

**UNIVERZA V LJUBLJANI**

**FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**BARBARA ZOREC**

**RAZVOJ ANALITSKEGA POSTOPKA ZA DOLOČANJE  
GENOTOKSIČNIH ALKIL TOZILATOV S PLINSKO  
KROMATOGRAFIJO Z MASNO SELEKTIVNIM DETEKTORJEM**

**DETERMINATION OF GENOTOXIC ALKYL TOSYLATES BY THE  
GAS CHROMATOGRAPHY WITH THE MASS SELECTIVE  
DETECTOR: ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**Ljubljana, 2011**

Diplomsko nalogo sem opravljala v laboratorijih Razvojnega centra Slovenije, Lek farmacevtska družba d.d., pod mentorstvom doc. dr. Jožkota Cesarja, mag. farm. in somentorstvom dr. Miroslava Kovačeviča, univ. dipl. kem.

## **Zahvala**

Vsem sodelavcem oddelka Razvojna analitika farmacevtskih učinkovin Mengeš v Lekovem Razvojnem centru bi se rada zahvalila za vso znanje, pomoč in prijetno delovno okolje, ki so mi ga nudili v času mojega dela. Zahvala gre tudi mentorju doc. dr. Jožkotu Cesarju, mag. farm.

Predvsem bi se pa želela zahvaliti somentorju dr. Miroslavu Kovačeviču, univ. dipl. kem. za vodenje mojega praktičnega dela in pomoč pri interpretaciji rezultatov ter Damirju Orkiču za pomoč pri delu v laboratoriju.

Posebna zahvala pa gre družini, Bogdanu in vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani in naredili moja študentska leta nepozabna.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Jožkota Cesarja, mag. farm. in somentorstvom dr. Miroslava Kovačeviča, univ. dipl. kem.

# KAZALO VSEBINE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1 GENOTOKSIČNOST .....   | 1         |
| 1.1.1 Genotoksičnost v farmaciji .....   | 1         |
| 1.1.2 Genotoksičnost sulfonatnih estrov .....  | 2         |
| 1.2 REGULATORNI VIDKI GENOTOKSIČNIH NEČISTOČ .....                                   | 4         |
| 1.2.1 Testiranje genotoksičnih nečistot.....   | 4         |
| 1.2.2 Klasifikacija nečistot glede na njihovo genotoksičnost .....                   | 6         |
| 1.2.3 Smernice Evropske agencije za zdravila o omejitvi genotoksičnih nečistot ..... | 6         |
| 1.3 METIL, ETIL IN IZOPROPIL TOZILAT .....   | 10        |
| 1.3.1 Nastanek in lastnosti alkil tozilatov.....                                     | 10        |
| 1.4 VZOREC ATV-44.....   | 11        |
| 1.5 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE ALKIL TOZILATOV .....                               | 12        |
| 1.5.1 Kromatografske metode.....   | 12        |
| 1.5.2 Tekočinska kromatografija .....  | 13        |
| 1.5.3 Plinska kromatografija.....  | 14        |
| 1.5.4 Tehnika nadprostora.....   | 17        |
| <b>2. NAMEN DELA</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....  | <b>20</b> |
| 3.1 MATERIALI.....   | 20        |
| 3.1.1 Delovni standardi .....  | 20        |
| 3.1.2 Reagenti.....  | 20        |
| 3.1.3 Topila.....  | 20        |
| 3.1.4 Vzorec.....  | 20        |
| 3.2 APARATURE.....   | 21        |
| 3.3 METODE .....   | 21        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.3.1     | <i>Metoda direktnega injiciranja</i> .....   | 21        |
| 3.3.1.1   | Metoda "Full Scan" .....   | 22        |
| 3.3.1.2   | SIM metoda.....  | 22        |
| 3.3.2     | <i>Tehnika nadprostora z derivatizacijo s PFTP</i> .....                             | 23        |
| 3.3.2.1   | Metoda "Full Scan" .....   | 24        |
| 3.3.2.2   | SIM metoda.....  | 25        |
| <b>4.</b> | <b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....   | <b>26</b> |
| 4.1       | RAZVOJ METODE DIREKTNEGA INJICIRANJA .....   | 26        |
| 4.2       | RAZVOJ TEHNIKE NADPROSTORA Z DERIVATIZACIJO .....                                    | 31        |
| 4.2.1     | <i>Derivatizacija alkil tozilatov s PFTP</i> .....                                   | 31        |
| 4.2.2     | <i>Optimizacija instrumentalnih parametrov</i> .....                                 | 32        |
| 4.2.3     | <i>Optimizacija priprave raztopine reagenta PFTP</i> .....                           | 35        |
| 4.2.4     | <i>Vpliv dodatka vode na občutljivost metode</i> .....                               | 37        |
| 4.2.5     | <i>Vpliv časa reakcije na občutljivost metode</i> .....                              | 38        |
| 4.2.6     | <i>Vpliv časa reakcije in časa kondicioniranja vial na občutljivost metode</i> ..... | 40        |
| 4.2.7     | <i>Preverjanje ustreznosti analitskega postopka</i> .....                            | 45        |
| 4.2.7.1   | Meja zaznavnosti (detekcije) in meja določljivosti (kvantifikacije) .....            | 45        |
| 4.2.7.2   | Natančnost (ponovljivost) .....  | 46        |
| 4.2.7.3   | Točnost.....   | 47        |
| 4.2.7.4   | Linearnost.....  | 48        |
| <b>5.</b> | <b>SKLEP</b> .....   | <b>51</b> |
| <b>6.</b> | <b>LITERATURA</b> .....  | <b>53</b> |

## POVZETEK

V današnjem času regulatorni organi posvečajo posebno pozornost tistim nečistotam, za katere obstaja verjetnost, da so genotoksične. Njihova vsebnost v farmacevtskih izdelkih je omejena na zelo nizki (ppm) ravni. Zato si proizvajalci že tekom razvoja prizadevajo nadzorovati vsebnost (potencialno) genotoksičnih nečistoč v mejah, ki so varne za uporabnika. Tako je postala nadvse aktualna tudi analiza zelo nizkih koncentracij teh analitov z uporabo predvsem plinske (GC) in tekočinske kromatografije (HPLC), sklopljene z različnimi tehnikami detekcije, kot je masa spektrometrija (MS).

Alkil tozilati so znane genotoksične nečistoče, natančneje alkilirajoči agensi, ki lahko nastanejo kot stranski produkti pri sintezi zdravilnih učinkovin in sicer z reakcijo med kratkoveržnimi alkoholi in p-toluensulfonsko kislino. Lotili smo se določanja alkil tozilatov v vzorcu ATV-44 in sicer z razvojem direktne GC-MS metode in HS-GC-MS metode z derivatizacijo. Pri direktnem injiciranju standardnih raztopin smo dosegli ločbo metil, etil in izopropil tozilata. Vendar pa smo pri injiciranju vzorca opazili, da matriks močno moti analizo in pri vzorcu z dodanim standardom zelo zniža odziv. Ugotovili smo, da metoda direktnega injiciranja ni primerna za določanje tozilatov v vzorcu ATV-44, saj je vpliv matriksa prevelik. Hkrati pa s tako metodo zelo onesnažimo sistem in skrajšamo življensko dobo kolone.

Uspešno smo razvili in optimizirali HS-GC-MS metodo derivatizacije s PFTP. Tukaj z reakcijo, ki poteka v HS viali, z reagentom PFTP alkil tozilate pretvorimo v tiofenilne etre, ki jih nato detektiramo. Proučili smo vpliv različnih faktorjev (količine reagenta in baze, časa reakcije, časa kondicioniranja vial, dodatka vode) na reakcijo in posledično na odziv analitov. Uspešno smo razvili metodo za določanje 1 ppm alkil tozilatov v vzorcu ATV-44, kar je v skladu s strogimi zahtevami za določanje genotoksičnih nečistot. Pri preverjanju ustreznosti metode smo preverili ponovljivost, linearnost, mejo kvantifikacije in točnost. Vrednosti vseh naštetih parametrov so bile znotraj kriterijev, postavljenih pred analizo.

Dokazali smo ustreznost razvite HS-GC-MS metode in hkrati odsotnost metil, etil in izopropil tozilata v vzorcu ATV-44.

## ABSTRACT

Regulatory authorities pay special attention to those impurities which are likely to be genotoxic. Their content in pharmaceutical products is limited to very low (ppm) level. Therefore, manufacturers make effort to control the content of (potentially) genotoxic impurities during the development in the limits that are safe for the user. This leads to increased interest for the analysis of very low concentration these analytes using a specialy gas (GC) and high pressure liquid chromatography (HPLC), coupled with various detection techniques such as mass spectrometry (MS).

Alkyl tosylates are known genotoxic impurities, more alkylating agents, which may occur as byproducts in the synthesis of active substances through the reaction of short chain alcohols and p-toluensulfonic acid. We started the determination of alkyl tosylates in the sample ATV-44 through the development of direct GC-MS method and the HS-GC-MS method with derivatization. By the direct injection of standard solutions we achieved separation of methyl, ethyl and isopropyl tosylates. However, we noticed a large matrix effect on response by injection of the sample. Matrix is very interfering with the analysis and by the spiked sample greatly reduces the response. We found that direct injection method is not suitable for the determination of tosylates in ATV-44, because the influence of the matrix is too large. And with such method we can also highly pollute the system and shorten the lifetime of the column.

We have successfully developed and optimized HS-GC-MS derivatization method with PFTP. This is a reaction that happens in the HS vial through the reaction between alkyl tosylates and PFTP reagent in such a way that alkilate a PFTP. We examined the impact of different factors (amount of reagent and base, reaction time, vial conditioning time, addition of water) on the reaction and consequently the response of the analytes. We wanted to reach the lowest limit of quantification possible (1 ppm), which is required for genotoxic impurities. So we developed a method for successful determination of alkyl tosylates in ATV-44 in ppm level. When checking the adequacy of the method was verified repeatability, linearity, limit of quantification and accuracy. The values of these parameters are within the criteria set prior to analysis.

We demonstrated the relevance of developed HS-GC-MS method and also the absence of methyl, ethyl and isopropyl tosylates in the sample ATV-44.

## SEZNAM OKRAJŠAV

- API - aktivna farmacevtska učinkovina (*Active Pharmaceutical Ingridient*)
- ALARP - kolikor je razumno izvedljivo (*As Low As Reasonably Possible*)
- CHMP - odbor za zdravila in izdelke za uporabo v humani medicini
- CI - kemijska ionizacija
- DNK – deoksiribonukleinska kislina
- ECD – detektor na zajetje elektronov (*Electron Capture Detector*)
- EI - ionizacija z elektroni
- EMA – Evropska agencija za zdravila
- FID – plamensko ionizacijski detektor (*Flame Ionization Detector*)
- GC - plinska kromatografija (*Gas Chromatography*)
- HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*High Performance Liquid Chromatography*)
- HS – tehnika nadprostora (*Headspace*)
- ICH – Mednarodna konferenca o harmonizaciji (*International Conference on Harmonisation*)
- LOEL – najnižja koncentracija pri kateri zaznamo učinek (*Lowest Observed Effect Level*)
- $m/z$  – razmerje med maso in nabojem
- MS – masna spektrometrija (*Mass Spectrometry*)
- NOEL – najvišja koncentracija, pri kateri še ne zaznamo učinka (*No Observed Effect Level*)
- NPD - *Nitrogen Phosphorus Detector*
- PDE – dovoljena dnevna izpostavljenost (*Permitted Dayl Exposure*)
- PFTP - pentafluorotiofenol
- PhRMA - *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*
- RSD – realtivni standardni odklon (*Relative Standard Deviation*)
- RT – retencijski čas
- S/N – razmerje signal/šum (*Signal to noise*)
- SIM – spremljanje posameznega iona (*Single Ion Monitoring*)
- S<sub>N</sub>1 – nukleofilna substitucija, unimolekularna
- S<sub>N</sub>2 – nukleofilna substitucija, bimolekularna
- TCD - toplotno prevodni detektor (*Thermal Conductivity Detector*)
- TIC – celokupen ionski tok (*Total ion current*)

TTC – vrednost toksikološke zaskrbljenosti (*Threshold of Toxicological Concern*)

ZU – zdravilna učinkovina





## 1. UVOD

### 1.1 GENOTOKSIČNOST

Pojem genotoksičnost opisuje škodljive dejavnike na genski material celic. Genotoksične snovi so tiste, ki vplivajo na genski material tako, da povzročajo mutacije, aberacije in delecije. Mutacije so trajne dedne spremembe genoma, ki jih povzročijo različni mutageni dejavniki. Ti so lahko kemijski (vplivi spojin npr. sulfonati in snovi npr. azbest), fizikalni (različna sevanja) ali biološki (virusi). Bistvena posledica vpliva mutagenih dejavnikov je sprememba zgradbe in količine dednega materiala.

Mutacije se pojavljajo na različnih ravneh in so lahko:

- genske ali točkaste: pride do spremembe v zgradbi gena, zamenjava, izpad ali vrinjenje nukleotidov,
- kromosomske: pride do spremembe strukture kromosoma (nastajajo v mejozi), kromosomski prelomi, podvojitve dela kromosoma, premestitev dela kromosoma na drug kromosom,
- genomske: pride do spremembe v številu kromosomov (nastajajo pri mejozi in tudi pri mitozih), nastanek triploidnih celic. (1)

Najpogostejše so genske mutacije. Za njih so značilne preureditve nukleotidov, kovalentne vezave različnih spojin ali vstavljanje le-teh v DNK med replikacijo. Mutacije se lahko pojavijo tudi posredno z aktiviranjem celice tako, da sama proizvaja genotoksične snovi. Te spremembe na genskem materialu, ki jih povzroči izpostavljenost že zelo nizkim koncentracijam genotoksinov, lahko vodijo do rakavih obolenj.

Genotoksične snovi lahko najdemo tako v hrani, vodi, zraku, prehranskih dopolnilih, kot tudi v farmacevtskih izdelkih. Prav zaradi tega je identifikacija genotoksičnih spojin zelo pomembna, čemur sledi spremljanje in nadzor le-teh na zelo nizkih koncentracijah. (2)

#### 1.1.1 Genotoksičnost v farmaciji

Genotoksičnim snovem, znanim kot genotoksične nečistote, namenjamo v farmaciji vedno več pozornosti. Te snovi namreč predstavljajo veliko tveganje za uporabnike farmacevtskih izdelkov. Genotoksične primesi se v teh izdelkih lahko znajdejo iz različnih vzrokov, vključno z vnosom iz izhodnih materialov, reagentov, intermediatov, topil do nezaželenih stranskih reakcij in posledično produktov aktivne farmacevtske učinkovine

(*Active pharmaceutical ingredient*, API), ki se prenesejo v končni proizvod. Poleg tega lahko sam API razpade na genotoksične nečistote ali nastane v končni obliki zdravila z reakcijo med API-jem in pomožnimi snovmi ali ovojnino. Te snovi so reaktivne in lahko zlahka reagirajo z genskim materialom in povzročajo veliko škodo uporabnikom, če se prenesejo v končne farmacevtske izdelke. (2)

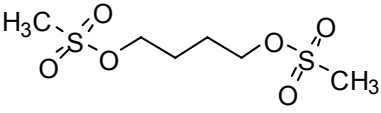
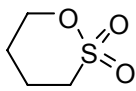
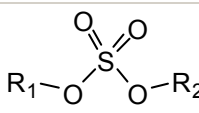
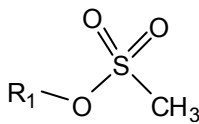
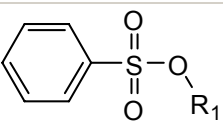
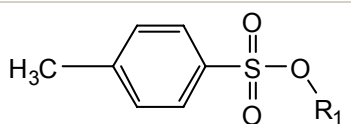
Če genotoksična nečistota nastane med sintezo, se lahko odpravi s spreminjanjem sintezne poti ali z uporabo drugih reagentov. Zaželeno je predvsem opozorilo na morebiten genotoksični reagent že takoj po uporabi, da se lahko teh snovi uspešno znebimo pri poznejših reakcijah. Vendar pa to ni vedno izvedljivo, saj je lahko sinteza API-ja precej zapletena in omejena na točno določene reagente, ki so pri reakciji kemijsko najbolj uporabni. Velik pomen v nadzoru genotoksičnih nečistot ima tudi uvedba postopkov čiščenja API-ja, kjer se teh nečistot uspešno znebimo. Če navedeno ni učinkovito ali če genotoksične oblike nečistot nastanejo po sami sintezi (razgradnja API ali interakcije s pomožnimi snovmi), jih je potrebno vseskozi ovrednotiti in spremljati njihovo koncentracijo. (2)

Dodatno delo, ki zajema predvsem razvoj analitskih metod, validacijo in redno testiranje bistveno podaljša razvoj API-ja. Več časa in sredstev pa še dodatno podaljša čas, ko bodo zdravila dosegla trg in to pomeni tudi povišanje stroškov razvoja zdravil.

### **1.1.2 Genotoksičnost sulfonatnih estrov**

Različni sulfonati in sulfatni estri so znani kot rakotvorne ali mutagene snovi, ki delujejo neposredno kot alkilirajoči agensi na DNK. Sem spadajo spojine, ki so prikazane v tabeli I.

Tabela I: Genotoksični sulfonatni estri (alkilirajoči agensi)

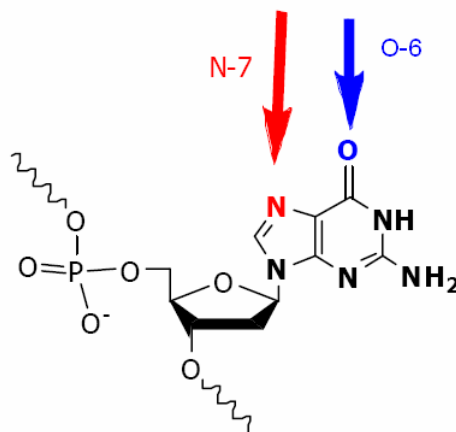
|  |   |
|--|---|
| <b>butan-1,4-diil dimetansulfonati</b> |   |
| <b>1,3-propan sultoni</b>              |  |
| <b>dialkil sulfati</b>                 |  |
| <b>alkil metansulfonati</b>            |  |
| <b>alkil benzensulfonati</b>           |  |
| <b>alkil p-toluensulfonati</b>         |  |

Alkiliranje genskega materiala je v organizmu običajen proces, ki lahko poteka pri ekspresiji in replikaciji genskega materiala. Vendar pa v telesu prihaja tudi do spontanil alkiliranj DNK in hkrati do mutacij. K sreči obstajajo reparacijski mehanizmi, ki te mutacije uspešno odpravijo brez trajnih posledic.

Normalno alkiliranje lahko ovira izpostavljenost kemičnim alkilirajočim sredstvom, saj lahko med replikacijo pride do zamenjave osnovnih baznih parov. Napačno bazno zaporedje se lahko odraža kot nepravilno zaporedje aminokislin v proteinih, kar lahko pomeni prenehanje delovanja ali napačno delovanje teh proteinov. Poleg tega se lahko te napake ponovijo pri naslednjem kopiranju verige, kar lahko povzroči trajno mutacijo. (3)

Genotoksičnost narašča z izpostavljenostjo alkilirajočim snovem in je hkrati tesno povezana s stopnjo reakcije na O-6 in N-7 položaju na gvanozinu, kot je prikazano na sliki 1. Za alkil metansulfonate in p-toluensulfonate je znano, da alkilirajo tako kisik kot tudi dušik, pri čemer se obseg in mesto vezave zelo razlikujeta glede na organizem, testne pogoje in strukturo sulfonatnega estra. Sekundarni alkil metansulfonati so močna alkilirajoča sredstva, ki pretežno reagirajo po S<sub>N</sub>1 mehanizmu, kar omogoča večjo

alkiliranje na O-6 položaju gvanozina. Kompetitivna reakcija je hidroliza teh sekundarnih estrov, vendar najverjetneje ne zadošča za nevtralizacijo njihove visoke alkilirajoče aktivnosti. Primarni alkil metansulfonati reagirajo po  $S_N2$  mehanizmu na gvanozinski N-7, delno pa pride tudi do alkiliranja na O-6. Slednje še posebej velja za metil in etil metansulfonat, ki sta zelo močni alkilirajoči sredstvi. (3,4)



Slika 1: Mesti alkiliranja deoksigvanozina (4)

## **1.2 REGULATORNI VIDKI GENOTOKSIČNIH NEČISTOČ**

Farmacevtska industrija in regulatorni organi se strinjajo o omejitvi genotoksičnih spojin v farmacevtskih izdelkih. Ravno zato so velika prizadevanja že tekom razvoja za nadzor vseh genotoksičnih nečistot, ki morajo biti v koncentracijah, ki so varne za uporabnika. Hkrati pa morajo biti prizadevanja za omejitev nečistot sorazmerna s tveganjem, ki je ocenjeno na vsaki fazi kliničnega razvoja. Pri tem je nujno upoštevati obseg nevarnosti, indikacije bolezni, velikost in značilnost izpostavljene populacije ter trajanje te izpostavljenosti. (5)

### **1.2.1 Testiranje genotoksičnih nečistot**

Splošni okvir za testiranje genotoksičnosti spojin je podan v dveh sprejetih varnostnih smernicah mednarodne konference o harmonizaciji (*International Conference on*

*Harmonisation*, ICH) (ICH S2A, ICH S2B). Smernica ICH S2B opisuje standardne teste genotoksičnosti, ki zajemajo:

- test genskih mutacij v bakterijah,
- *in vitro* test s citogenetsko oceno okvare kromosomov v celicah sesalcev,
- *in vivo* test za okvare kromosomov v hematopoetskih celicah glodalcev.

V varnostnih ICH smernicah (S2A in S2B) je navedeno: "Za spojine z negativnim rezultatom bo zaključek teh treh testov, ki so izvedeni in ovrednoteni v skladu s tekočimi priporočili, običajno ponudil zadostno raven varnosti, da se dokaže odsotnost genotoksične aktivnosti." V zvezi s tem je genotoksičnost širok pojem, ki zajema vplive na reaktivnost DNK, DNK poškodbe, kromosomske poškodbe, strukturne prelome kromosomov in nastanek nenormalnega števila kromosomov. Vsaka spojina, ki ima pozitiven rezultat v enem ali več izmed zgoraj omenjenih testov, je bila v preteklosti obravnava kot genotoksična in je bilo zato potrebno nadaljnje preizkušanje za določitev točne ocene tveganja. Tako standardni testi genotoksičnosti, uporabljeni za preskušanje API-ja, zagotavljajo pomembne informacije o raznolikosti mehanizmov za nastanek genotoksičnosti, neposredno in posredno povezane z učinki na DNK. (6)

Glavna skrb, ki bi morala vplivati na nadzor nečistot na razmeroma nizki ravni, je neposredna DNK reaktivnost. DNK reaktivne rakotvorne snovi je mogoče opredeliti z nizko pojavnostjo lažno negativnih rezultatov in je kombinacija ocene kemijskih strukturnih značilnosti, s pomočjo katere sklepamo na DNK reaktivnost, z biološkim testom, kot je bakterijski test povratne mutacije, znan kot test "Ames". S tem bakterijskim testom povratnih mutacij ugotavljamo sposobnost testirane substance ali vzorca, da le-ta povzroča točkovne mutacije. Za testiranje uporabljamo različne testne seve: *Salmonella typhimurium* TA535, TA1538, TA98, TA100, TA102, *Escherichia coli* WP2 in WP2uvrA. Obseg in način testiranja prilagodimo zahtevam različnih smernic za izvajanje bakterijskega testa povratnih mutacij (ICH), kot tudi namenu testiranja. Testiramo čiste kemikalije, proizvode (npr. pesticidne pripravke), kompleksne okoljske vzorce in vzorce telesnih tekočin izpostavljenih ljudi ali živali. (9, 10)

### 1.2.2 Klasifikacija nečistot glede na njihovo genotoksičnost

Nečistote lahko glede na njihov genotoksični potencial razvrstimo v pet razredov in sicer glede na obstoječe podatke o njihovi genotoksičnosti v povezavi z njihovimi strukturnimi elementi, ki nakazujejo morebitne interakcije z genskim materialom. (7)

Ti razredi so:

- Razred 1

V ta razred spadajo spojine, za katere je znano, da so genotoksične in rakotvorne. So najbolj nevarne nečistote in se jih je potrebno izogibati v največji možni meri.

- Razred 2

Sem spadajo spojine, za katere je dokazano, da so genotoksične, vendar pa njihov rakotvorni potencial ni znan. Te nečistote je treba obravnavati po vrednosti toksikološke zaskrbljenosti (*Threshold of Toxicological Concern, TTC*), o katerem teče razprava v nadaljevanju.

- Razred 3

Ta skupina vsebuje tiste nečistote, ki imajo v svoji strukturi funkcionalne skupine, ki bi lahko povzročale interakcije z DNK, vendar pa kot celotne spojine kot take niso bile testirane. Te funkcionalne skupine pa niso sorodne sami strukturi API-ja.

- Razred 4

Ta skupina nečistot vsebuje genotoksične funkcionalne skupine, ki pa so povezane s strukturo API-ja. Genotoksičnost izolirane nečistote ni znana, kar jih uvršča med potencialno genotoksične.

- Razred 5

V ta razred spadajo tako imenovane "navadne" nečistote, ki jim ni treba posvečati posebne pozornosti in nimajo dokazov o potencialni genotoksičnosti.

### 1.2.3 Smernice Evropske agencije za zdravila o omejitvi genotoksičnih nečistot

Evropska agencija za zdravila (EMA), natančneje odbor za zdravila in izdelke za uporabo v humani medicini (CHMP) je objavil smernico o omejitvah genotoksičnih spojin. (8) Ta smernica priporoča razdelitev genotoksičnih nečistot v tiste, za katere obstaja dovolj (eksperimentalnih) dokazov za njihovo mejo, ki je določena glede na mehanizem delovanja in tiste brez zadostnih dokazov. Genotoksične spojine z zadostnimi dokazi se regulirajo z

uporabo metod, opisanih v ICH Q3C, za topila, ki spadajo v razred 2. Ta pristop vsebuje dovoljeno dnevno izpostavljenost (*Permitted Dayl Exposure*, PDE), ki se jo izračuna glede na najvišjo koncentracijo, pri kateri še ni zaznavnega učinka (*No Observed Effect Level*, NOEL) ali najnižjo koncentracijo, pri kateri zaznamo učinek (*Lowest Observed Effect Level*, LOEL) iz najbolj ustrezne študije na živalih z upoštevanjem varnostnih dejavnikov. Primeri genotoksinov, ki spadajo v ta razred, so kemikalije, ki ovirajo delitveno vreteno, ovirajo delovanje topoizomeraze ali zavirajo sintezo DNK.

Za genotoksične spojine brez zadostnih dokazov, smernica predlaga politiko nadzora na ravni "kolikor je razumno izvedljivo" (*As low as reasonably posible*, ALARP). Ta pristop določa, da je potrebno prizadevanje za preprečevanje nastanka takih spojin med sintezo zdravilne učinkovine in, če to ni mogoče, prizadevanje za zmanjšanje teh nečistot (npr. čiščenje učinkovine po koncu sinteze). Spojine, ki spadajo v ta razred, so ponavadi tiste, ki interagirajo z DNK, bodisi neposredno ali posredno, kot alkilirajoča sredstva, kelirajoči agensi ali spojine, ki povzročajo nastanek prostih radikalov. (7)

Ker vsaka izpostavljenost rakotvornim dejavnikom teoretično prenaša določeno stopnjo tveganja, izvajajo regulatorni organi kvantitativne ocene tveganja, tako da izračunajo povečano raven neželenih učinkov, kot so rak, ki je posledica izpostavljenosti tem snovem. Velikokrat podatkov z razumno ALARP vrednostjo ni na voljo, tako da se uporablja privzete omejitve znane kot mejna vrednost toksikološke zaskrbljenosti (TTC). TTC predstavlja raven, na kateri je lahko bolnik izpostavljen genotoksičnim nečistotam z minimalnim tveganjem, medtem ko je le-to uravnoteženo s terapevtsko vrednostjo. Trenutni priporočljiv TTC je za farmacevtske izdelke 1,5 µg/dan in predstavlja med 100.000 pacienti dodatno obolenost enega samega uporabnika za rakom, če so ti izpostavljeni taki koncentraciji genotoksičnih nečistot skozi celotno življenjsko obdobje. Ta meja je prvotno temeljila na kancerogenosti pri živalih in zajema več kot 700 spojin, ki so bile ekstrapolirane in prirejene za ljudi, skupaj z dodatnimi varnostnimi dejavniki. Vendar pa nekateri trdijo, da je privzeta vrednost TTC, ki je prvotno temeljila tudi na sprejemljivih koncentracijah za hrano, preveč konzervativna in ovira pomemben razvoj v farmacevtski industriji. PhRMA (*Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*) v literaturi, ki se nanaša na določen TTC, predlagajo, da so lahko bolniki v določenih okoliščinah izpostavljeni več kot 1,5 µg/dan. S takšnim pristopom so lahko genotoksične nečistote prisotne v farmacevtskih izdelkih v koncentracijah, ki so prilagojene glede na režim odmerjanja zdravil. Na primer, zdravila z višjimi, bolj



pogostimi odmerki imajo nižje TTC vrednosti, kot zdravila, ki imajo nižje skupne odmerke. (5,7)

Spodnji dve tabeli (tabela II in III) prikazujeta TTC pristop in sicer razmerje med dnevnim odmerkom zdravilne učinkovine (ZU) in maksimalnim dnevnim vnosom genotoksične nečistote in njeno koncentracijo (v % in ppm).

*Tabela II: Razmerje med dnevnim odmerkom ZU, trajanjem terapije in maksimalnim dnevnim vnosom genotoksične nečistote in njeno koncentracijo v %. (7)*

| Dnevni odmerek ZU (mg) | Koncentracija nečistote (%)                       |                           |                            |                             |                               |
|------------------------|---|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|                        | Maksimalni dnevni vnos (MDV) in trajanje terapije |                           |                            |                             |                               |
|                        | 4 tedne<br>MDV: 120 ug                            | 1-3 mesece<br>MDV: 40 mcg | 3-6 mesecev<br>MDV: 20 mcg | 6-12 mesecev<br>MDV: 10 mcg | 1 leto in več<br>MDV: 1.5 mcg |
| 3000.0                 | 0.004   | 0.001                     | 0.0007                     | 0.0003                      | 0.00005                       |
| 2000.0                 | 0.006   | 0.002                     | 0.0010                     | 0.0005                      | 0.00008                       |
| 1500.0                 | 0.008   | 0.003                     | 0.0013                     | 0.0007                      | 0.00010                       |
| 1200.0                 | 0.010   | 0.003                     | 0.0017                     | 0.0008                      | 0.00013                       |
| 1000.0                 | 0.012   | 0.004                     | 0.0020                     | 0.0010                      | 0.00015                       |
| 900.0                  | 0.013   | 0.004                     | 0.0022                     | 0.0011                      | 0.00017                       |
| 800.0                  | 0.015   | 0.005                     | 0.0025                     | 0.0013                      | 0.00019                       |
| 700.0                  | 0.017   | 0.006                     | 0.0029                     | 0.0014                      | 0.00021                       |
| 600.0                  | 0.020   | 0.007                     | 0.0033                     | 0.0017                      | 0.00025                       |
| 500.0                  | 0.024   | 0.008                     | 0.0040                     | 0.0020                      | 0.00030                       |
| 400.0                  | 0.030   | 0.010                     | 0.0050                     | 0.0025                      | 0.00038                       |
| 300.0                  | 0.040   | 0.013                     | 0.0067                     | 0.0033                      | 0.00050                       |
| 200.0                  | 0.060   | 0.020                     | 0.0100                     | 0.0050                      | 0.00075                       |
| 100.0                  | 0.120   | 0.040                     | 0.020                      | 0.0100                      | 0.00150                       |
| 90.0                   | 0.133   | 0.044                     | 0.022                      | 0.011                       | 0.00167                       |
| 80.0                   | 0.150   | 0.050                     | 0.025                      | 0.013                       | 0.00188                       |
| 70.0                   | 0.171   | 0.057                     | 0.029                      | 0.014                       | 0.00214                       |
| 60.0                   | 0.200   | 0.067                     | 0.033                      | 0.017                       | 0.00250                       |
| 50.0                   | 0.240   | 0.080                     | 0.040                      | 0.020                       | 0.00300                       |
| 40.0                   | 0.300   | 0.100                     | 0.050                      | 0.025                       | 0.00375                       |
| 30.0                   | 0.400   | 0.133                     | 0.067                      | 0.033                       | 0.00500                       |
| 25.0                   | 0.480   | 0.160                     | 0.080                      | 0.040                       | 0.00600                       |
| 20.0                   | 0.600   | 0.200                     | 0.100                      | 0.050                       | 0.00750                       |
| 10.0                   | 1.20  | 0.400                     | 0.200                      | 0.100                       | 0.015                         |
| 9.0                    | 1.33  | 0.444                     | 0.222                      | 0.111                       | 0.017                         |
| 8.0                    | 1.50  | 0.500                     | 0.250                      | 0.125                       | 0.019                         |
| 7.0                    | 1.71  | 0.571                     | 0.286                      | 0.143                       | 0.021                         |
| 6.0                    | 2.00  | 0.667                     | 0.333                      | 0.167                       | 0.025                         |
| 5.0                    | 2.40  | 0.800                     | 0.400                      | 0.200                       | 0.030                         |
| 4.0                    | 3.00  | 1.00                      | 0.500                      | 0.250                       | 0.038                         |
| 3.0                    | 4.00  | 1.33                      | 0.667                      | 0.333                       | 0.050                         |
| 2.0                    | 6.00  | 2.00                      | 1.00                       | 0.500                       | 0.075                         |
| 1.0                    | 12.00   | 4.00                      | 2.00                       | 1.00                        | 0.150                         |
| 0.9                    | 13.33   | 4.44                      | 2.22                       | 1.11                        | 0.167                         |
| 0.8                    | 15.00   | 5.00                      | 2.50                       | 1.25                        | 0.188                         |
| 0.7                    | 17.14   | 5.71                      | 2.86                       | 1.43                        | 0.214                         |
| 0.6                    | 20.00   | 6.67                      | 3.33                       | 1.67                        | 0.250                         |
| 0.5                    | 24.00   | 8.00                      | 4.00                       | 2.00                        | 0.300                         |

Tabela III: Razmerje med dnevni odmerkom ZU, trajanjem terapije in maksimalnim dnevni vnosom genotoksične nečistote in njeno koncentracijo v ppm. (7)

| Koncentracija nečistoče (ppm)                     |                           |                            |                             |                                |
|---|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Maksimalni dnevni vnos (MDV) in trajanje terapije |                           |                            |                             |                                |
| 4 tedne<br>MDV: 120ug                             | 1-3 mesece<br>MDV: 40 mcg | 3-6 mesecev<br>MDV: 20 mcg | 6-12 mesecev<br>MDV: 10 mcg | 1 leto ali več<br>MDV: 1.5 mcg |
| 40  | 13                        | 7                          | 3                           | 0.5                            |
| 60  | 20                        | 10                         | 5                           | 0.8                            |
| 80  | 27                        | 13                         | 7                           | 1.0                            |
| 100   | 33                        | 17                         | 8                           | 1.3                            |
| 120   | 40                        | 20                         | 10                          | 1.5                            |
| 133   | 44                        | 22                         | 11                          | 1.7                            |
| 150   | 50                        | 25                         | 13                          | 1.9                            |
| 171   | 57                        | 29                         | 14                          | 2.1                            |
| 200   | 67                        | 33                         | 17                          | 2.5                            |
| 240   | 80                        | 40                         | 20                          | 3.0                            |
| 300   | 100                       | 50                         | 25                          | 3.8                            |
| 400   | 133                       | 67                         | 33                          | 5.0                            |
| 600   | 200                       | 100                        | 50                          | 7.5                            |
| 1,200   | 400                       | 200                        | 100                         | 15                             |
| 1,333   | 444                       | 222                        | 111                         | 17                             |
| 1,500   | 500                       | 250                        | 125                         | 19                             |
| 1,714   | 571                       | 286                        | 143                         | 21                             |
| 2,000   | 667                       | 333                        | 167                         | 25                             |
| 2,400   | 800                       | 400                        | 200                         | 30                             |
| 3,000   | 1,000                     | 500                        | 250                         | 38                             |
| 4,000   | 1,333                     | 667                        | 333                         | 50                             |
| 4,800   | 1,600                     | 800                        | 400                         | 60                             |
| 6,000   | 2,000                     | 1,000                      | 500                         | 75                             |
| 12,000  | 4,000                     | 2,000                      | 1,000                       | 150                            |
| 13,333  | 4,444                     | 2,222                      | 1,111                       | 167                            |
| 15,000  | 5,000                     | 2,500                      | 1,250                       | 188                            |
| 17,143  | 5,714                     | 2,857                      | 1,429                       | 214                            |
| 20,000  | 6,667                     | 3,333                      | 1,667                       | 250                            |
| 24,000  | 8,000                     | 4,000                      | 2,000                       | 300                            |
| 30,000  | 10,000                    | 5,000                      | 2,500                       | 375                            |
| 40,000  | 13,333                    | 6,667                      | 3,333                       | 500                            |
| 60,000  | 20,000                    | 10,000                     | 5,000                       | 750                            |
| 12,000  | 40,000                    | 20,000                     | 10,000                      | 1,500                          |
| 133,333   | 44,444                    | 22,222                     | 11,111                      | 1,667                          |
| 150,000   | 50,000                    | 25,000                     | 12,500                      | 1,875                          |
| 171,429   | 57,143                    | 28,571                     | 14,286                      | 2,143                          |
| 200,000   | 66,667                    | 33,333                     | 16,667                      | 2,500                          |
| 240,000   | 80,000                    | 40,000                     | 20,000                      | 3,000                          |
| 300,000   | 100,000                   | 50,000                     | 25,000                      | 3,750                          |
| 400,000   | 133,333                   | 66,667                     | 33,333                      | 5,000                          |
| 600,000   | 200,000                   | 100,000                    | 50,000                      | 7,500                          |

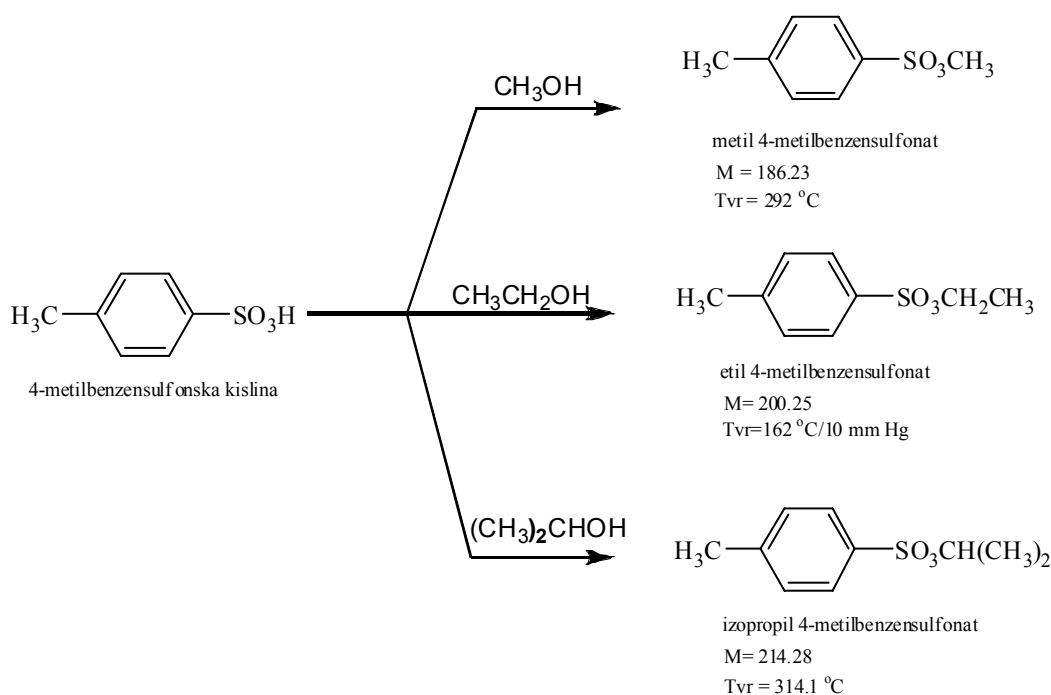
V zgornjem zasenčenem območju tabele II in III so nečistote s koncentracijami, ki so  $\leq 100$  ppm glede na dnevni odmerek ZU. Pri teh zelo nizkih koncentracijah postane razvoj analitskih metod izjemno zahteven. Po drugi strani pa predstavlja spodnji osenčen del tabele koncentracije nečistot  $\geq 0,5$  %. V večini primerov avtorji priporočajo vzdrževanje MDV na tej ravni, ker lahko koncentracija nečistote, višja od 0,5 %, občutno zmanjša kakovost zdravilne učinkovine.

Dodatni pomisleki se pojavijo v zvezi s prisotnostjo večjega števila genotoksičnih nečistot v istem farmacevtskem izdelku. Priporočljivo je, da so med farmacevtskim razvojem prisotne do tri genotoksične nečistote, ki so lahko strukturno povezane ali pa tudi ne. Pristop v tem primeru je seštevek vrednosti podobnih genotoksičnih nečistot in ločena obravnava tistih, ki se razlikujejo. (7)

### 1.3 METIL, ETIL IN IZOPROPIL TOZILAT

#### 1.3.1 Nastanek in lastnosti alkil tozilatov

Alkil tozilati, katerih IUPAC ime je alkil 4-metilbenzensulfonati, pogosto nastajajo pri sintezi zdravilnih učinkovin in sicer z reakcijo med kratkoverižnimi alkoholi in *p*-toluensulfonsko kislino. Alkoholi se v sintezi najpogosteje uporabljajo kot topila (metanol, etanol in izopropanol), sulfonske kisline pa kot reagenti, katalizatorji in protiioni pri tvorjenju soli zdravilnih učinkovin. V našem primeru sinteze intermedata se *p*-toluensulfonska kislina uporablja kot katalizator in alkoholi kot topila, zato obstaja možnost prisotnosti metil, etil in izopropil tozilata v tem intermediatu. Slika 2 prikazuje sintezo alkil tozilatov, ki so predmet naših analitskih raziskav. (11)

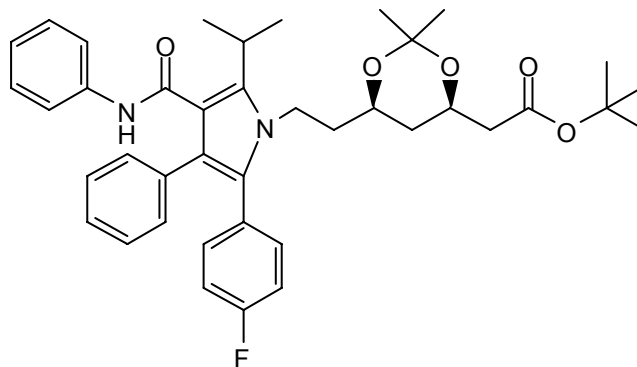


Slika 2: Shema nastanka alkil tozilatov.

Fizikalno-kemijske lastnosti so ključni dejavnik, ki vplivajo na izbor primerne analitskega postopka za njihovo vrednotenje (vrsta kromatografske ločbe, izbor stacionarne faze, detektorja, ipd.). Pomembne so predvsem lastnosti kot so polarnost (porazdelitveni koeficient), molekulska masa, hlapnost, temperatura vrelišča ipd.

## 1.4 VZOREC ATV-44

Vzorec, v katerem bomo določali vsebnost alkil tozilatov, je intermediat učinkovine, pri kateri obstaja verjetnost, da so tekom sinteze nastali genotoksični alkil tozilati. Vzorec ATV-44 je prikazan na sliki 3.



$C_{40}H_{47}FN_2O_5$   
terc-butil 2-[(4S,6S)-6-{2-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-(propan-2-il)-1H-pirol-1-il]etil}-2,2-dimetil-1,3-dioksan-4-il]acetat  
M = 654.81

Slika 3: Vzorec ATV-44.

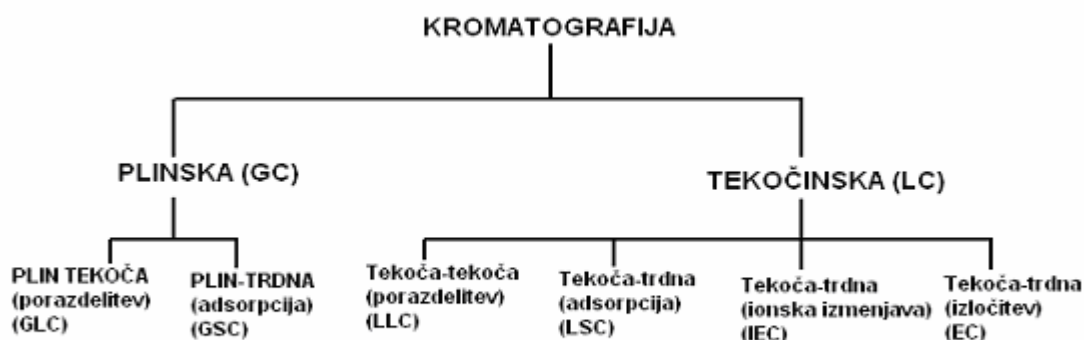
## **1.5 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE ALKIL TOZILATOV**

Kot smo že omenili, je s strani regulatornih organov že dlje časa prisotna velika skrb v zvezi z možnostjo nastajanja estrov sulfonskih kislin (mezilatni, bezilatni, tozilazni estri). Ker te spojine zelo hitro nastanejo med samo sintezo zdravilnih učinkovin, je prišlo do povečanega zanimanja za analizo zelo nizkih koncentracij teh analitov z uporabo predvsem plinske (GC) in tekočinske kromatografije (HPLC), sklopljene z različnimi tehnikami detekcije, kot je masa spektrometrija (MS).

Zaskrbljenost glede možnosti oblikovanja teh estrov med sintezo je tako spodbudila zahtevo o dokazih, da ti estri niso prisotni v API oziroma so prisotni na zelo nizki ravni (ppm). Najpogosteje se v analitiki poslužujemo kromatografskih metod in prav te so bile glavna tarča raziskovanj do sedaj. (11)

### **1.5.1 Kromatografske metode**

Pod pojmom kromatografija razumemo vrsto postopkov separacije in/ali določitve kemijskih spojin, od najmanjših molekul v plinski fazi do bioloških makromolekul (slika 4). Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (tekočine, plina) zaradi selektivnega zadrževanja (retenzije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina). Kromatografske metode tako razvrščamo glede na stacionarno fazo in sicer na tankoplastno kromatografijo in kolonsko kromatografijo. Predstavnici slednje sta predvsem plinska (GC) in pa tekočinska kromatografija (LC), ki se ločita glede na različna agregatna stanja stacionarne in mobilne faze. (12, 13)



Slika 4: Shematski pregled kromatografskih metod (13)

### 1.5.2 Tekočinska kromatografija

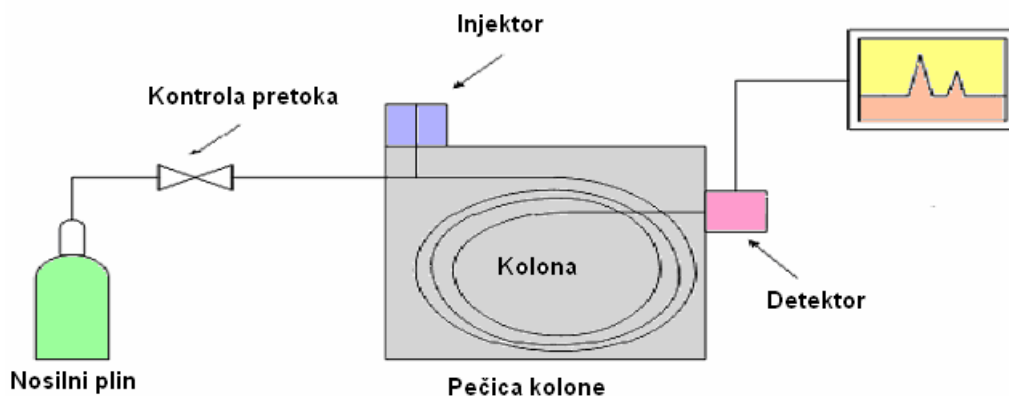
Pri tekočinski kromatografiji je mobilna faza tekočina, stacionarna faza pa trdna. V splošnem jo razdelimo na običajno tekočinsko kromatografijo (LC) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Razlika med njima je v učinkovitosti ločevanja molekul vzorca. Kljub enaki osnovi obeh kromatografij je HPLC pri ločevanju nedvomno uspešnejša. Razlog zato so manjši delci stacionarne faze, pri čemer se poveča stična površina med delci in posledica so višji pretoki mobilne faze. Pri HPLC vzdržujemo neprestano pretočnost z izvajanjem visokih pritiskov na mobilno fazo, s čimer se razlikuje od običajne tekočinske kromatografije. Za kolono je nameščen detektor, ki je pa lahko elektrokemijski, fluorescenčni, infrardeči, refraktometrični, masni ali ultravijolični. Izbira teh je odvisna od strukture in lastnosti molekul. (12, 13)

Tekom analitskih raziskovanj genotoksičnih sulfonatnih estrov je bilo razvitih kar nekaj HPLC metod, s katerimi lahko uspešno določamo alkil tozilate. Pri direktnem injiciranju tozilatnih estrov v HPLC/UV sistemu so ugotovili, da ta metoda ni dovolj občutljiva za določanje tako nizkih koncentracij, kot jih zahtevajo regulatorni organi, oz. pri nižjih koncentracijah (< 100 ppm) rezultati niso bili ponovljivi. Zato so razvili HPLC/MS metodo, ki je pokazala zadostno mero zanesljivosti za detekcijo zelo nizkih koncentracij (1 ppm in 0.1 ppm). (14,15)

Kot uspešna se je izkazala tudi HPLC metoda, pri kateri so uporabili elektrokemijski detektor, ki je znan po visoki občutljivosti. Z njim so uspešno detektirali tozilate zelo nizkih koncentracij. (16)

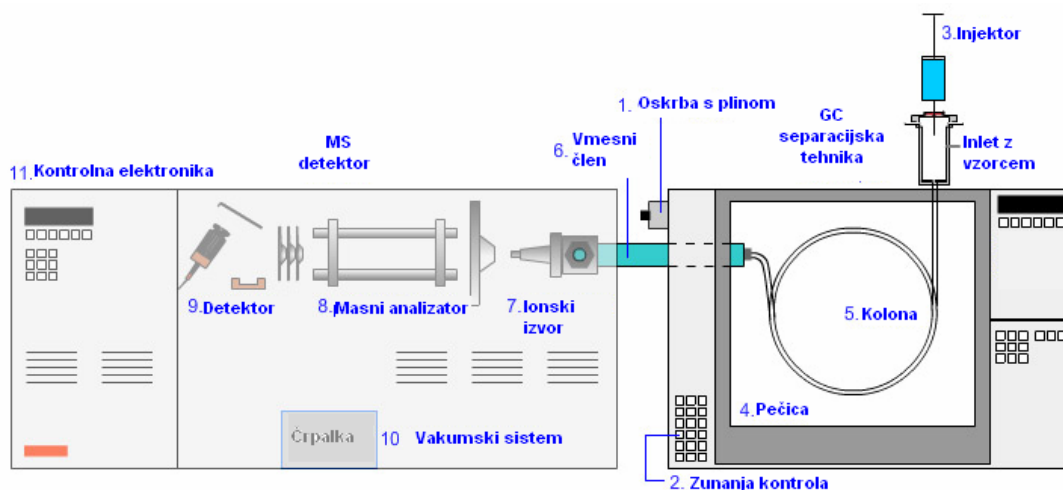
### 1.5.3 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je primerna za separacijo in kvantitativno določitev termično stabilnih spojin, ki imajo ustrezen parni tlak (hlapnost) in so termično stabilne med 300 - 350° C. Pri plinski kromatografiji vzorec uparimo in ga z dovajanjem inertnega plina prenesemo preko kolone do detektorja. Inerten plin predstavlja mobilno fazo in je lahko argon, vodik, helij ali dušik. Razlika od ostalih kromatografskih metod je ta, da mobilna faza ne interagira z molekulami preizkovanega analita, pač pa je njena edina funkcija transport analita skozi kolono. Poznamo dve vrsti plinske kromatografije in sicer porazdelitvena kromatografija plin-tekoče (GLC - *Gas Liquid Chromatography*) in adsorpcijska kromatografija na trdih sorbentih (GSC - *Gas Solid Chromatography*). Najpogosteje se v današnjem času v analitiki uporablja plinsko-tekočinska kromatografija (GLC), ki ji v splošnem rečemo kar plinska kromatografija (GC). Stacionarna faza je običajno nehlapna organska tekočina, s katero je prevlečen nosilec ('polnjena kolona') ali notranja stena kapilarne kolone. Ker je osnova separacije porazdelitev komponente med obema fazama, uporabljamo za različne skupine organskih spojin raznolike stacionarne faze. Ker je hlapnost organskih spojin in tako tudi stacionarnih faz odvisna tudi od temperature, morajo biti posamezne stacionarne faze obstojne v temperaturnem območju med 20 - 350°C. Za detekcijo uporabljamo različne detektorje. Najpogostejši so plamensko ionizacijski (FID), toplotno prevodni (TCD), "Nitrogen Phosphorus Detector" (NPD) in detektor na zajetje elektronov (ECD). (17, 18)



Slika 5: Shema plinskega kromatografa. (17)

Ti detektorji le zaznavajo spojine, ki prihajajo iz kolone, nič pa ne povedo o njihovi strukturi oz. identiteti (le NPD je selektiven za dušik ali fosfor). Pri znanih vzorcih in točno določenih pogojih (temperatura in pretok) lahko spojine identificiramo glede na njihov retencijski čas in zaporedje, v katerem zapuščajo kolono. Če gre pa za povsem neznanne spojine, se poslužujemo plinske kromatografije, ki jo združimo z masno spektrometrijo (slika 6).



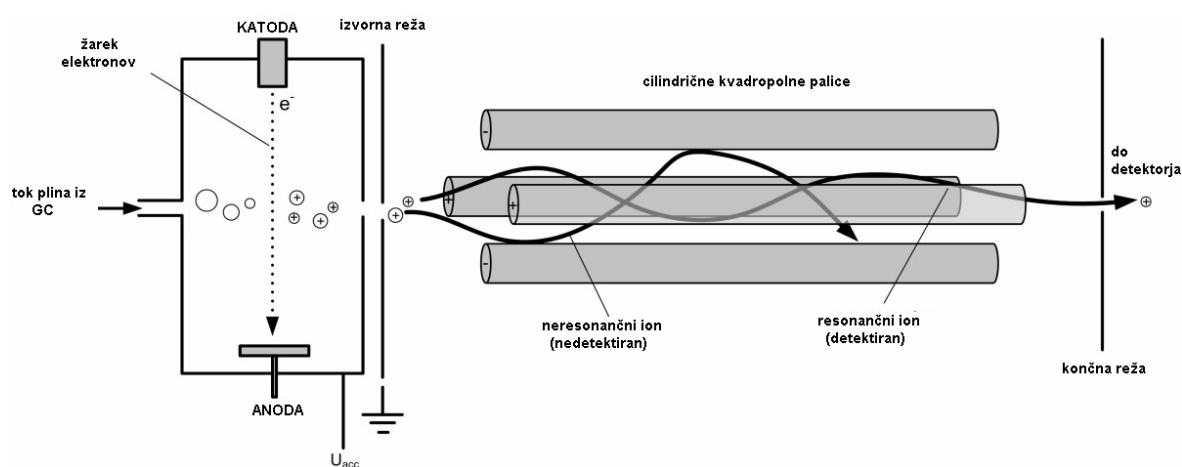
Slika 6: Shema plinskega kromatografa z masno selektivnim detektorjem (19)

Masna spektrometrija je analitska tehnika, ki nam pomaga pri identifikaciji neznanih spojin na tak način, da masni spektrometer ionizira molekule, ki lahko razpadejo na fragmente in



jih nato detektira na podlagi razmerja mase z nabojem ( $m/z$ ). Na osnovi specifične fragmentacije sklepamo na posamezne fragmente molekule, iz tega pa na njeno strukturo. Molekule vzorca pri metodi masne spektroskopije iz kolone potujejo v vakuumsko komoro. Tam se molekula ionizira. Poznamo različne vrste ionizacije in sicer ionizacijo z zajetjem elektronov (EI), kemijsko ionizacijo (CI), bombardiranje s hitrimi atomi, ionizacijo v elektičnem polju itd. (20)

Mi smo pri našem delu uporabljali EI. Ta ionizacija poteka s pomočjo elektronov, ki jih emitira volframova nitka. Ob stiku molekul vzorca z elektroni pride do nastanka molekulskih in fragmentnih ionov in sicer tako, da elektron zadane molekulo in ji pri trku izbije elektron. Nastane molekularni ion z dodatno energijo, katera povzroči nastanek fragmentov oz. cepitev molekule. Ionizacijo izvajamo z energijo elektronov 70eV. Če bi uporabljali nižjo energijo, bi bil izkoristek ionizacije prenizek (neučinkovita ionizacija), medtem ko bi bila pri višji energiji fragmentacija molekulskega iona prevelika, kar vpliva na kvaliteto informacij v spektru. (20)



Slika 7: Shema kvadropolnega analizatorja pri masni spektrometriji (21)

Nastale ionizirane fragmente vodimo v analizator, katerih je prav tako več vrst (kvadropolni analizator, analizator z ionsko pastjo, elektrostatsko-magnetni analizator...). Najpogosteje se uporablja kvadropolni masni analizator (slika 7), v katerem potujejo ionizirani fragmenti preko spreminjajočega se elektromagnetnega polja, ki jih na podlagi razmerja ( $m/z$ ) selektivno usmerja na elektronsko pomnoževalko. Le-ta detektira posamezne ione in sorazmerno glede na število zaznanih ionov beleži velikost signala.

Ojačan signal pošlje na rekorder (računalnik). Rezultat tega je kromatogram celokupnega ionskega toka (angl. Total ion current, TIC). TIC kromatogram je sestavljen iz abcisne osi, na kateri odčitamo retencijski čas, ter ordinate, ki nam kaže vsoto intenzitete ionskih tokov pri vseh  $m/z$ . Na TIC kromatogramu lahko pri poljubno izbranemu retencijskem času (RT) računalniški program konstruira masni spekter.

Masni spekter prikazuje intenziteto ionskih tokov kot funkcijo razmerja  $m/z$ . Identifikacijo posamezne molekule potrdimo s primerjavo masnega spektra analizirane komponente z masnim spektrom čiste komponente, shranjene v knjižnici masnih spektrov in s tem potrdimo njeno strukturo. (20)

#### 1.5.4 Tehnika nadprostora

"Headspace" (HS) ali tehnika nadprostora je tehnika vzorčevanja plinaste faze vzorca, ki se razvije v zaprti viali nad raztopino vzorca. Ta vrsta analitske metode se uporablja za analizo lahko hlapnih organskih molekul v trdnih, tekočih ali plinastih vzorcih. Popularnost te tehnike je zrasla v zadnjih letih in se danes v farmacevtski industriji najpogosteje uporablja za določevanje rezidualnih topil v farmacevtskih izdelkih. To je najbolj primerna tehnika za analizo lahko hlapnih spojin v vzorcu, ki jih je mogoče učinkovito spraviti v plinsko fazo iz tekoče ali trdne matrice vzorca. Uporablja se za kompleksno sestavljene vzorce, ki jih je zaradi težavnega matriksa težko analizirati direktno. S tem se izognemo težavnim ekstrakcijam analitov iz vzorca, saj jih je mogoče analizirati neposredno iz vial. Z metodo se izognemo kontaminaciji GC sistema in podaljšamo življensko dobo kolone. (22, 23)

Raztopino vzorca običajno pripravimo v viali, ki vsebuje vzorec raztopljen v ustreznem topilu. Hlapne komponente prehajajo iz raztopine vzorca v plinasto fazo nad vzorcem, v kateri se koncentrirajo do vzpostavitve ravnotežja med obema fazama (Slika 8). Težje hlapne in nehlapne komponente pa ostanejo v raztopini. Vzorec plinaste faze vbrizgamo v GC sistem in komponente ločimo na koloni. (23)



Slika 8: Shema HS viala (23)

Tudi marsikatera GC metoda za določanje alkil tozilatov je bila razvita tekom analitskih raziskovanj. Prva izmed njih je direktna GC-FID metoda (plinska kromatografija-plamensko ionizacijski detektor), pri kateri so uporabili topilo ACN:voda (35:65). Opazili so zelo nizke odzive, še posebej za izopropil tozilat. Sklepali so na hidrolizo estra v injekcijskem vložku in zaradi nizke odzivnosti opustili nadaljne raziskave. (15)

Naslednja je metoda derivatizacije tozilatov s tiocianatom oz. izotiocianatom. Preverjali so metodi tehnike nadprostora z GC-MS in GC-FID. Pri GC-MS metodi je bila najnižja kvantificirana koncentracija (ki še ustreza razmerju signal:šum = 1:10) 0,25 µg/ml. Pri GC-FID pa so z derivatizacijo uspeli določiti koncentracijo 5 µg/ml. Ti dve metodi torej uspešno določata alkil tozilate v dokaj nizkih koncentracijah. (24)

Metoda, po kateri smo se tudi sami zgledovali, je HS-GC-MS metoda z derivatizacijo s pentafluorotiofenolom (PFTP). Pri metodi so uporabili interni standard (deuterirane analite), da bi se izognili napakam pri injiciranju. Metoda omogoča uspešno določanje alkil tozilatov, vendar ne v tako nizkih koncentracijah kot je zahtevano s strani regulatornih organov. (25)

## 2. NAMEN DELA

Alkil tozilati so znane genotoksične nečistote, ki lahko nastanejo kot stranski produkti pri sintezi zdravilnih učinkovin. Ker je prisotnost teh nečistot v zdravilnih učinkovinah lahko nevarna za uporabnika, je v današnjem času vedno večja potreba po identifikaciji in kvantifikaciji le-teh tako v končnem produktu kot tudi v intrermediatih.

Namen našega dela bo razviti najbolj optimalno GC-MS metodo za določanje teh nečistot v izbranem intermediatu ATV-44.

Najprej bomo poskušali razviti metodo z direktnim injiciranjem in sicer tako, da bomo po ugotovitvi ustreznega topila med sabo ločili metil, etil in izopropil tozilat ter določili njihove retencijske čase. To bomo dosegli s metodo "Full Scan". Le-to bomo poskušali prenesti v SIM (*single ion monitoring*) metodo, kjer se bomo osredotočili le na iskane analite in kvantitativno določili njihove vrednosti. Ker so zahteve za detekcijo genotoksičnih nečistot s strani regulatornih organov zelo stroge, bomo poskušali doseči čimvišjo občutljivost te metode, kar pomeni čim nižjo mejo kvantifikacije.

Ne glede na ustreznost metode z direktnim injiciranjem bomo razvili še Headspace metodo z derivatizacijo. Za derivatizacijski reagent bomo izbrali pentafluorotiofenol, ki ob prisotnosti baze reagira s tozilati na tak način, da se alkilira. Te produkte bomo prav tako najprej ločili s pomočjo metode "Full Scan", ki jo bomo pozneje prenesli v SIM tehniko.

Naš cilj bo torej razviti in optimizirati GC-MS metodo, ki bo v izbranem intermediatu sposobna določanja zahtevano nizkih koncentracij genotoksičnih alkil tozilatov.

### **3. EKSPERIMENTALNI DEL**

#### **3.1 MATERIALI**

##### **3.1.1 Delovni standardi**

- metil *p*-toluensulfonat (brezbarvna tekočina,  $M_r=186,23$ ,  $d_{20}=1,234$  g/ml, 99,94%,  $T_{vr}=292$  °C/760 mmHg),  $C_8H_{10}O_3S$ ; Fluka (Švica); LOT 1404459
- etil *p*-toluensulfonat (brezbarvna trdna snov,  $M_r=200,25$ ,  $d_{20}=1,174$  g/ml, 100%,  $T_{vr}=162$  °C/10 mmHg),  $C_9H_{12}O_3S$ ; Sigma-Aldrich; LOT 1428475
- izopropil *p*-toluensulfonat (brezbarvna tekočina,  $M_r=214,28$ ,  $d_{20}=1,163$  g/ml, 100%,  $T_{vr}=314$  °C/760 mmHg, 100%),  $C_{10}H_{14}O_3S$ ; Apollo Scientific; Batch No:AS416149

##### **3.1.2 Reagenti**

- pentafluorotiofenol (brezbarvna tekočina,  $d_{20}=1,501$  g/ml, 97%,  $M_r=200,10$ ),  $C_6HF_5S$ ; Sigma-Aldrich (Nemčija)
- natrijev hidroksid (NaOH); ( $M_r=40,0$ ), Sigma-Aldrich (Nemčija)

##### **3.1.3 Topila**

- dimetilsulfoksid (99,9%),  $C_2H_6OS$ ; Sigma-Aldrich (Nemčija)
- acetonitril (99,9%),  $CH_3CN$ ; J.T.Baker
- deionizirana voda (v nadaljevanju voda) (proizvedena na oddelku RAFU Mengeš, Lek d. d.)

##### **3.1.4 Vzorec**

- ATV-44 ( $C_{40}H_{47}FN_2O_5$ , terc-butyl 2-[(4S,6S)-6-{2-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-(propan-2-il)-1H-pirol-1-il]etil}-2,2-dimetil-1,3-dioksan-4-il]acetat)

### 3.2 APARATURE

- Plinski kromatograf HP 6890 Series, Hewlett Packard (ZDA)
- GC kolona DB-5MS UI; stacionarna faza: 5 % fenil-polisiloksana, 95 % metil-polisiloksana; dimenzije: dolžina 20m, notranji premer 180 $\mu$ m, debelina stacionarne faze 0,18 $\mu$ m; (Agilent Technologies, ZDA)
- Vzorčevalnik plinske faze, "Network Headspace Sampler" G1888 (Agilent technologies, ZDA)
- Masno selektivni detektor Hewlett Packard 5973 (ZDA)
- Analitska tehtnica XP 205 DeltaRange® (Mettler Toledo, Švica)
- Precizna tehtnica XS 809 S/M (Mettler Toledo, Švica)
- Ultrazvočna kopel Transonic Digital S (Elma)
- Avtomatske pipete: Brand Transferpette (100 - 1000  $\mu$ L, 20 - 200  $\mu$ L), Biohit (10 - 300  $\mu$ L)
- Vodna kopel; Julabo (Nemčija)
- Steklovina: steklene polnilne pipete, merilne bučke, čaše, 20 ml HS vial, 2 ml vial za direktno injiciranje

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Metoda direktnega injiciranja

##### **Priprava raztopine standardov**

V 100 ml bučko, ki že vsebuje približno 50 ml acetonitrila, smo odpipetirali 22  $\mu$ L delovnega standarda metil tozilata in 22  $\mu$ L izopropil tozilata. Na analitski tehtnici smo natančno zatehtali približno 26 mg etil tozilata in ga preneseli v isto 100 ml bučko. S topilom smo bučko dopolnili do oznake in dobro premešali (RS1). Raztopino standarda 2 (RS2) smo pripravili tako, da smo odpipetirali 1 ml raztopine RS1 v 50 ml bučko in s topilom dopolnili do oznake. V 50 ml bučko smo odpipetirali 1 ml raztopine RS2 in s topilom dopolnili do oznake (RS3). Dobili smo raztopino standardov, katerih koncentracija znaša 0,1  $\mu$ g/ml. Ta ustreza 10 ppm v vzorcu, če je njegova koncentracija 10 mg/ml.

Koncentracije raztopin so naslednje:

RS1: 250  $\mu$ g/ml,

RS2: 5  $\mu$ g/ml,

RS3: 0,1 µg/ml.

### **Priprava vzorca**

V 2 ml vialo smo zatehtali 10 mg vzorca (ATV-44) in dodali 1ml topila.

### **Priprava vzorca z dodanimi standardi**

V 2 ml vialo smo zatehtali 10 mg vzorca in dodali 1 ml standardne raztopine RS3 (koncentracija standardov je 0,1 µg/ml).

### **3.3.1.1 Metoda "Full Scan"**

**Topilo:** Acetonitril

#### **Kromatografski pogoji:**

- Volumen injiciranja: 1 µL
- Injektor: split/splitless split razmerje 5:1, temperatura 250 °C
- Nosilni plin: Helij, konstanten pritisk 35 psi (povprečna hitrost eluiranja komponente iz kolone 43 cm/s)
- Temperaturni program:  
130 °C (1 min)  $\xrightarrow{30^{\circ}\text{C}/\text{min}}$  185 °C (2 min)  $\xrightarrow{50^{\circ}\text{C}/\text{min}}$  250 °C (2 min)

### **3.3.1.2 SIM metoda**

Po predhodno razviti metodi "Full Scan" smo z enakimi kromatografskimi pogoji nastavili še bolj občutljivo SIM (*Single ion monitoring*) metodo.

#### **Nastavitve masnega detektorja EI za SIM metodo:**

- Solvent delay: 2,5 min
- Skupina 1: metil tozilat; *m/z* 186
- Skupina 2: etil tozilat; začetek skupine pri 3,2 min; *m/z* 200
- Skupina 3: izopropil tozilat; začetek skupine pri 3,48 min; *m/z* 172

### 3.3.2 Tehnika nadprostora z derivatizacijo s PFTP

#### Priprava raztopine standardov

V 50 ml bučko, ki že vsebuje približno 25 ml topila, smo odpipetirali 103  $\mu\text{L}$  delovnega standarda metil tozilata in 110  $\mu\text{L}$  izopropil tozilata. Na analitski tehtnici smo natehtali 128,0 mg etil tozilata, ki smo ga prav tako prenesli v isto 50 ml bučko. S topilom smo dopolnili do oznake in dobro premešali (RS1, koncentracije cca. 250  $\mu\text{g/ml}$ ). To raztopino smo redčili, tako da smo dobili naslednje raztopine:

RS2: 1 ml RS1 / 50 ml topila  $\rightarrow$  ustreza koncentraciji cca. 50  $\mu\text{g/ml}$

RS3: 0,6 ml RS2 / 100 ml topila  $\rightarrow$  ustreza koncentraciji cca. 0,30  $\mu\text{g/ml}$

RS4: 15 ml RS3 / 20 ml topila  $\rightarrow$  ustreza koncentraciji cca. 0,225  $\mu\text{g/ml}$

RS4\*: 10 ml RS3 / 20 ml topila  $\rightarrow$  ustreza koncentraciji cca. 0,150  $\mu\text{g/ml}$

RS5: 10 ml RS4 / 20 ml topila  $\rightarrow$  ustreza koncentraciji cca. 0,075  $\mu\text{g/ml}$

RS6: 10 ml RS5 / 25 ml topila  $\rightarrow$  ustreza koncentraciji cca. 0,030  $\mu\text{g/ml}$

#### Priprava 5M raztopine NaOH

V 100 ml bučko, ki že vsebuje 50 ml vode, smo natehtali 2 g NaOH in ga raztopili s pomočjo ultrazvočne kopeli. Raztopino smo pustili, da se ohladi na sobno temperaturo, z vodo dopolnili do oznake in dobro premešali.

#### Priprava raztopine PFTP

V 10 ml bučko, ki že vsebuje 5 ml vode, smo odpipetirali od 5  $\mu\text{L}$  do 20  $\mu\text{L}$  PFTP reagenta, dodali od 50  $\mu\text{L}$  do 500  $\mu\text{L}$  5M NaOH in z vodo dopolnili do oznake.

#### Priprava raztopin za analizo

- Priprava slepe raztopine za analizo

V 20 ml HS vialo smo odpipetirali 1 ml DMSO, od 0,5 ml do 2 ml vode in 0,1 ml raztopine PFTP reagenta.

- Priprava standarnih raztopin za analizo

V 20 ml HS vialo smo odpipetirali 1 ml standarne raztopine (RS3, RS4, RS4\*, RS5 ali RS6), od 0,5 ml do 2 ml vode in 0,1 ml raztopine PFTP reagenta.

- Priprava raztopin vzorca za analizo



V 20 ml HS vialo smo natehtali 30 mg vzorca, dodali 1 ml DMSO, od 0,5 ml do 2 ml vode in 0,1 ml raztopine PFTP.

- Priprava raztopin vzorca z dodanimi standardi za analizo

V 20 ml HS vialo smo natehtali 30 mg vzorca, dodali 1 ml raztopine standardardov RS6 (ki ustreza koncentraciji 1 ppm glede na vzorec), od 0,5 ml do 2 ml vode in 0,1 ml raztopine PFTP reagenta.

### 3.3.2.1 Metoda "Full Scan"

V metodi "Full Scan" smo najprej določili ustrezne kromatografske pogoje in parametre vzorčevalnika plinske faze, ki nam omogočajo ločbo posameznih derivatiziranih analitov. Za razvoj metode "Full Scan" smo uporabljali isti instrument in kolono kot pri direktnem injiciranju.

**Topilo:** Dimetil sulfoksid (DMSO)

#### Kromatografski pogoji:

- Volumen injiciranja: 1 ml plinske faze
- Injektor: "Volatiles", split razmerje 10:1, temperatura 250 °C
- Nosilni plin: Helij, konstanten pretok skozi kolono 0,9 ml/min (povprečna hitrost eluiranja komponente iz kolone 43 cm/s)
- Temperaturni program:  
 $80\text{ °C (0,3 min)} \xrightarrow{10\text{ °C/min}} 115\text{ °C (0 min)} \xrightarrow{60\text{ °C/min}} 230\text{ °C (0.5 min)}$
- Celokupen čas analize: 6,2min

#### Nastavitve vzorčevalnika plinske faze (Headspace nastavitve):

- Temperatura pečice: 90 °C – 100 °C
- Temperatura zanke: 140 °C – 180 °C
- Temperatura transportne cevi: 160 °C – 220 °C
- Čas kromatografskega cikla: 10 min
- Tlak na vialo: 15 psi
- Čas gretja in tresenja viala (čas kondicioniranja viala): 15 min – 60 min
- Čas ustvarjanja nadtlaka v viali: 0,05 min
- Čas polnjenja zanke: 0,2 min

- Čas stabiliziranja zanke: 0,05 min
- Čas injiciranja: 0,2 min

### **Območje merjenja ionov: 15-550 $m/z$**

Na podlagi ugotovitev iz Scan metode smo postavili parametre SIM metode.

### **3.3.2.2 SIM metoda**

#### **Nastavitve masnega EI detektorja:**

- MS Quadropole: 150 °C
- MS Suorce: 230 °C
- MSD Transfer Line heater: temperatura 250 °C, tlak 15 psi
- Solvent Delay: 2,5 min
- Skupina 1: metil-PFTP;  $m/z$  214
- Skupina 2: etil-PFTP; začetek skupine pri 3 min;  $m/z$  228
- Skupina 3: izopropil-PFTP; začetek skupine pri 3,5 min;  $m/z$  200

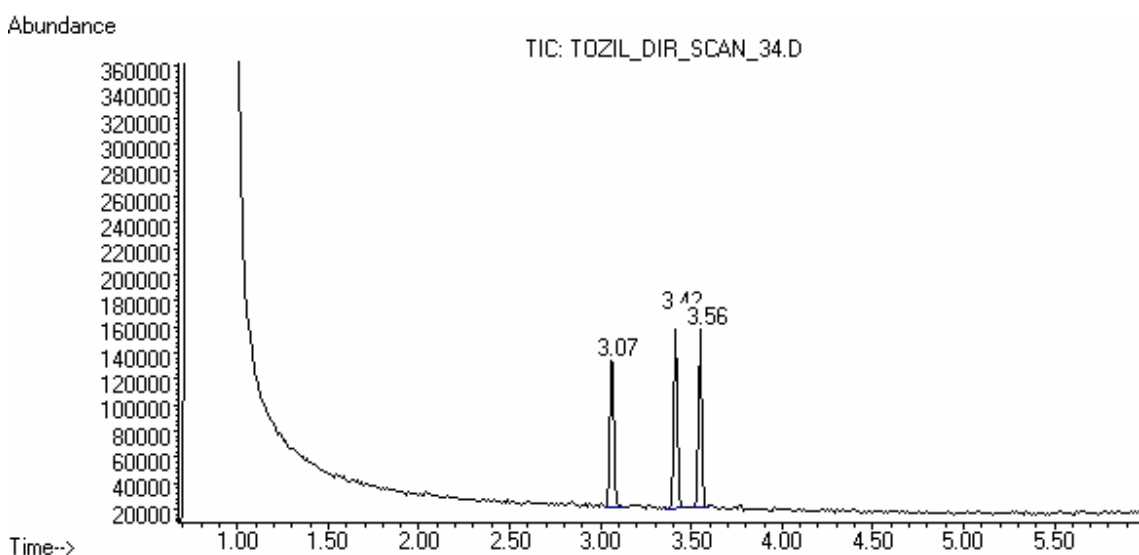
## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 RAZVOJ METODE DIREKTNEGA INJICIRANJA

Ker so alkil tozilati hlapni in termično relativno obstojni, smo najprej preverili analitski postopek z direktnim injiciranjem vzorca in detekcijo alkil tozilatov, takih kot so (brez derivatizacije). Takšna metoda bi bila najenostavnejša (enostavna priprava vzorca) in najhitrejša.

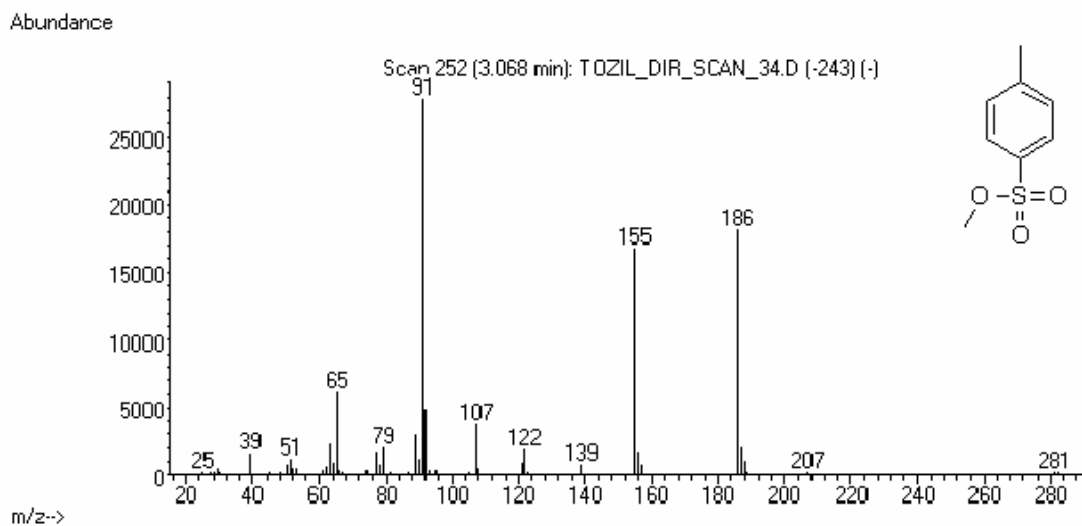
Na začetku smo kromatograme snemali v t.i. scan metodi, ki omogoča identifikacijo eluiranih analitov s pomočjo posnetega masnega spektra in knjižnice masnih spektrov, ki je vgrajena v programsko opremo.

Najprej smo s spreminjanjem kromatografskih pogojev želeli doseči ločbo tozilatov, ki smo jih pripravili kot raztopino standardov znane koncentracije (cca. 5,0 µg/ml, kar ustreza 500 ppm v vzorcu) in določiti njihove retencijske čase. Spreminjali smo temperaturo injektorja, split razmerje in program pečice. Začetna temperatura injektorja je bila zelo visoka (350 °C), saj smo glede na visoka vrelišča tozilatov sklepali, da je to potrebno. Kasneje smo zaradi slabe odzivnosti domnevali, da analiti razpadajo in zato znižali temperaturo injektorja na 250 °C. Dobili smo boljšo odzivnost oz. višje kromatografske vrhove, ki so našo domnevo potrdili (slika 9).

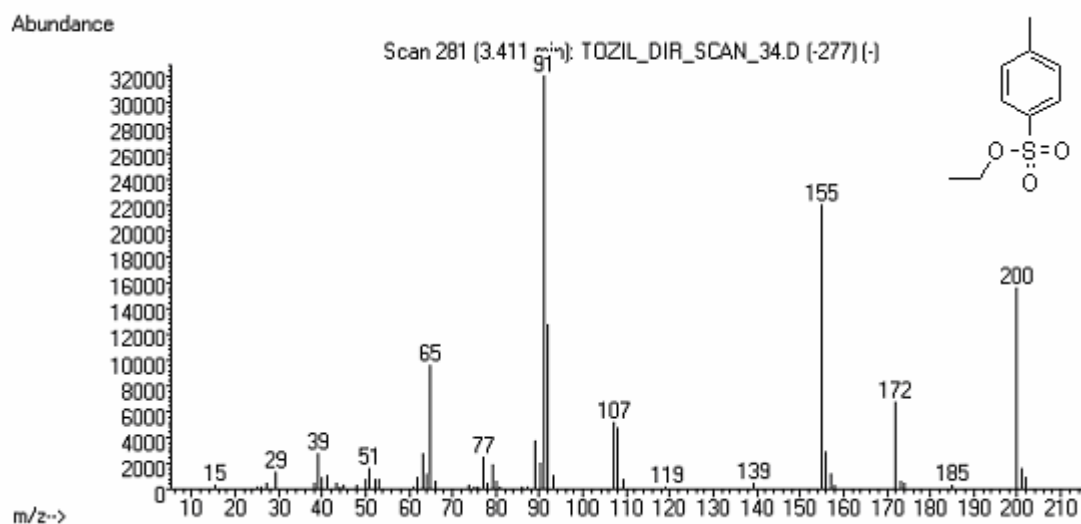


Slika 9: Kromatogram raztopine standardov koncentracije 5,0 µg/ml, kar ustreza 500 ppm v vzorcu. Pogoji so opisani v poglavju 3.3.1.1.

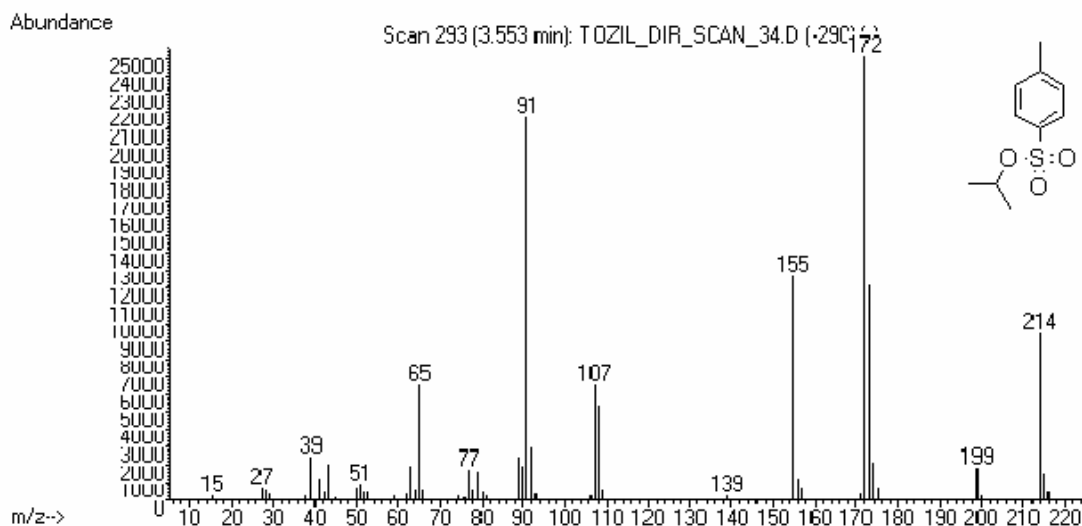
S primerjavo dobljenih masnih spektrov s tistimi iz knjižnice smo identificirali spojine, katerim posamezni vrh pripada. Po pričakovanjih smo potrdili, da prvi vrh (pri cca. 3,1 min) pripada metil tozilat, drugi vrh (pri cca. 3,4 min) etil tozilat in tretji vrh (pri cca. 3,6 min) izopropil tozilat (slike 10, 11 in 12). Vsi posneti spektri so pokazali zelo visoko (95 %) ujemanje, s tistimi iz knjižnice.



Slika 10: Masni spekter metil tozilata (pri RT 3,07 min).

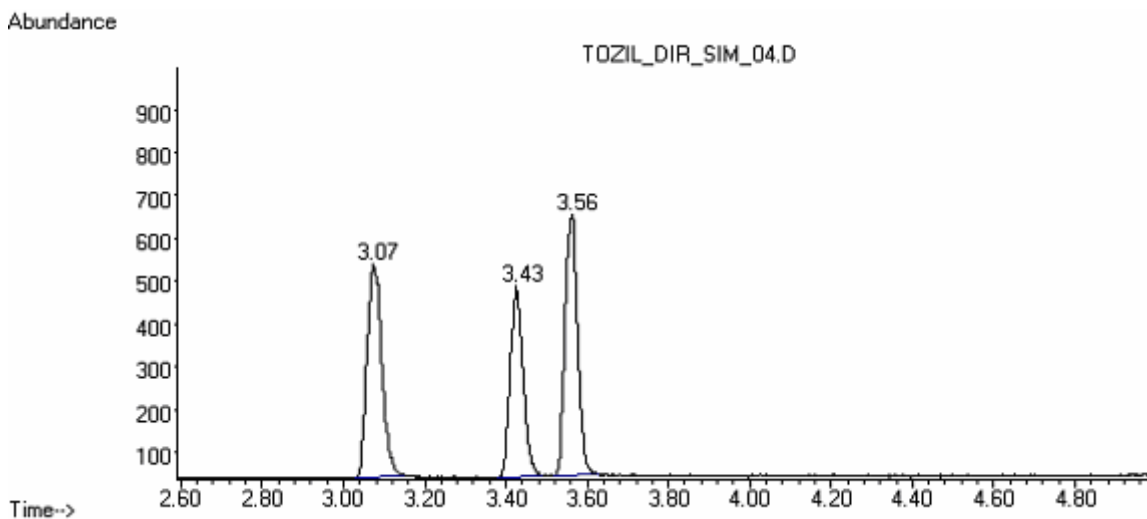


Slika 11: Masni spekter etil tozilata (pri RT 3,41 min).



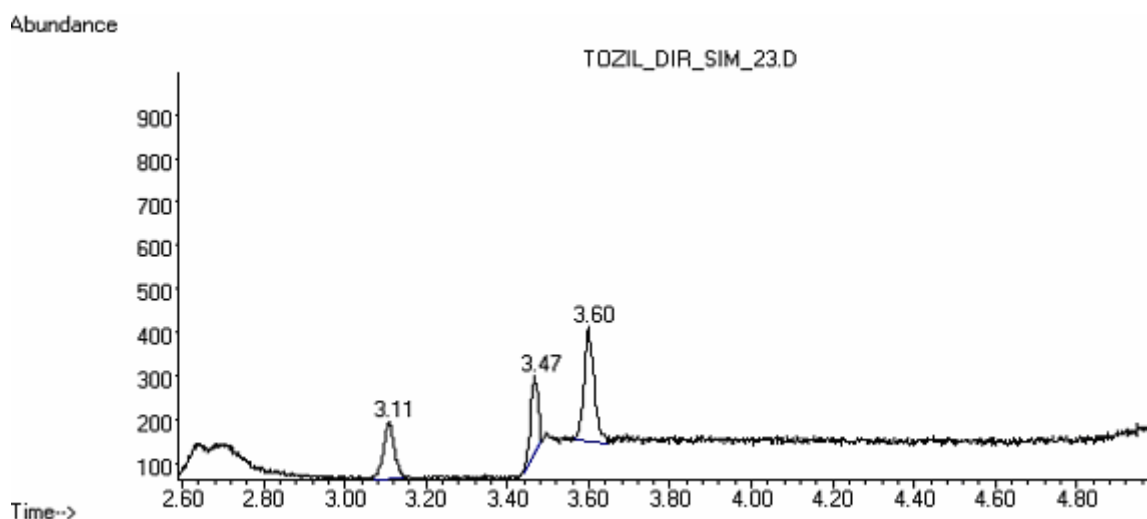
Slika 12: Masni spekter izopropil tozilata (pri RT 3,55 min).

Optimizirane kromatografske pogoje metode "Full Scan" smo prenesli v SIM metodo, ki se od prve razlikuje v tem, da se v določenem časovnem intervalu osredotočimo le na en ion oz. eno  $m/z$  razmerje. S tem močno povečamo občutljivost metode. (slika 13).



Slika 13: Kromatogram standardne raztopine alkil tozilatov koncentracije 0,10  $\mu\text{g/ml}$  (10 ppm v vzorcu). Pogoji metode so opisani v poglavju 3.3.1.2.

V nadaljevanju smo posneli kromatogram raztopine vzorca in kromatogram raztopine vzorca z dodanimi standardi (0,10  $\mu\text{g/ml}$  vsakega alkil tozilata). Tako smo želeli ugotoviti ali naš vzorec vsebuje primerljive koncentracije alkil tozilatov, ter preveriti točnost metode (slika 14, tabela IV).



Slika 14: Kromatogram vzorca (10 mg/ml) z dodanim standardom koncentracije 0,10  $\mu\text{g/ml}$ , kar ustreza 10 ppm v vzorcu. Pogoji metode so opisani v poglavju 3.3.1.2.

Tabela IV: Izmerjene vrednosti površine pod krivuljo in odstotek pokrivanja (recovery).

|                    | <b>Površine standarda (konc. 0,10 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>Površine v raztopini vzorca (konc. 10 mg/ml)</b> | <b>Površine vzorca z dodanim standardom</b> | <b>Točnost (recovery v %)</b> |
|--------------------|--|---|---|-------------------------------|
| <b>Me-tozilat</b>  | 12759  | 0   | 3360  | 26 %                          |
| <b>Et-tozilat</b>  | 9584   | 0   | 3990  | 42 %                          |
| <b>iPr-tozilat</b> | 13170  | 0   | 5417  | 41 %                          |

Ugotovili smo, da z našo metodo ne najdemo alkil tozilatov v vzorcu. Kot je razvidno iz tabele IV, pa so bile pri vzorcu z dodanimi standardi površine kromatografskih vrhov občutno nižje, kot pri raztopini standardov enake koncentracije. Iz tega smo sklepali, da matriks vzorca moti analizo in sicer tako, da zniža občutljivost metode za alkil tozilate. Vzrokov za to je lahko več. Eden izmed njih je reakcija med tozilati in matriksom vzorca, kar prepreči elucijo tozilatov in zniža vrhove oz. zmanjša površino pod krivuljo v kromatogramu. Drugi vzrok je lahko razpad našega vzorca in elucija razpadnih komponent, kar lahko vidimo kot premik bazne linije in neznani kromatografski vrh na začetku kromatograma (slika 13), ki je z vsakim naslednjim injiciranjem večji. Slednji pomeni zastajanje komponent v injektorskem vložku, ki se potem počasi eluirajo iz kolone in jih vidimo kot vrh na začetku vsakega naslednjega kromatograma.

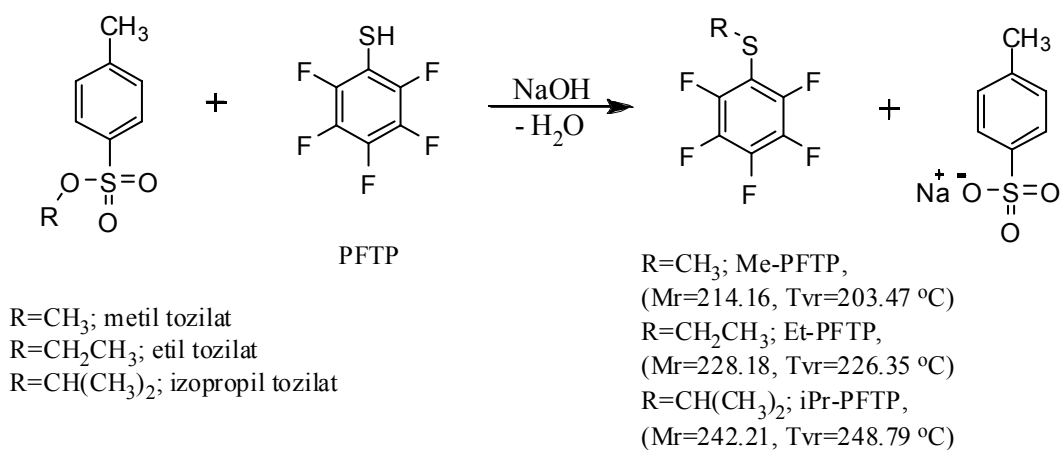
Zaključimo lahko, da metoda direktnega injiciranja ni primerna za določanje alkil tozilatov v vzorcu ATV-44, saj je vpliv matriksa prevelik. Hkrati pa s tako metodo močno onesnažimo sistem in skrajšamo življensko dobo kolone.

## 4.2 RAZVOJ TEHNIKE NADPROSTORA Z DERIVATIZACIJO

### 4.2.1 Derivatizacija alkil tozilatov s PFTP

Zaradi prevelike kontaminacije sistema pri direktnem injiciranju smo se lotili razvoja t.i. headspace metode (HS metode), pri kateri injiciramo samo plinsko fazo nad vzorcem. Ker so sami alkil tozilat premalo hlapni za to tehniko, smo se po pregledu literature odločili za njihovo predhodno derivatizacijo s pentafluorotiofenolom (PFTP). (25)

Gre za reakcijo, pri kateri se reagent alkilira in pri tem nastanejo lažje hlapni in bolj stabilni produkti (slika 15). Reakcija je potekala v HS viali med postopkom kondicioniranja pred injiciranjem. V vialo smo najprej odpipetirali 1 ml raztopine standardov, dodali vodo za boljšo občutljivost in nato raztopino reagenta, v katero smo že predhodno dodali bazo, ki je nujno potrebna za potek reakcije. Po vzpostavitvi ravnotežja v HS viali smo derivatizirane produkte injicirali na kolono.

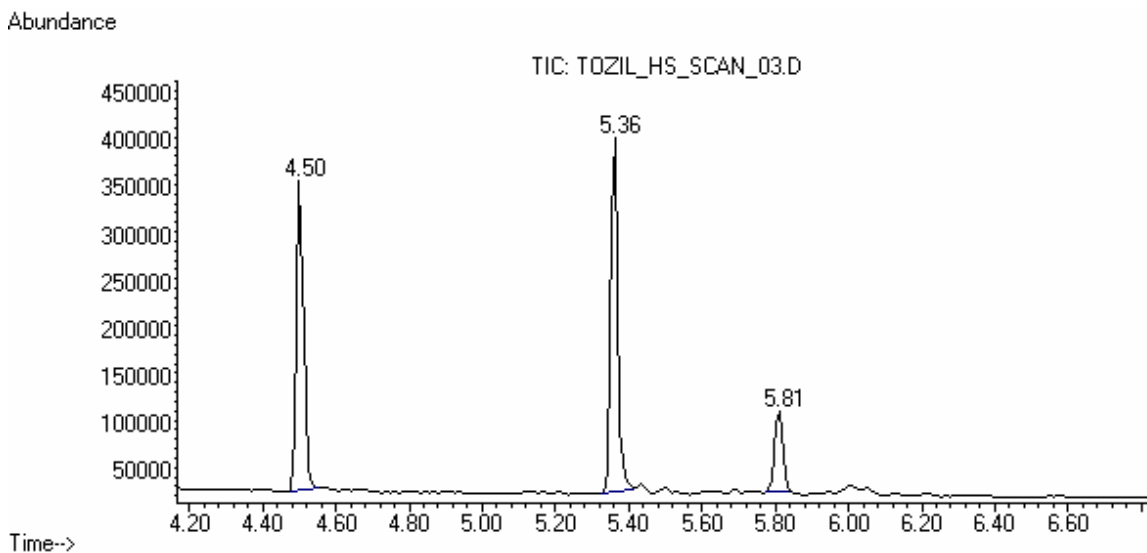


Slika 15: Reakcija derivatizacije alkil tozilatov s PFTP.

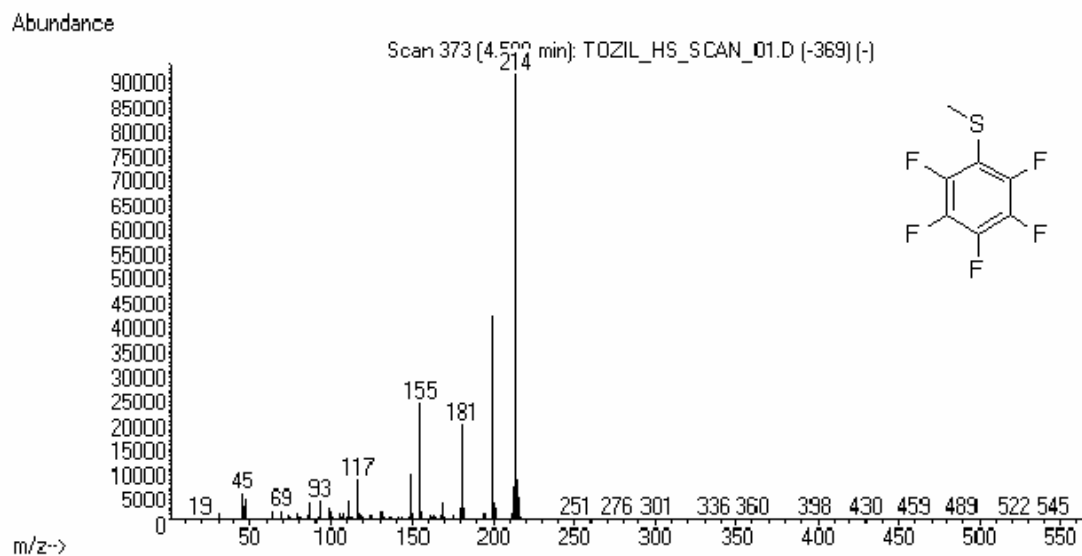


## 4.2.2 Optimizacija instrumentalnih parametrov

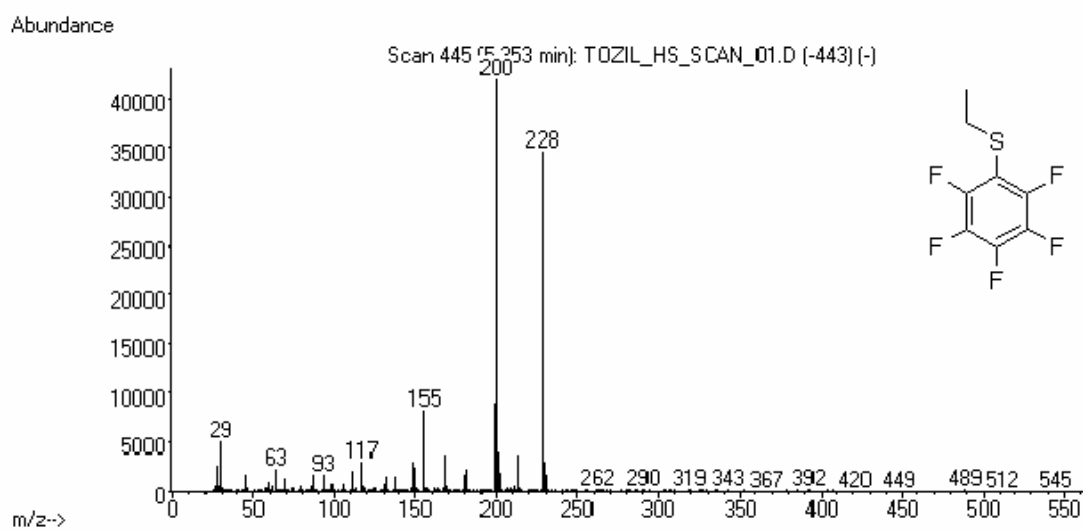
Enako kot pri metodi direktnega injiciranja smo tudi pri HS metodi s spreminjanjem kromatografskih pogojev najprej identificirali preiskovane analite (tokrat derivatizirane produkte) in hkrati poskušali doseči čimboljšo ločbo kromatografskih vrhov (slike 16, 17, 18 in 19).



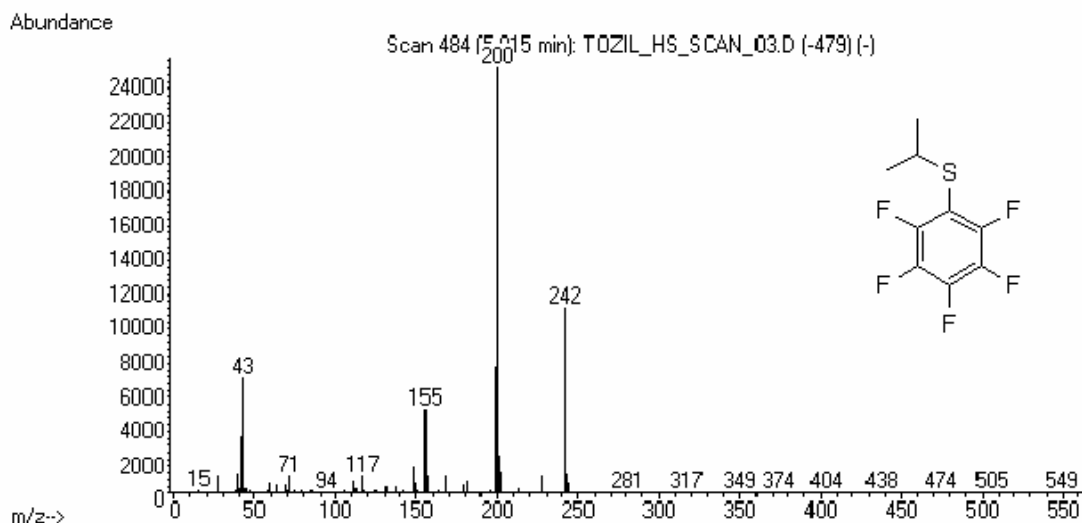
Slika 16: Kromatogram raztopine standardov koncentracije 30  $\mu\text{g/ml}$ , kar ustreza 1000 ppm v vzorcu. Pogoji so opisani v poglavju 3.3.2.1.



Slika 17: Masni spekter Me-PFTP (pri RT 4,50 min).



Slika 18: Masni spekter Et-PFTP (pri RT 5,36 min).



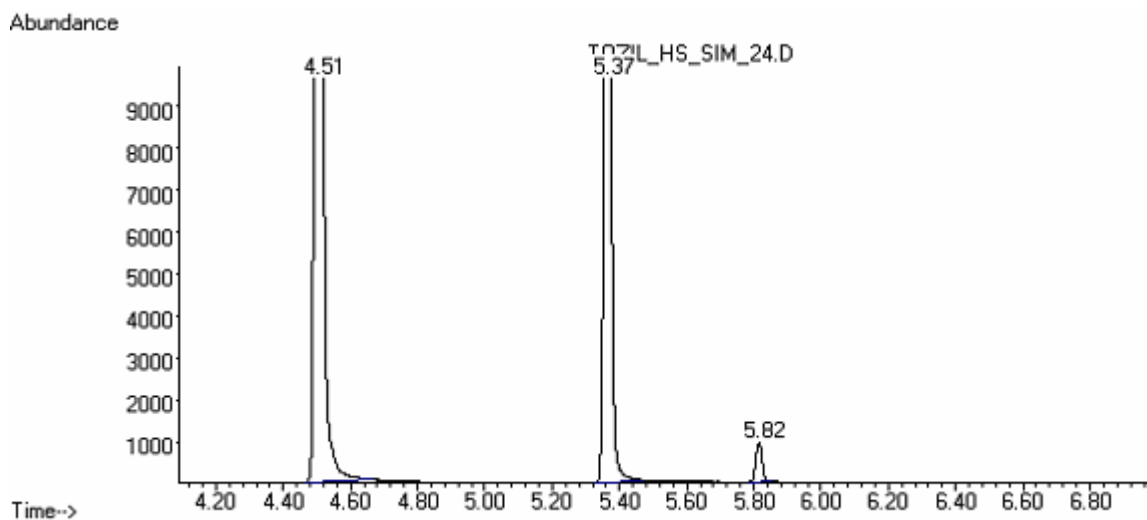
Slika 19: Masni spekter iPr-PFTP (pri RT 5,81 min).

Kot lahko vidimo na kromatogramu (slika 16), je bil kromatografski vrh iPr-PFTP precej nižji od ostalih dveh in bi lahko pomenil nezadostno mejo kvantifikacije za iPr tozilat. Najprej smo sklepali, da je težava v hlapnosti, saj ima iPr-PFTP najvišje vrelišče. Da bi to preverili, smo povišali temperaturo pečice (iz 90 °C na 100 °C), zanke (iz 140 °C na 180 °C) in transportne cevi (iz 160 °C na 220 °C) v vzorčevalniku plinske faze. Ugotovili smo, da je odziv še vedno enak oz. da s spremembo teh pogojev nismo izboljšali občutljivosti metode. Poskušali smo tudi s podaljšanjem časa gretja in tresenja (kondicioniranja) vial (iz 15 min na 30 min), vendar tudi ta sprememba ni dala zelenih rezultatov, pač pa se je odzivnost celo zmanjšala (nižji kromatografski vrhovi).

Po vsem tem smo sklepali, da težava ni v kromatografskih pogojih ali v pogojih vzorčevalnika plinske faze, pač pa je vzrok v poteku reakcije. Razlog je lahko večja sterična oviranost pri izopropil tozilat, ki otežuje dostop nukleofila, ali pa drugačen mehanizem reakcije (večji delež  $S_N1$  mehanizma pri izopropil tozilat). Zato smo želeli reakcijo optimizirati do te mere, da bi dobili čimboljšo odzivnost za izopropil tozilat in hkrati tudi za ostala dva.

Da bi dosegli čim nižjo mejo kvantifikacije smo "Full Scan" način snemanja nadomestili s SIM načinom (kromatogram, prikazan na sliki 20), pri kateri smo kasneje spreminjali

različne parametre, da bi dobili čimboljšo odzivnost in dosegli čim nižjo mejo kvantifikacije.



Slika 20: Kromatogram raztopine standardov koncentracije  $3,0 \mu\text{g/ml}$ , ki ustreza 100 ppm v vzorcu. Pogoji so opisani v poglavju 3.3.2.2. v SIM načinu detekcije.

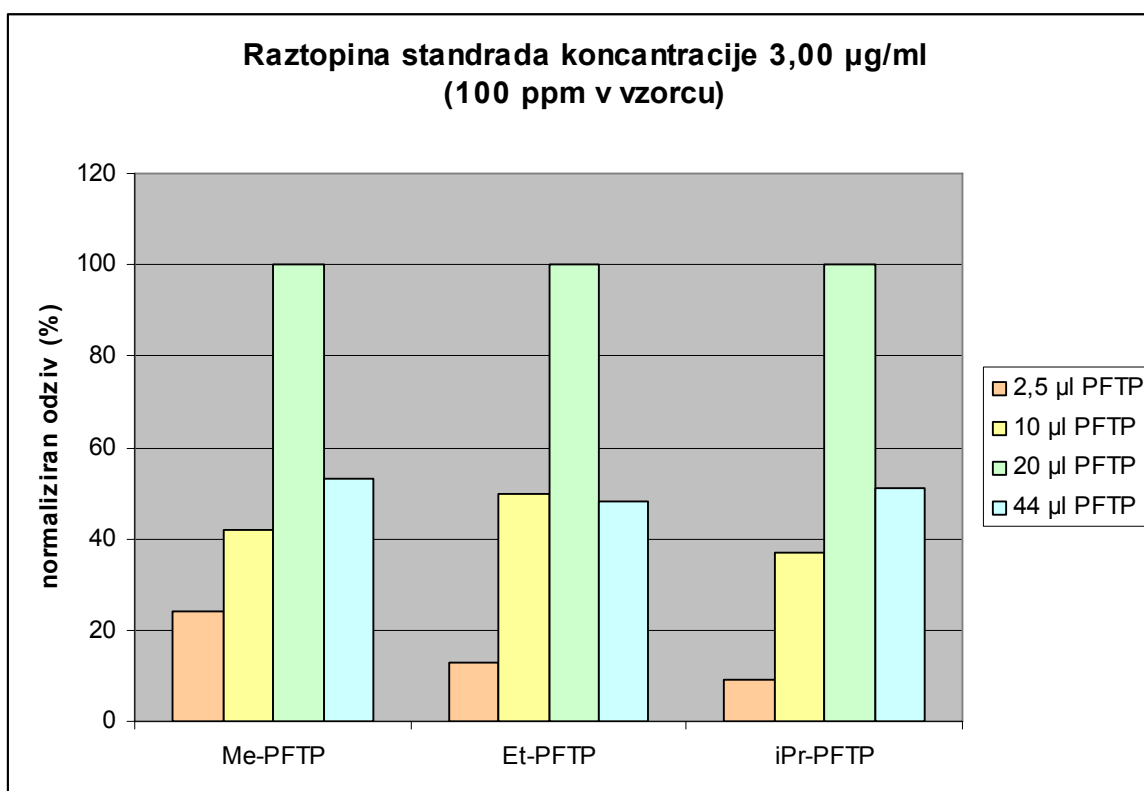
Naš cilj je bil razviti metodo, ki bi omogočila kvantifikacijo vsakega izmed tozilatov v koncentraciji 1 ppm v vzorcu. Glede na kromatogram, prikazan na sliki 20, vidimo, da je največjo težavo predstavljal iPr-PFTP. Metodo in reakcijo smo želeli optimizirati do te mere, da bi dobili usterzno nizko mejo kvantifikacije z ustreznim razmerjem signal/šum (S/N – "Signal to noise"). Le-to mora biti pri določitvi meje kvantifikacije večje ali enako 10. Da bi to dosegli, smo spreminjali različne parametre in vrednotili njihov vpliv na občutljivost metode.

#### 4.2.3 Optimizacija priprave raztopine reagenta PFTP

Ker smo predvidevali, da je težava v poteku derivatizacijske reakcije, smo najprej želeli preveriti vpliv priprave oz. količine reagenta na odziv derivatiziranih analitov. Reagent, katerega smo raztopili v vodi, smo pripravili v 10 ml bučki. V raztopino reagenta smo

dodali tudi bazo (NaOH), saj je le-ta nujno potrebna za potek reakcije. Baza namreč poveča nukleofilnost reagenta in tako omogoči reakcijo z alkil tozilatami.

Pripravili smo raztopino reagenta z različnimi koncentracijami PFTP in baze ter k 1 ml raztopine standardov (koncentracije 3,0 µg/ml, kar ustreza 100 ppm v vzorcu) dodajali vedno enako količino in sicer 0,1 ml (glej poglavje 3.3.2.2). Količina baze je variirala glede na to, kdaj se je reagent v vodi popolnoma raztopil oz. kasneje ni izpadel iz raztopine. Nismo pa želeli dodajati prevelike količine baze zaradi morebitnih stranskih reakcij, saj nam lahko prebitok baze povzroči hidrolizo samih alkil tozilatov. Tako smo ugotovili ustrezno razmerje reagent:baza (cca. 1:5), ki ga kasneje nismo več spreminjali. Tako smo v raztopino reagenta dodajali različne količine reagenta (in ustrezne količine baze) in preverjali odziv (slika 21).



Slika 21: Normaliziran graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od dodatka reagenta.

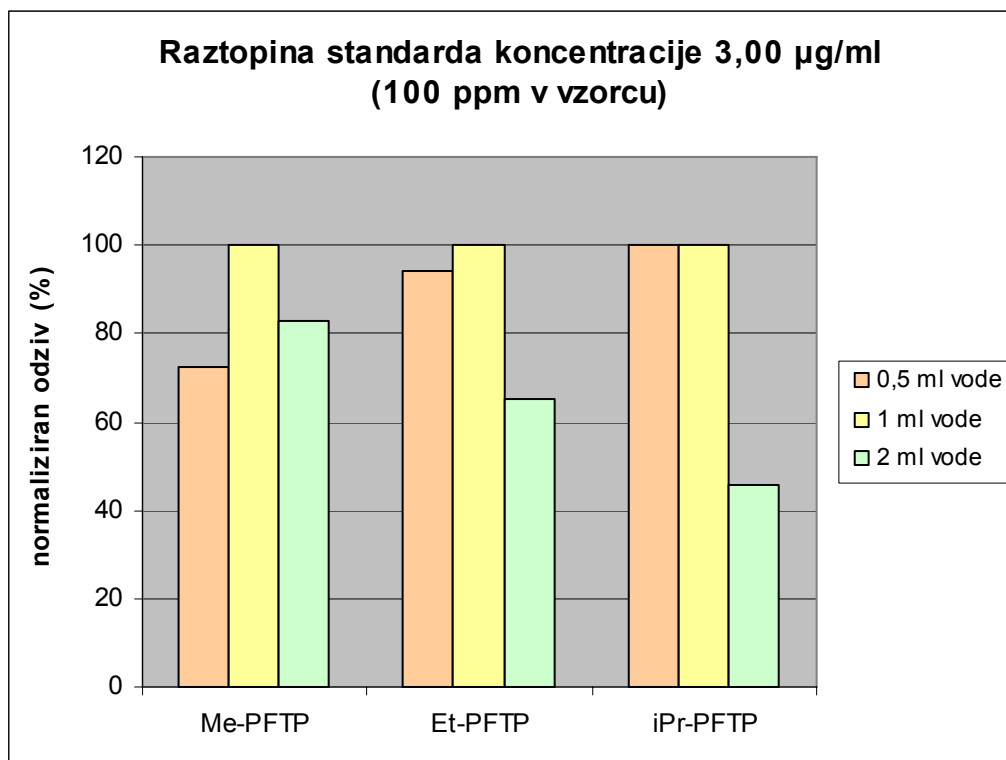
Tabela V: Množine vseh reagentov v HS viali pred injiciranjem, ki ustrezajo odzivom na sliki 21.

|    | Dodatek reagenta (μl) | Množina tozilatov v HS viali (μmol) | Množina PFTP v HS viali (μmol) | Množina NaOH v HS viali (μmol) |
|----|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1. | 2,5                   | 0,045                               | 0,182                          | 0,938                          |
| 2. | 10                    | 0,045                               | 0,728                          | 3,750                          |
| 3. | 20                    | 0,045                               | 1,455                          | 7,500                          |
| 4. | 44                    | 0,045                               | 3,200                          | 100                            |

Ugotovili smo, da je najboljši odziv takrat, kadar smo za pripravo raztopine reagenta uporabili 20 μl samega PFTP. Če ga dodamo večjo količino (> 20 μl), reagent po določenem času izpade iz raztopine. V tabeli V so prikazane množine vseh reagentov, ki so prisotni v HS (Headspace) viali (poleg topila in vode) pred injiciranjem. Kot lahko vidimo, smo dodali velik prebitek PFTP reagenta in baze glede na celokupno množino vseh treh alkil tozilatov. Eksperimentalni podatki nam kažejo, da je prebitek potreben za učinkovitejši potek reakcije in posledično višje kromatografske vrhove.

#### 4.2.4 Vpliv dodatka vode na občutljivost metode

V vsako vialo smo v reakcijsko zmes dodali tudi vodo, ki naj bi povečala polarnost tekoče faze in tako povzročila povečanje deleža analitov v plinski fazi ter s tem izboljšala občutljivost. Odvisnost površine kromatografskih vrhov analitov od količine dodane vode je prikazana na sliki 22. Iz rezultatov lahko razberemo, da dodatek 1 ml vode najbolj poveča odzivnost derivatiziranih analitov. Navajajo, da večji dodatek vode (2 ml) občutljivost še izboljša. (25) Naši rezultati temu ne pritrjujejo (glej sliko 22).



Slika 22: Normaliziran graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od dodatka vode pri raztopini standarda koncentracije 3,0  $\mu\text{g/ml}$  (100 ppm v vzorcu).

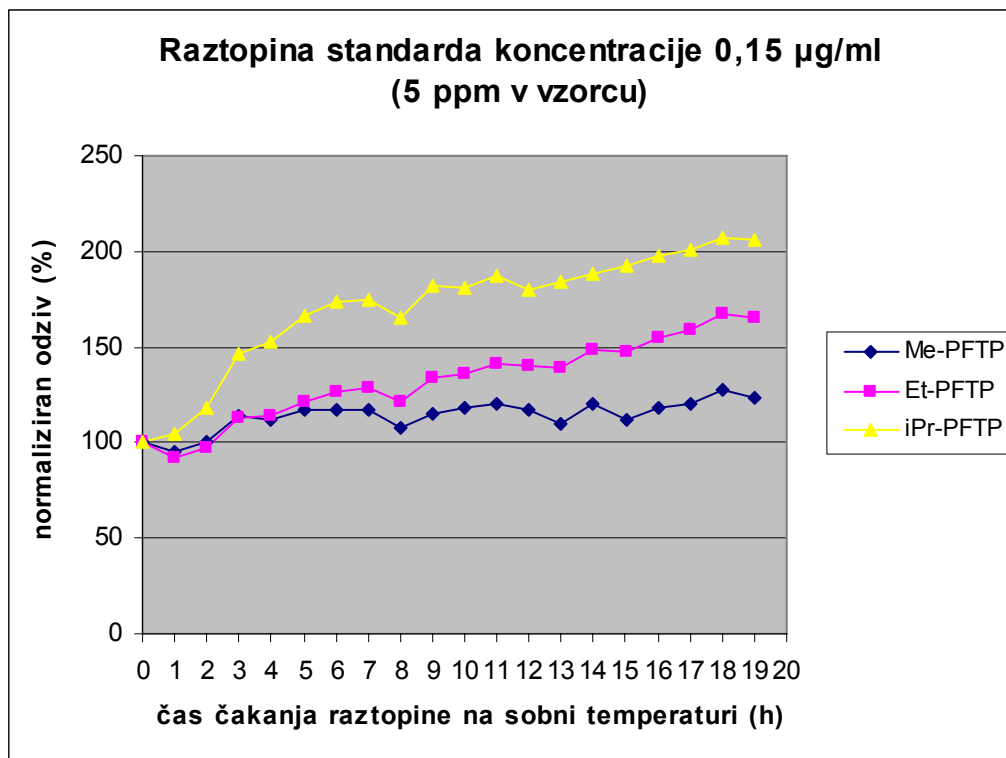
#### 4.2.5 Vpliv časa reakcije na občutljivost metode

Pri zaporednem injiciranju večjega števila standardnih raztopin smo ugotovili, da se površine pod kromatografskimi vrhovi spreminjajo. Vrhovi so bili z vsakim injiciranjem višji. Zato smo preverili, kako čas vpliva na reakcijo in posledično na površine kromatografskih vrhov.

Vse raztopine standardov za analizo in vse raztopine vzorcev z dodanim standardom za analizo smo pripravili istočasno. Prvo smo injicirali takoj, vsako naslednjo pa v časovnem intervalu ene ure. Raztopine smo hranili na sobni temperaturi. Reakcijo smo spremljali 20 ur (sliki 23 in 24).

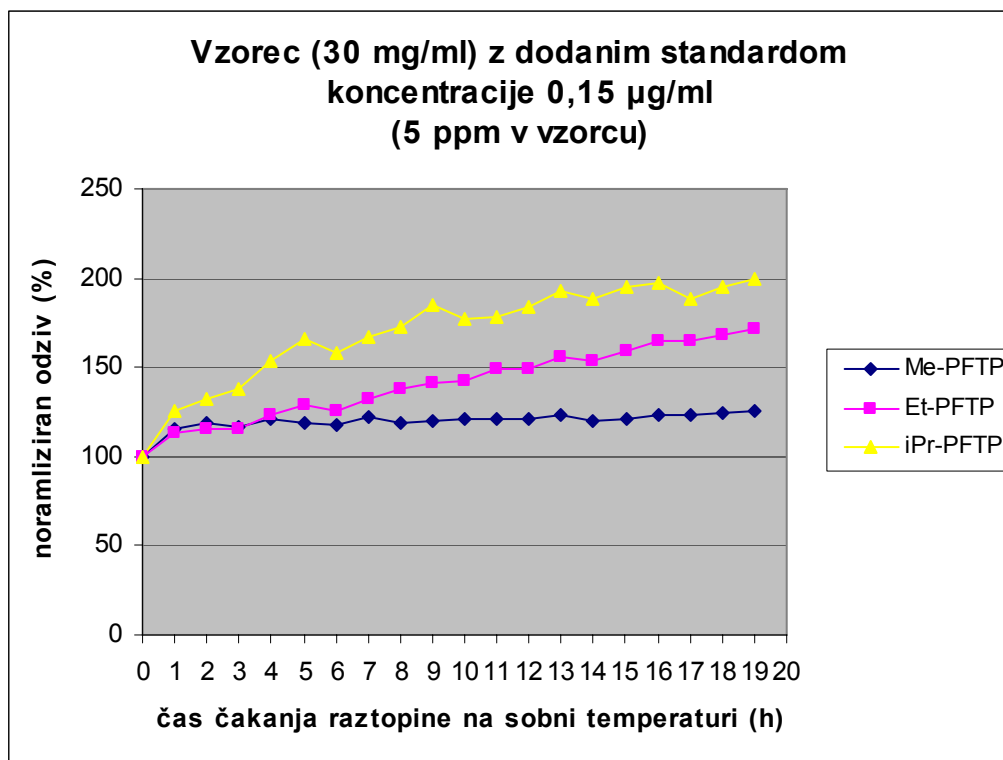
Iz spodnjih dveh grafov je razvidno, da čas pomembno vpliva na reakcijo. Površine kromatografskih vrhov v prvih urah strmo naraščajo (še posebej pri izopropil tozilat), kasneje se pa trend naraščanja delno umiri. Odločili smo se, da bomo raztopine injicirali po osmih urah čakanja na sobni temperaturi, in sicer zato, ker po osmih urah dosežemo

zadovoljiv odziv preiskovanih analitov za identifikacijo le-teh pri zelo nizkih koncentracijah.



Slika 23: Normaliziran graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od časa za raztopino standardov koncentracije 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (5 ppm v vzorcu).



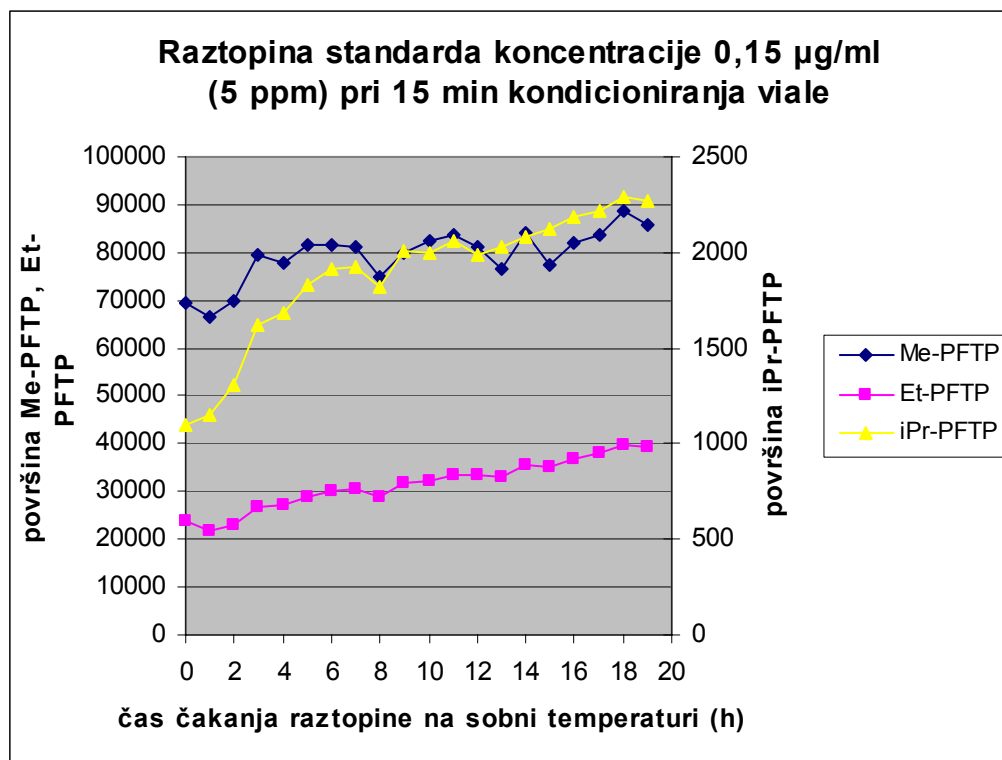


Slika 24: Normaliziran graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od časa za raztopino vzorca (30 mg/ml) z dodanim standardom koncentracije 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (5 ppm v vzorcu).

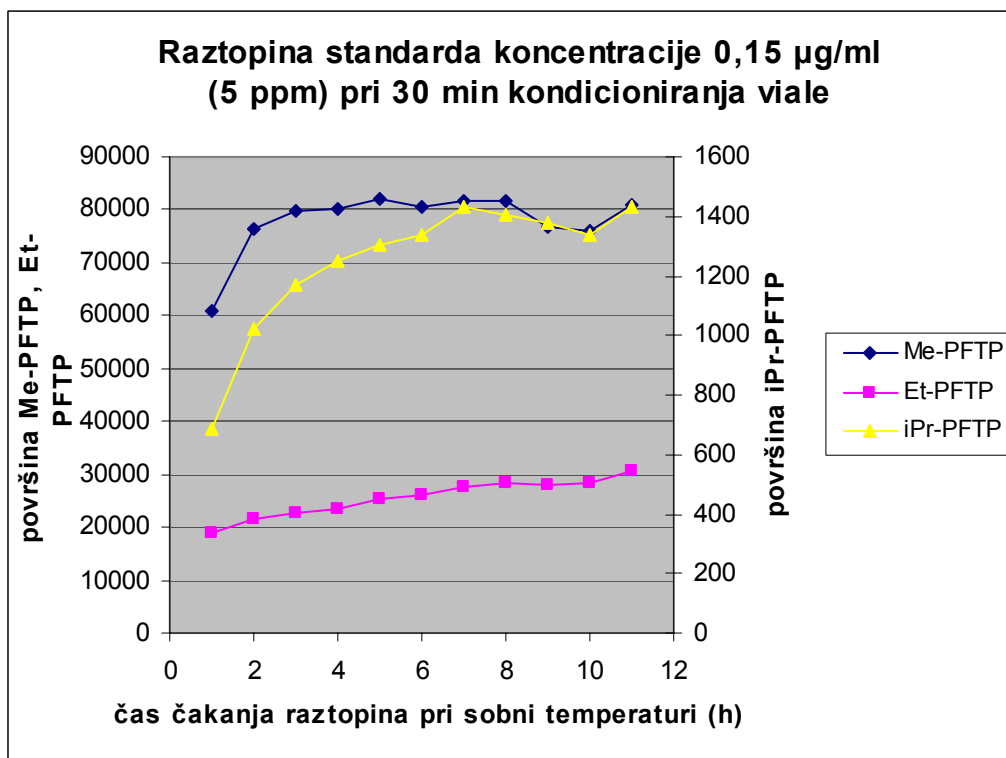
#### 4.2.6 Vpliv časa reakcije in časa kondicioniranja viala na občutljivost metode

Preverili smo tudi, kako čas reakcije in hkrati čas kondicioniranja viala v vzorčevalniku plinske faze vplivata na občutljivost metode. Predvidevali smo, da bi zaradi povišane temperature lahko z daljšim časom kondicioniranja viala pospešili reakcijo in bi se tako vrednosti površin ustalile prej kot šele po parih urah.

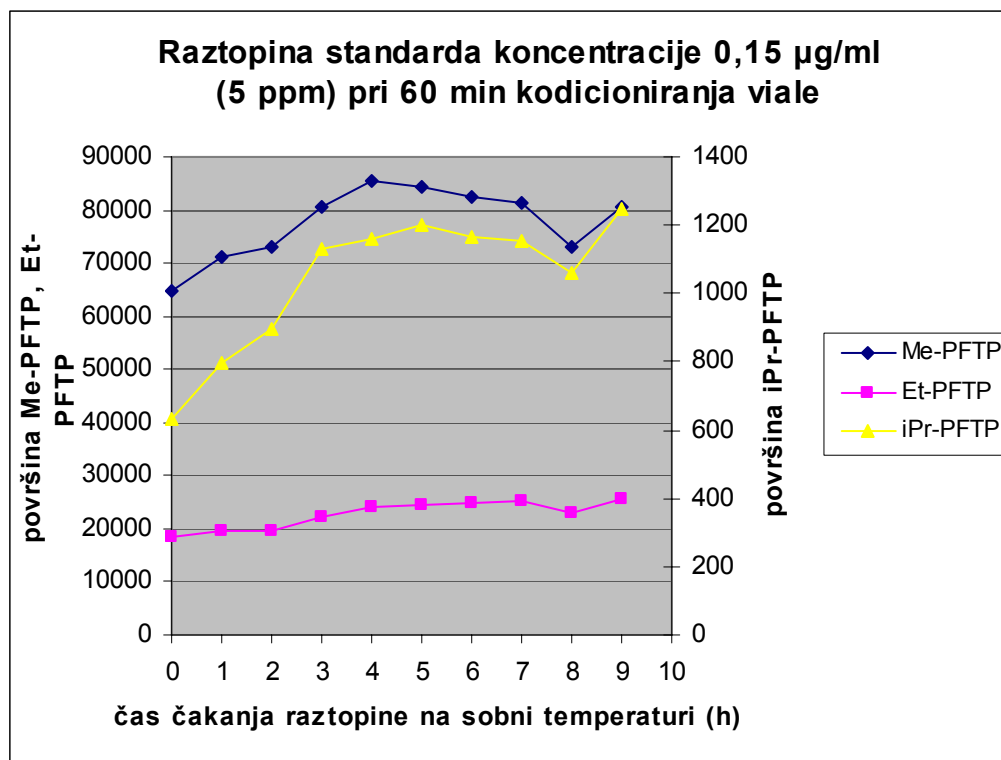
Pri preverjanju samega časa reakcije v prejšnjem poglavju (4.2.7.) smo viala vsakokrat kondicionirali le 15 min., kasneje pa smo ta čas spreminjali, kar je prikazano na slikah 25, 26 in 27.



Slika 25: Graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od časa za raztopino standarda koncentracije 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (5 ppm v vzorcu) pri 15 min kondicioniranja viala.



Slika 26: Graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od časa za raztopino standarda koncentracije 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (5 ppm v vzorcu) pri 30 min kondicioniranja viala.

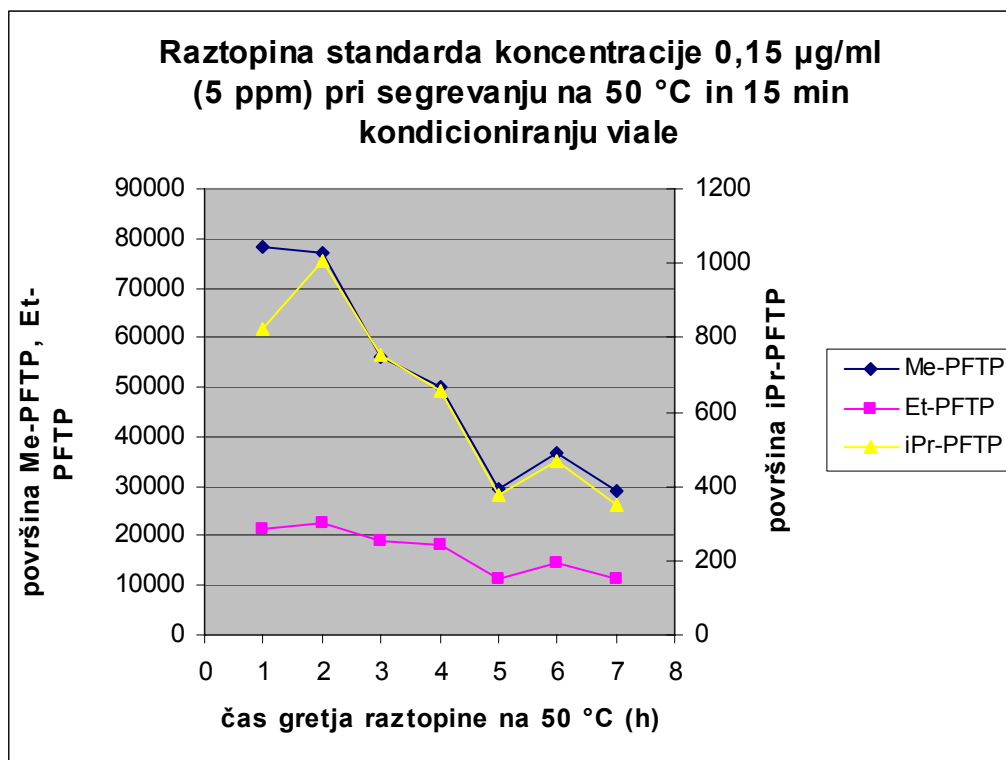


Slika 27: Graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od časa, za raztopino standarda koncentracije 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (5 ppm v vzorcu) pri 60 min kodicioniranja viala.

Primerjava grafov na slikah 26 in 27 z grafom na sliki 25, ki predstavlja 15 min kodicioniranja viala, nam kaže, da s podaljšanjem kodicioniranja viala ne pospešimo reakcije derivatizacije oziroma pospešimo stranske reakcije v katere stopajo produkti derivatizacije, zato je njihova koncentracija v analiziranih vzorcih nižja. Površine pod kromatografskimi vrhovi so namreč najvišje po 15 min kodicioniranja.

Preverili smo tudi, kako na površino vpliva segrevanje raztopin za analizo pred injiciranjem. Viala smo segrevali na 50 °C in jih po 15 min kodicioniranja viala v vzorčevalniku plinske faze injicirali v časovnem intervalu ene ure (slika 28).

Tudi v tem primeru smo ugotovili, da temperatura negativno vpliva na koncentracijo priskovanih derivatov, saj so se površine močno zmanjšale.



Slika 28: Graf odvisnosti površine kromatografskih vrhov od časa, za raztopino standarda koncentracije 0,15  $\mu\text{g/ml}$  (5 ppm v vzorcu) pri segrevanju raztopine na 50 °C in 15 min kondicioniranja viala.

Glede na vse opisane rezultate, smo izbrali pogoje, pri katerih je postopek pokazal največjo občutljivost.

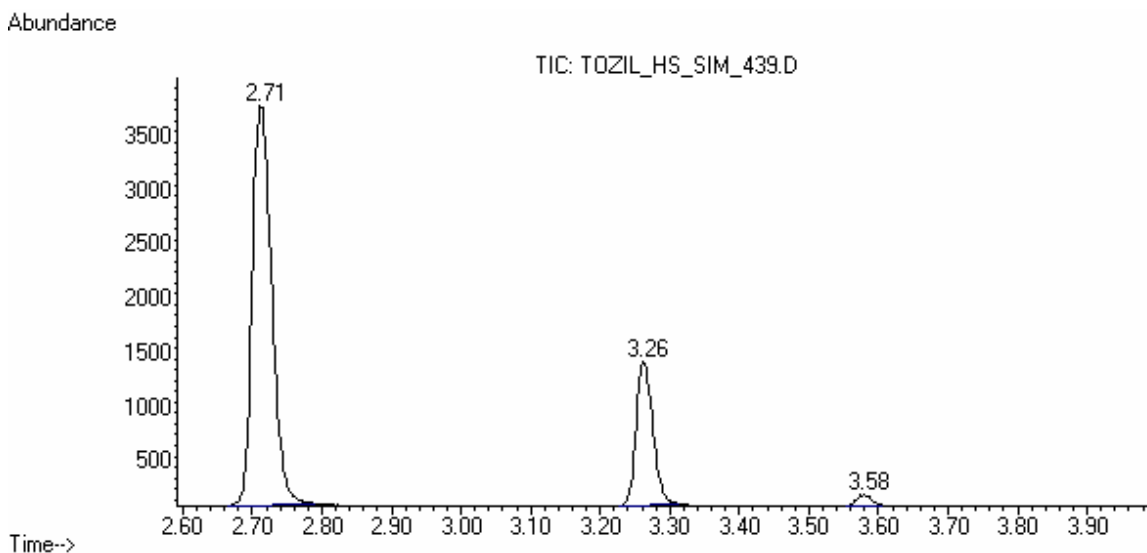
Ti pogoji so:

- Priprava raztopine reagenta: 20  $\mu\text{l}$  PFTP, 150  $\mu\text{l}$  5M NaOH v 10 ml vode
- Dodatek vode v raztopino za analizo: 1 ml vode
- Čas kondicioniranja viala: 15 min
- Čas za potek reakcije na sobni temperaturi: 8 ur

Pri teh pogojih in pogojih opisanih v poglavju 3.3.2.2 smo preverili ustreznost analitskega postopka.

### 4.2.7 Preverjanje ustreznosti analitskega postopka

Naš cilj je bil razviti analitski postopek za določanje aklil tozilatov z mejo kvantifikacije nižjo od 1 ppm. 1 ppm (koncentracija 0,03 µg/ml) predstavlja mejo poročanja za vsebnost aklil tozilatov. Kromatogram raztopine standardov je prikazan na sliki 29.



Slika 29: Kromatogram raztopine standardov koncentracije 0,03 µg/ml, kar ustreza 1 ppm v vzorcu.

#### 4.2.7.1 Meja zaznavnosti (detekcije) in meja določljivosti (kvantifikacije)

Meja detekcije (LOD) je najmanjša koncentracija analita, ki jo lahko zanesljivo (ločeno od ozadja) zaznamo. Na njeno vrednost vpliva razmerje signal:šum, ki mora biti vsaj 3:1. Meja kvantifikacije (LOQ) je najmanjša koncentracija, ki jo lahko zanesljivo kvantitativno ovrednotimo. V našem koncentracijskem območju je njena vrednost zanesljiva, če meritvam zagotavljamo primerno točnost (recovery med 80 in 120 %) in ponovljivost (RSD < 10 %). Razmerje signal:šum mora biti najmanj 10:1.

Dejanska meja kvantifikacije za preiskovane analite je bila nižja od 1 ppm, kar smo kasneje dokazali tudi z ustrezno točnostjo in ponovljivostjo. Razmerje signal:šum je bilo ustrezno za vse preiskovane analite (tabela VI). Meje detekcije nismo določali, ker nas je zanimalo samo koncentracijsko območje, kjer lahko analite kvantificiramo.

Tabela VI: Povprečna razmerja signal:šum vseh treh analitov pri koncentraciji 1 ppm.

| S/N (Y:1) | Me-PFTP | Et-PFTP | iPr-PFTP |
|-----------|---------|---------|----------|
| Y         | 370.7   | 206.8   | 18.5     |

Pri razmerjih signal:šum lahko opazimo, da lahko brez težav kvantitativno določimo koncentracije 1 ppm. Za Me-PFTP in Et-PFTP bi lahko bila ta meja še desetkrat nižja (0,1 ppm), vendar merjenje koncentracij, nižjih od 1 ppm, ni bilo potrebno.

#### 4.2.7.2 Natančnost (ponovljivost)

Natančnost je sposobnost analitske metode, da zagotavlja kar se da ponovljive rezultate. V okviru natančnosti smo opazovali ponovljivost metode in sicer na tak način, da smo meritve izvajali v kratkem časovnem obdobju pri enakih pogojih. Podamo jo kot absolutno (SD) oziroma relativno standardno odstopanje ali deviacijo (RSD).

Pripravili smo šest paralelk raztopine standardov koncentracij 0,03 µg/ml (1 ppm v vzorcu). Prav tako smo pripravili šest paralelk raztopin vzorca (30 mg/ml) z dodanim standardom (tabela VII). Preverili smo ponovljivost rezultatov standardne raztopine (tabela VI) in ponovljivost vzorca z dodanim standardom (tabela VIII). Ponovljivost določanja vseh analitov je bila pod 10 %, kar ustreza našim zahtevam (RSD < 10 %). Ponovljivost je bila slabša pri vzorcih z dodanim standardom, kar kaže da matriks tudi nekoliko vpliva na potek reakcije.

Tabela VII: Ponovljivost metode za standardno raztopino koncentracije 0,03 µg/ml, kar ustreza 1 ppm analitov v vzorcu.

| Raztopina standarda koncentracije 0,03 µg/ml (1 ppm) | Me-PFTP      | Et-PFTP      | iPr-PFTP    |
|--|--------------|--------------|-------------|
| Površina 1   | 71513        | 20777        | 1344        |
| Površina 2   | 69874        | 19879        | 1307        |
| Površina 3   | 69752        | 20705        | 1370        |
| Površina 4   | 70169        | 20513        | 1351        |
| Površina 5   | 72145        | 21314        | 1473        |
| Površina 6   | 71378        | 20817        | 1389        |
| Povprečna vrednost                                   | <b>70805</b> | <b>20668</b> | <b>1372</b> |
| SD   | <b>1001</b>  | <b>469</b>   | <b>56</b>   |
| RSD (%)  | <b>1.4</b>   | <b>2.3</b>   | <b>4.1</b>  |

Tabela VIII: Ponovljivost metode za raztopino vzorca (30 mg/ml) z dodanim standardom koncentracije 0,03 µg/ml, kar ustreza 1 ppm analitov v vzorcu.

| Vzorec (30 mg/ml) +<br>0,03 µg/ml dodanega<br>standarda (1 ppm) | Me-PFTP      | Et-PFTP      | iPr-PFTP    |
|---|--------------|--------------|-------------|
| Površina 1  | 70403        | 20829        | 1357        |
| Površina 2  | 62008        | 19026        | 1130        |
| Površina 3  | 68463        | 20680        | 1295        |
| Površina 4  | 67511        | 20410        | 1207        |
| Površina 5  | 67671        | 20997        | 1406        |
| Površina 6  | 62931        | 19174        | 1138        |
| Povprečna vrednost  | <b>66498</b> | <b>20186</b> | <b>1256</b> |
| SD  | <b>3298</b>  | <b>864</b>   | <b>115</b>  |
| RSD (%)   | <b>5.0</b>   | <b>4.3</b>   | <b>9.2</b>  |

#### 4.2.7.3 Točnost

Točnost je definirana kot ujemanje med izmerjenim rezultatom in dejansko vrednostjo. Rezultate podamo kot povprečje razmerij med s preiskovano analitsko metodo izmerjeno vrednostjo in dejansko vrednostjo.

Do rezultatov smo prišli tako, da smo vzorcu dodali raztopino standarda, ki ustreza koncentraciji 1 ppm. Od teh meritev smo odšteli površine dobljene pri meritvah vzorca (izmerjene vrednosti) in jih primerjali s tistimi, ki smo jih dodali (dejanske vrednosti). Rezultati so podani v tabeli IX.

Tabela IX: Točnost metode.

| Meritve točnosti     | Me-PFTP (%) | Et-PFTP (%) | iPr-PFTP (%) |
|----------------------|-------------|-------------|--------------|
| 1                    | 99.4        | 100.8       | 98.9         |
| 2                    | 86.0        | 92.0        | 82.3         |
| 3                    | 96.3        | 100.1       | 94.4         |
| 4                    | 94.8        | 98.7        | 88.0         |
| 5                    | 95.0        | 101.6       | 102.5        |
| 6                    | 87.5        | 92.7        | 82.9         |
| Povprečni izkoristek | <b>93.2</b> | <b>97.6</b> | <b>91.5</b>  |



#### 4.2.7.4 Linearnost

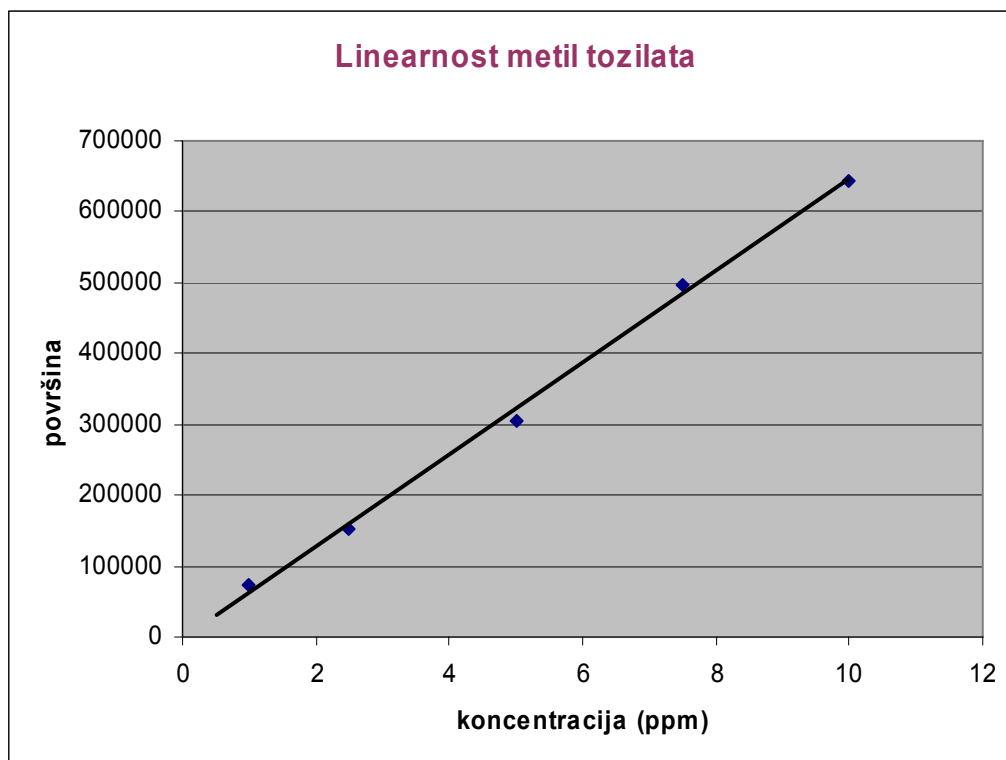
Linearnost je zmožnost metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije preiskovanega analita. Določimo jo z injiciranjem petih ali večih standardov različnih koncentracij. Rezultate preverimo z risanjem umeritvene premice, s katero opazujemo odvisnost merjenega signala od koncentracije analita. Splošna enačba umeritvene premice je  $y=a+bx$ , pri tem  $y$  predstavlja površino kromatografskega vrha,  $x$  pa koncentracijo merjenega analita. Z  $b$  označimo naklon premice, z  $a$  pa odsek na ordinati. Rezultat podamo s Pearsonovim ( $R$ ) oziroma determinacijskim koeficientom ( $R^2$ ). Pearsonov (korelacijski) koeficient nam pove jakost linearne povezave med spremenljivkama  $x$  in  $y$ . Determinacijski koeficient nam pove, kolikšen del variance ene spremenljivke lahko pojasnimo z variiranjem druge. Metoda predstavlja ustrezno linearnost pri  $R \geq 0,99$ .

Linearnost metode smo preizkusili v območju od 1 do 10 ppm (slike 30, 31 in 32) .

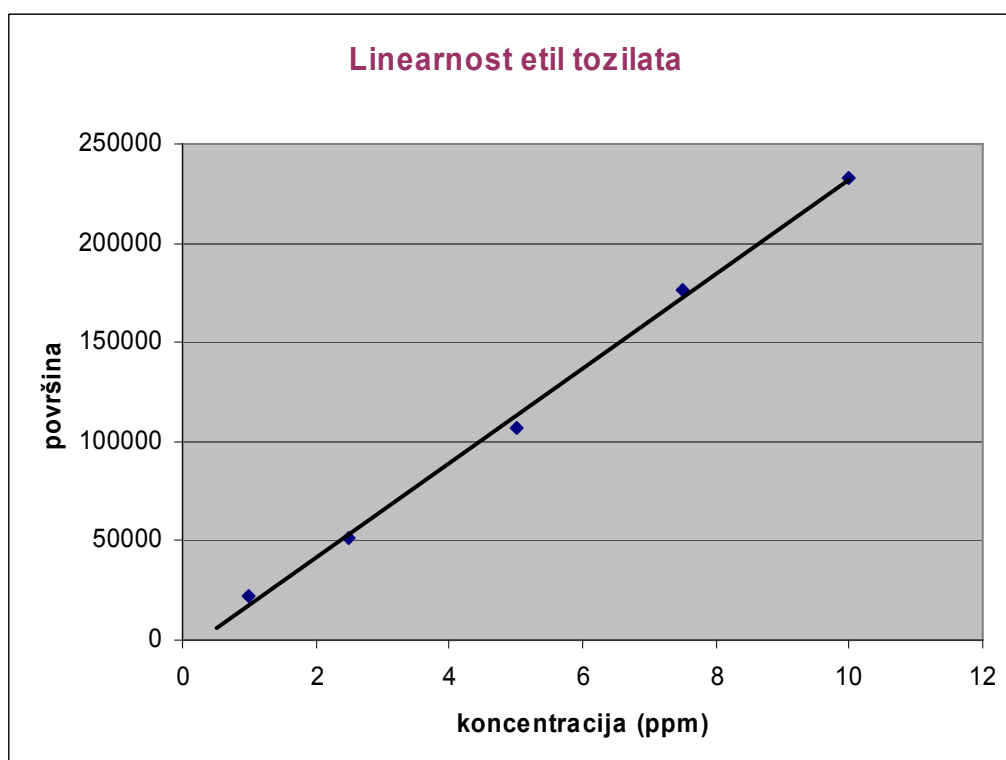
Glede na dobljene rezultate lahko ugotovimo, da je metoda v območju od 1 do 10 ppm linearna.

*Tabela X: Površine analitov pri različnih koncentracijah za ugotavljanje linearnosti.*

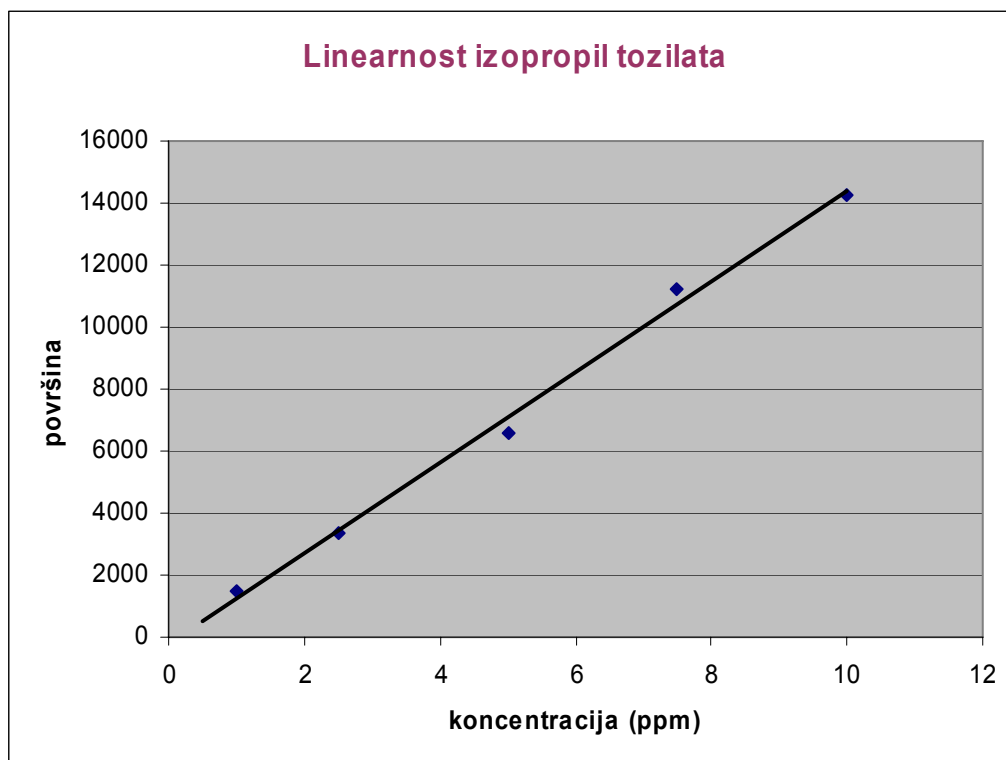
| Linearnost                       | Me-PFTP (površina)      | Et-PFTP (površina)          | iPr-PFTP (površina)       |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1 ppm                            | 73383                   | 22564                       | 1471                      |
| 2.5 ppm                          | 152452                  | 51228                       | 3366                      |
| 5 ppm                            | 304280                  | 106424                      | 6612                      |
| 7.5 ppm                          | 497630                  | 176082                      | 11217                     |
| 10 ppm                           | 643994                  | 232708                      | 14226                     |
| <b>R</b>                         | <b>0,9985</b>           | <b>0,9986</b>               | <b>0,9976</b>             |
| <b>Enačba umeritvene premice</b> | $y=64822,424x-2728,805$ | $y = 23782.698x - 5868.829$ | $y = 1453.942x - 182.098$ |



Slika 30: Graf linearnosti za metil tozilat v območju od 1 do 10 ppm.



Slika 31: Graf linearnosti za etil tozilat v območju od 1 do 10 ppm.



Slika 32: Graf linearnosti za izopropil tozilat v območju od 1 do 10 ppm.

Iz rezultatov preverjanja ustreznosti analitskega postopka lahko zaključimo, da je HS metoda z derivatizacijo dovolj zanesljiva za merjenje zelo nizkih koncentracij (1 ppm) metil, etil in izopropil tozilata v vzorcu ATV-44. Metoda izkazuje ustrezno ponovljivost, točnost, linearnost. Ugotovili smo, da alkil tozilati v vzorcu ATV-44 niso prisotni.

## 5. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo razvili analitski postopek za določanje genotoksičnih alkil tozilatov s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Ker so alkil tozilati znane genotoksične nečistote, je njihova detekcija in kvantifikacija v zdravilnih učinkovinah in njihovih intermediatih nujna.

Pri razvoju metode z direktnim injiciranjem smo ugotovili nizko odzivnost alkil tozilatov. Največ težav smo imeli s temperaturo injektorja. Glede na zelo visoka vrelišča tozilatov, smo sklepali, da je ta potrebna, vendar smo s pomočjo eksperimentalnih podatkov ugotovili, da je temperatura 250 °C dovolj, da se tozilati uparijo in pri tem ne razpadejo. Pri injiciranju vzorca z dodanim standardom smo ugotovili, da so kromatografski vrhovi bistveno nižji od tistih pri raztopini standarda. Glede na to lahko sklepamo, da matriks vzorca zelo moti analizo. Močno vpliva na ustreznost metode in kar je tudi zelo pomembno, močno onesnaži sistem in zmanjšuje življensko dobo kolone.

Pri HS metodi smo alkil tozilate derivatizirali s PFTP in detektirali derivatizirane produkte (Me-PFTP, Et-PFTP in iPr-PFTP). Največjo težavo nam je predstavljal iPr-PFTP zaradi svoje nizke odzivnosti. Ker povišanje temperature pečice, zanke in transportne cevi pri vzorčevalniku plinske faze ni dalo višjega odziva, zato smo sklepali, da je težava v poteku reakcije derivatizacije in ne v kromatografskih pogojih.

Za uspešen potek reakcije je bila potrebna predhodna priprava raztopine reagenta, ki je vsebovala reagent in bazo, oba raztopljena v deionizirani vodi. Po primerjanju površin kromatografskih vrhov in koncentracij reagenta ter baze, smo prišli do zaključka, da je najbolj optimalna priprava raztopine reagenta naslednja: 20 µl PFTP, 150 µl 5M NaOH v 10 ml vode. Omogočala je najvišjo odzivnost derivatiziranih alkil tozilatov.

V raztopine za analizo smo dodali tudi vodo, ki je močno povečala odzive analitov. Pri dodajanju različne količine vode smo ugotovili najvišjo odzivnost pri dodatku 1 ml le-te.

S spremljanjem reakcije skozi daljši čas (injiciranje v intervalu ene ure v obdobju dvajsetih ur) smo se odločili, da je optimalni čas reakcije 8 ur.

Spreminjali smo tudi čas kondicioniranja vial v vzorčevalniku plinske faze (15 min, 30 min in 60 min) in reakcijo prav tako spremljali 20 ur. Prišli smo do zaključka, da je 15 min kondicioniranja vial ter 8 ur na sobni temperaturi najboljša kombinacija, ki daje ustrezne rezultate.

Pri teh pogojih smo preverili ustreznost HS metode z derivatizacijo. Preverili smo ponovljivost, točnost, linearnost in mejo kvantifikacije. Dobili smo dobro ponovljive rezultate, z RSD-jem pod 5 % pri standardu in pod 10 % pri vzorcu. Točnost je bila znotraj intervala, postavljenega pred analizo (80 – 120 %), linearnost ustrezna in meja kvantifikacije 1 ppm ( $S/N > 10$ ). Metoda popolnoma ustreza vsem zahtevam, ki jih je potrebno izpolniti, da lahko rečemo, da pri določenih pogojih daje ponovljive in točne rezultate.

Derivatizacijska HS-GC-MS metoda, ki smo jo razvili, izkazuje v primerjavi z že objavljenimi boljšo občutljivost in nižjo mejo kvantifikacije. Metodo smo optimizirali do te mere, da daje ponovljive in točne rezultate na zelo nizki meji kvantifikacije (1 ppm).

Predvidevamo, da bi našo metodo lahko (z minimalnimi modifikacijami) uporabili tudi za določanje alkil tozilatov v drugih intermediatih ali učinkovinah, kjer obstaja možnost, da so le-ti prisotni in je zato njihova kontrola potrebna.

Tako lahko zaključimo, da nam je uspelo razviti in dokazati ustreznost GC-MS metode za določanje metil, etil in izopropil tozilata v vzorcu ATV-44. Hkrati pa smo dokazali, da v vzorcu ATV-44 tozilati niso prisotni.

## 6. LITERATURA

1. Mutacija (<http://sl.wikipedia.org/wiki/Mutacija>; odprto dne 10.2.2011)
2. Janson M A: Genotoxic Impurity Analysis in Pharmaceuticals, Magisterska naloga, Faculty of the graduate school (Pharmaceutical science), University of Southern California, 2009: 2-4
3. Arkema: Genotoxic Sulfonate Esters in Pharmaceuticals, 2007  
(<http://www.arkema-inc.com/pdf/thio/AMSA/Arkema.Brochure.PharmaGenotox.V2.pdf>)
4. Eder E.: On the role of alkylating mechanisms, O-alkylation and DNA-repair in genotoxicity and mutagenicity of alkylating methanesulfonates of widely varying structures in bacterial systems; *Chemico-Biological Interactions* 2001;137: 89-99
5. Kushwaha P: Genotoxic Impurities In Pharmaceuticals, *Pharmainfo.net* 2010; 8: 1-12
6. Jacobson-kram D, Mcgovern T: Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Advanced drug delivery reviews* 2007; 59: 38-42.
7. Muller L, Mauthe R J: A rationale for determining, testing and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2006; 44: 198-211.
8. European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP): Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities, Doc. Ref. EMEA/CHMP/QWP/ 251344/2006  
(<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/519902en.pdf>.)
9. Ed. Lester Breslow: *Encyclopedia of Public Health*, Gale Cengage, 2006  
(<http://www.enotes.com/public-health-encyclopedia/ames-test>; odprto dne 2. 3.20211)
10. Ames test ([http://en.wikipedia.org/wiki/Ames\\_test](http://en.wikipedia.org/wiki/Ames_test); odprto dne 14.2.2011)

11. Elder D P, Teasdale A, Lipczynski A M: Control and analysis of alkyl esters of alkyl and aryl sulfonic acids in novel active pharmaceutical ingredients (APIs), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; 46: 1-8
12. Skoog, Leary: *Principles of Instrumental Analysis*, 6<sup>th</sup> Ed., Thomson Brooks/Cole 2008: 762
13. Skoog, Leary: *Principles of Instrumental Analysis*, 6<sup>th</sup> Ed., Thomson Brooks/Cole 2008: 817-855 (High-Performance Liquid Chromatography)
14. Taylor G E, Gosling M, Pearce A: Low level determination of p-toluenesulfonate and benzenesulfonate esters in drug substance by high performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2006: 231–237
15. AstraZeneca R&D Charnwood: Direct analysis by LC/MS speeds up determination of potential genotoxins in Pharmaceutical drug candidates, Agilent Tehnologies, (<http://www.chem.agilent.com/Library/casestudies/Public/5989-7925EN.pdf>)
16. Bailey B, Plante M, Crafts C, Gamache P, Waraska J, Acworth I: Sensitive Analysis of Genotoxins by HPLC-ECD Using Boron-Doped Diamond, (<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/85907-PO-HPLC-Genotoxins-12July2010-LPN2557-1.pdf>)
17. Gas chromatography  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Gas\\_chromatography](http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography); odprto dne 23.2.2011)
18. Skoog, Leary: *Principles of Instrumental Analysis*, 6<sup>th</sup> Ed., Thomson Brooks/Cole 2008: 788-815 (Gas Chromatography)
19. ChromAcademy  
[http://www.chromacademy.com/resolver-november2010\\_Understanding\\_GCMS\\_part\\_1.asp](http://www.chromacademy.com/resolver-november2010_Understanding_GCMS_part_1.asp); odprto dne 25.2.2011

20. Skoog, Leary: Principles of Instrumental Analysis, 6<sup>th</sup> Ed., Thomson Brooks/Cole 2008: 550-588 (Mass Spectrometry)
21. Wittmann C: Fluxome analysis using GC-MS. Microbial Cell Factories 2007; 5
22. SMI-LabHut Ltd, The Granary, The Steadings Business Centre, Maisemore, UK (<http://www.labhut.com/education/headspace/introduction01.php>; odprto dne 25.2.2011)
23. Kolb B, Ettre L S: Static headspace-gas chromatography Theory and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997: 1-16
24. Lee C R, Guivarch F, Nguyen Van Dau C, Tessuer D, Krstulovic A M: Determination of polar alkylating agents as thiocyanate/isothiocyanate derivatives by reaction headspace gas chromatography, The Analyst 2003: 857-863
25. Alzaga R, Ryan R W, Taylor-Worth K, Lipczynski A M, Szus R, Sandra P: A generic approach for the determination of residues of alkylating agents in active pharmaceutical ingredients by in situ derivatization-headspace-gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007: 472-479