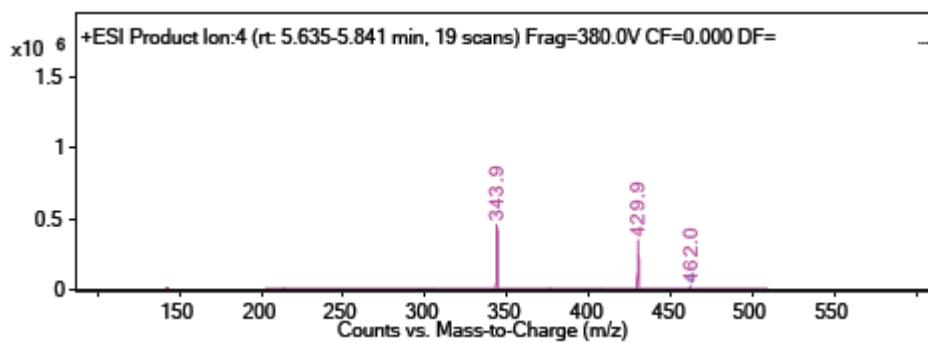
Slika D49. MS/MS spektar ON 1a pri energiji sudara 0 eV



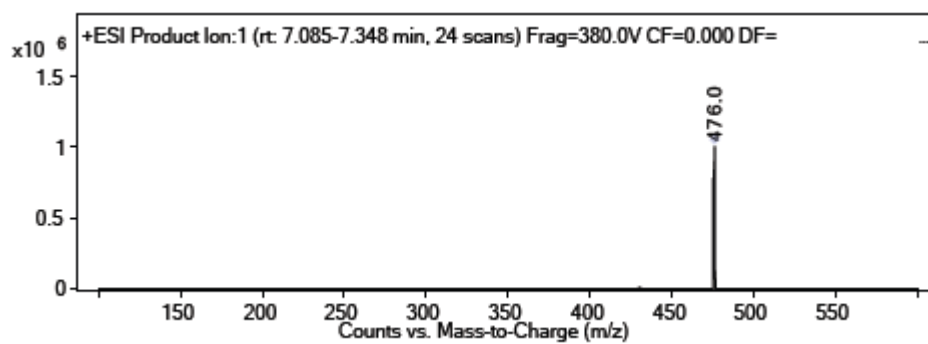
Slika D50. MS/MS spektar ON 1a pri energiji sudara 10 eV



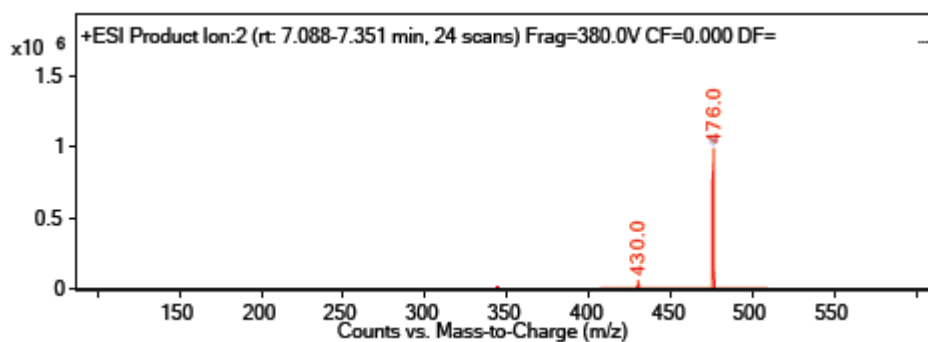
Slika D51. MS/MS spektar ON 1a pri energiji sudara 20 eV



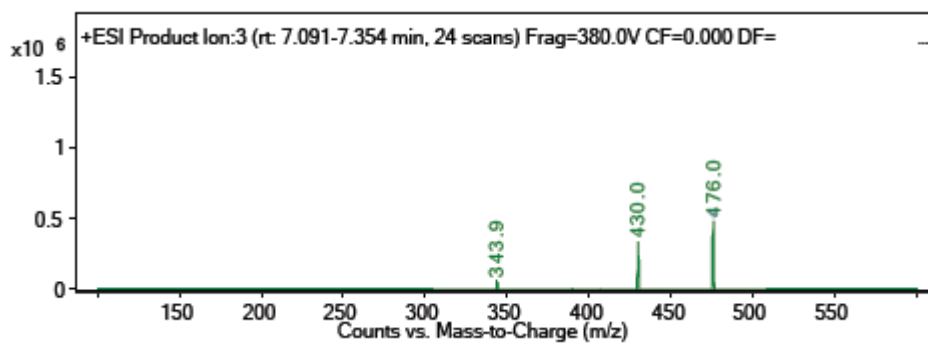
Slika D52. MS/MS spektar ON 1a pri energiji sudara 20 eV



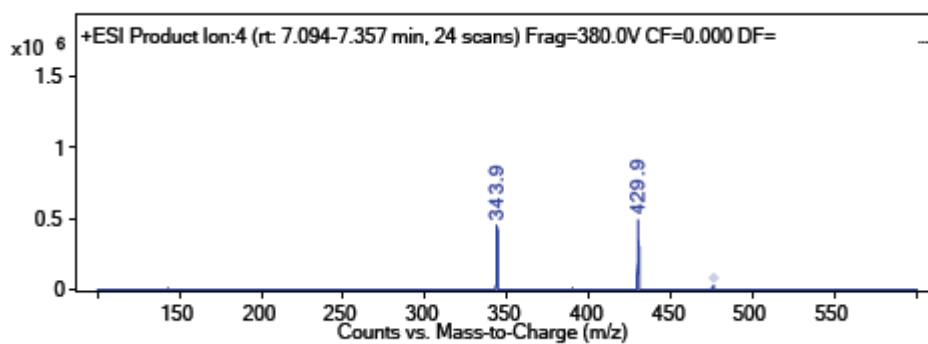
Slika D53. MS/MS spektar ON 7a pri energiji sudara 0 eV



Slika D54. MS/MS spektar ON 7a pri energiji sudara 10 eV



Slika D55. MS/MS spektar ON 7a pri energiji sudara 20 eV



Slika D56. MS/MS spektar ON 7a pri energiji sudara 30 eV

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Zlata Lasić

Datum rođenja: 09. veljače 1993.

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

Obrazovanje

2000.–2008. Druga osnovna škola Široki Brijeg, Bosna i Hercegovina

2008.–2012. Gimnazija fra Dominika Mandića, Široki Brijeg, Bosna i Hercegovina

2012.–2015. Preddiplomski studij kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu

Završni rad: Inhibicija enzima acetilkolinesteraze i antioksidacijsko djelovanje vodenog ekstrakta gorske metvice (*Calamintha nepetoides* Jord.), mentor: dr. sc. Franko Burčul

2015.-2018. Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

od ožujka, 2017. Članica volonterskog projekta Studentske sekcije HKD-a s ciljem popularizacije znanosti među djecom i mladima “Znanstvene čarolije“, Zagreb, Hrvatska

travanj, 2017. Otvoreni dan kemijskog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska

svibanj, 2017. Znanstveni piknik, kao članica Znanstvenih čarolija, Zagreb, Hrvatska

od rujna 2017. BASF Kid's Lab-Malci Genijalci, kao članica Znanstvenih čarolija, BASF Croatia, Zagreb, Hrvatska

Stručna praksa

svibanj, 2017.

Biokemijski laboratorij, Sveučilišna klinička bolnica Mostar,
Mostar, Bosna i Hercegovina

Radno iskustvo

od rujna, 2017

Rad u laboratoriju na odjelu TAPI Pliva R&D Analitika, Pliva
Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska