



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Jelena Kovačić Šantek

**RAZVOJ EKOLOŠKI PRIHVATLJIVIH  
KROMATOGRAFSKIH METODA  
PRIMIENJIVIH U  
PREDFORMULACIJSKIM I  
BIOANALITIČKIM STUDIJAMA  
ETRASIMODA I RITLECITINIBA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Jelena Kovačić Šantek

**RAZVOJ EKOLOŠKI PRIHVATLJIVIH  
KROMATOGRAFSKIH METODA  
PRIMIENJIVIH U  
PREFORMULACIJSKIM I  
BIOANALITIČKIM STUDIJAMA  
ETRASIMODA I RITLECITINIBA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica:

prof. dr. sc. Ana Mornar Turk

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Jelena Kovačić Šantek

**DEVELOPMENT OF  
ENVIRONMENTALLY FRIENDLY  
CHROMATOGRAPHIC METHODS  
APPLICABLE IN THE  
PREFORMULATION AND  
BIOANALYTICAL STUDIES OF  
ETRASIMOD AND RITLECITINIB**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Full Professor with Tenure Ana Mornar Turk, PhD

Zagreb, 2026

Rad predstavljen u ovoj doktorskoj disertaciji izveden je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, u Centru za translacijska istraživanja i inovacije u farmaciji te u HALMEDU-u, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk. Istraživanje je financirano od Hrvatske zaklade za znanost kroz projekte „Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva“ (HRZZ-UIP-2017-05-3949; HRZZ-DOK-2021-02-7922) i „Napredne i održive metode analize novih lijekova za upalne bolesti crijeva“ (HRZZ-IP-2025-02-2541).



## Zahvala

Prije svega, želim izraziti iskrenu zahvalnost mentorici, **prof. dr. sc. Ani Mornar Turk**. Iznimno sam sretna što sam ju upoznala i s ponosom mogu reći da bolju mentoricu za vođenje doktorskog rada nisam mogla poželjeti. Svojom smirenošću i neiscrpnim znanjem bila je neprocjenjiva podrška tijekom cijelog doktorskog studija. Posebno sam zahvalna na njezinoj pristupačnosti, toplini i razumijevanju, kao i spremnosti da uvijek sasluša, savjetuje i pomogne, čak i u trenucima kada je to nadilazilo mentorsku obvezu. Uz svu stručnost i ozbiljnost znanstvenog rada, posebno ću pamtiti i one ljudske, vedrije trenutke koje smo dijelile izvan laboratorija i radnog okruženja. Jedan od njih zasigurno je i ljetni boravak na Braču, gdje smo se, uz mnogo smijeha, gotovo prevrnule čamcem za dvoje, a nas u njemu bilo petero, što je pokazalo da je i izvan znanosti uvijek spremna na avanturu. Sada, kada je ovaj doktorski put uspješno priveden kraju, ostaje mi i jedna mala osobna obveza – da svoju mentoricu konačno počastim kavom, ovaj put bez rasprava o rokovima, tablicama, kromatogramima i prekasnom vađenju mog novčanika! :)

Zahvaljujem i kolegama s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, sa Zavoda za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale, a osobito **doc. dr. sc. Katarini Mužini** i **prof. dr. sc. Stanislavu Kurajici**, na razumijevanju, susretljivosti i spremnosti da mi omoguće provođenje dijela istraživanja u njihovom laboratoriju.

Posebnu zahvalnost upućujem i **dr. sc. Snježani Zubčić iz HALMED-a** na podršci, pomoći i stručnim savjetima. Također joj zahvaljujem na mogućnosti provođenja dijela istraživanja u njezinoj instituciji, što je uvelike pridonijelo cjelovitosti i praktičnoj vrijednosti ovoga rada.

Najposebniju zahvalnost upućujem **svom mužu Markecu**, koji je sa mnom prolazio svaki korak ovog doktorskog puta – od samog početka do njegova završetka. Bio je uz mene u trenucima entuzijazma, ali i u onim trenucima sumnje, umora i preispitivanja, uvijek s neizmjernim razumijevanjem, strpljenjem i podrškom. Njegova ljubav bili su moja snaga i oslonac, a njegova prisutnost podsjetnik da nijedan uspjeh nema pravu vrijednost ako se ne dijeli s onima koje volimo.

*Za sve što jesam i što sam postigla zahvaljujem svojim roditeljima, Jasni i Slaveku, koji su me od malih nogu školovali, poticali i učili vrijednostima rada, upornosti i odgovornosti. Njihova podrška, žrtva i vjera u mene temelj su svih mojih uspjeha.*

*Zahvaljujem se i prijateljima s FKIT-a (posebice Rokiju, Mrkiju i Viki), a posebno prof. dr. sc. Šimi Ukiću, mentoru mog završnog i diplomskog rada, koji je u mene usadio ljubav prema analitičkoj kemiji i usmjerio me na znanstveni put kojim sam nastavila.*

*Zahvaljujem i svom malom krugu pravih ljudi i obitelji, koji su uvijek bili tu – u dobrim i težim trenucima! Bez vas ovo sve ne bi imalo smisla.*

*Posebnu zahvalnost upućujem i svojoj nećakinji Marli, koja me na ovom putu, često i nesvjesno, podsjećala na ono najvažnije. Naučila me da su djeca ono neiskvareno u svijetu – puna ideja, iskrenog veselja i radosti – te da je upravo ona dokaz kako je za istinsku sreću potrebno vrlo malo.*

*„Na kraju ovog dugog puta, s olakšanjem mogu reći: mislim, dakle – završila sam.”*

*Vaša JKŠ*

## SAŽETAK

Upalna bolest crijeva obuhvaća kronične imunološki posredovane poremećaje koji zahtijevaju dugotrajnu farmakoterapiju. Etrasimod i ritlecitinib pripadaju novoj generaciji malih molekula s potencijalnom primjenom u liječenju upalne bolesti crijeva i drugih imunoloških poremećaja, no njihova stabilnost i putevi razgradnje još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Cilj ove doktorske disertacije bio je razviti i validirati stabilitetno-indikativne i bioanalitičke metode za navedene djelatne tvari, ispitati njihovu kompatibilnost s odabranim pomoćnim tvarima te procijeniti ekološku prihvatljivost razvijenih metoda. Studije prisilne razgradnje provedene su prema ICH smjernicama primjenom kiselih, bazičnih, oksidativnih, termičkih i fotolitičkih uvjeta stresa. Razvijene HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metode omogućile su potpuno razdvajanje djelatnih tvari od produkata razgradnje. Identificirano je osam produkata razgradnje etrasimoda i četiri produkta razgradnje ritlecitiniba, koji su strukturno okarakterizirani masenom spektrometrijom. Utvrđeno je da etrasimod slijedi kinetiku prvog reda, s najbržom razgradnjom u kiselim uvjetima, dok razgradnja ritlecitiniba ovisi o uvjetima stresa te slijedi kinetiku drugog reda u bazičnim i nultog reda u oksidativnim uvjetima. Ispitivanje kompatibilnosti s kitozonom, hijaluronskom kiselinom i ksantan gumom nije pokazalo značajne kemijske interakcije, potvrđujući njihovu prikladnost za razvoj novih formulacija. Razvijene su i validirane HPLC-DAD-QQQ-MS/MS bioanalitičke metode za određivanje etrasimoda i ritlecitiniba u ljudskoj plazmi u skladu sa smjernicom ICH M10. Metode su pokazale zadovoljavajuću linearnost, preciznost, točnost, selektivnost, robusnost i integritet razrjeđenja. Optimizirani postupak pripreme uzoraka omogućio je učinkovito smanjenje utjecaja matrice i pouzdanu kvantifikaciju analita. Procjena ekološke prihvatljivosti primjenom više metričkih alata pokazala je visok stupanj ekološke prihvatljivosti stabilitetno-indikativnih metoda te prihvatljiv zeleni profil bioanalitičkih metoda. Dobiveni rezultati potvrđuju mogućnost razvoja analitičkih pristupa koji istodobno zadovoljavaju regulatorne zahtjeve, omogućuju pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju djelatnih tvari te uvažavaju načela zelene analitičke kemije.

Ključne riječi: upalna bolest crijeva, etrasimod, ritlecitinib, prisilna razgradnja, HPLC-MS/MS, zelena analitička kemija

## SUMMARY

**Introduction:** Inflammatory bowel diseases (IBD), primarily Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic, immune-mediated disorders characterized by relapsing inflammation of the gastrointestinal tract and a substantial impact on patients' quality of life. Despite significant advances in therapeutic strategies, a considerable proportion of patients fails to achieve sustained remission or experiences loss of response over time. In recent years, increasing attention has been directed toward orally administered small-molecule drugs, which offer advantages over biological therapies in terms of ease of administration, manufacturing complexity, pharmacokinetic flexibility, and cost-effectiveness.

Among these, sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor modulators and Janus kinase (JAK) inhibitors represent particularly promising therapeutic classes. Etrasimod, a selective S1P receptor modulator, and ritlecitinib, a selective JAK3 and TEC kinase inhibitor, belong to a new generation of targeted small molecules with demonstrated or emerging clinical relevance in immune-mediated diseases, including inflammatory bowel diseases. Although their pharmacological efficacy and clinical potential have been increasingly explored, comprehensive data on their chemical stability, degradation behavior, compatibility with pharmaceutical excipients, and reliable bioanalytical quantification remain limited. Such information is essential during early drug development, as it directly affects formulation design, quality control strategies, and the interpretation of pharmacokinetic and clinical data.

At the same time, contemporary pharmaceutical analysis faces growing pressure to reduce environmental impact and align analytical practices with the principles of green analytical chemistry. This challenge is particularly evident in stability and bioanalytical studies, which traditionally involve complex sample preparation procedures, high solvent consumption, and energy-intensive instrumentation.

Therefore, the aim of this doctoral dissertation was to develop, validate, and comprehensively evaluate stability-indicating and bioanalytical chromatographic methods for etrasimod and ritlecitinib, while simultaneously assessing their

environmental sustainability. By integrating forced degradation studies, advanced mass spectrometric characterization, bioanalytical method development, excipient compatibility testing, and green analytical assessment, this work seeks to provide a holistic analytical framework applicable to both preformulation and bioanalytical phases of drug development.

**Methods:** Forced degradation studies were conducted in accordance with ICH guidelines (ICH Q1A(R2) i Q1B) to investigate the intrinsic stability of etrasimod and ritlecitinib and to elucidate their degradation pathways. The active pharmaceutical ingredients were subjected to acidic, alkaline, oxidative, thermal, and photolytic stress conditions. Based on the degradation behavior observed, stability-indicating chromatographic methods were developed using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-QQQ-MS/MS). Method development focused on achieving complete chromatographic separation between the active pharmaceutical ingredient and degradation products. The developed stability-indicating methods were validated in accordance with ICH Q2(R2) guidelines, evaluating parameters such as selectivity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification, and stability. Degradation products formed under stress conditions were identified and structurally characterized using tandem mass spectrometry. In addition, degradation kinetic study was performed to determine the order and rate of degradation under different stress conditions, providing mechanistic insight into the stability profiles of both compounds.

Compatibility studies between the active pharmaceutical ingredients and selected excipients were performed to assess potential physicochemical interactions relevant to formulation development. A combination of experimental techniques was applied, including differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and isothermal stress testing.

For the bioanalytical part of the study HPLC-DAD-QQQ-MS/MS methods were developed for the determination of etrasimod and ritlecitinib in human plasma. Sample preparation procedures were systematically optimized, with particular emphasis on

minimizing matrix effects while maintaining analytical sensitivity. The final protocol included protein precipitation with methanol, phospholipid removal, and evaporation to dryness prior to reconstitution. Bioanalytical methods were validated in accordance with current regulatory guidelines (ICH M10), including assessment of selectivity, linearity, accuracy, precision, extraction efficiency, matrix effects, dilution integrity, and stability. Finally, the environmental sustainability of the developed analytical methods was evaluated using multiple green analytical chemistry assessment tools. These metrics considered factors such as solvent consumption, reagent toxicity, energy demand, waste generation, and overall method complexity, enabling a comparative assessment of forced degradation and bioanalytical approaches.

**Results and discussion:** The developed high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-QQQ-MS/MS) stability-indicating methods achieved complete chromatographic separation of the active pharmaceutical ingredient from all detectable degradation products, confirming their suitability for stability assessment. Validation of the stability-indicating methods demonstrated excellent analytical performance in accordance with ICH Q2(R2) requirements. Both methods showed high selectivity, with no co-eluting peaks observed between the active pharmaceutical ingredients and their degradation products. Calibration curves were linear over the investigated concentration ranges, with correlation coefficients ( $r$ ) 0.9998 for etrasimod and 0.9999 for ritlecitinib. Method precision, expressed as relative standard deviation (RSD), was  $\leq 0.39\%$  for etrasimod and 0.15% for ritlecitinib. Accuracy ranged from 100.3% to 102.0% for etrasimod, and from 99.9% to 100.3% for ritlecitinib across all tested concentration levels. Limits of detection (LOD) were 0.10  $\mu\text{g/mL}$  for etrasimod and 0.04  $\mu\text{g/mL}$  for ritlecitinib, while limits of quantification (LOQ) were 0.34  $\mu\text{g/mL}$  and 0.14  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. A total of eight degradation products of etrasimod and four degradation products of ritlecitinib were structurally characterized using tandem mass spectrometry. Study of degradation kinetic revealed that etrasimod degradation followed first-order kinetics, with the highest degradation rate observed under acidic conditions. In contrast, ritlecitinib degradation kinetics varied depending on the applied stress, following second-order kinetics under alkaline conditions and zero-order kinetics during oxidative degradation. These kinetic parameters provide mechanistic insight into the

degradation pathways and are relevant for predicting long-term stability and defining appropriate storage conditions.

Compatibility studies revealed no significant chemical or physical interactions between the active pharmaceutical ingredients and the selected excipients, as confirmed by thermal, spectroscopic, and microscopic analyses. These findings support the suitability of etrasimod and ritlecitinib for further pharmaceutical formulation development.

The high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-DAD-QQQ-MS/MS) methods exhibited excellent validation characteristics in accordance with ICH M10, EMA, and FDA guidelines. The methods demonstrated high selectivity, with no significant endogenous interferences observed at the retention times of the analytes and internal standards in six different blank plasma samples. Calibration curves were linear over the validated concentration ranges, with correlation coefficient 0.999 for etrasimod and ritlecitinib. The lower limit of quantification (LLOQ) values were 50 ng/mL for etrasimod and 75 ng/mL for ritlecitinib. Intra- and inter-day accuracy for quality control samples at low, medium, and high concentration levels ranged between 97.19% and 102.48% for etrasimod and between 99.9% and 100.3% for ritlecitinib, while precision (expressed as RSD) was below 7% for etrasimod and 6.35% for ritlecitinib. Accuracy was within  $\pm 20\%$  and precision below 20%, as required by regulatory guidelines. Recovery of both analytes was reproducible and consistent across the tested concentration range. Matrix effect evaluation showed controlled ion suppression or enhancement, with variability remaining within acceptable limits. The optimized sample preparation procedure, which included protein precipitation, phospholipid removal, and evaporation to dryness, effectively minimized matrix-related variability and ensured reproducible quantitative results.

Green analytical assessment demonstrated that the forced degradation methods achieved a high level of environmental acceptability, primarily due to optimized chromatographic conditions, reduced solvent consumption, and efficient analysis time. Although the bioanalytical methods were inherently more complex and resource-intensive, their environmental impact remained within acceptable limits when evaluated against regulatory and analytical performance requirements. Overall, the results demonstrate that

environmentally conscious analytical approaches can be successfully integrated into advanced pharmaceutical analysis without compromising data quality.

**Conclusion:** This doctoral dissertation demonstrates that stability-indicating and bioanalytical chromatographic methods for etrasimod and ritlecitinib can be successfully developed and validated in accordance with regulatory requirements while incorporating principles of green analytical chemistry. Characterization of degradation pathways, supported by kinetic studies and mass spectrometric identification of degradation products, provides new insights into the stability of these compounds, while compatibility testing confirms their suitability for pharmaceutical formulation development. The validated bioanalytical methods enable reliable quantification of etrasimod and ritlecitinib in human plasma and are suitable for pharmacokinetic and clinical studies. Overall, this work provides a sustainable analytical framework that supports the development of modern small-molecule therapies for immune-mediated diseases.

**Keywords:** inflammatory bowel diseases, etrasimod, ritlecitinib, forced degradation, high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, green analytical chemistry

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Upalna bolest crijeva .....	1
1.2.1. Etrasimod .....	3
1.2. Inhibitori Janus kinaze (JAK).....	5
1.3.1. Ritlecitinib .....	6
1.3. Predformulacijske studije .....	9
1.4.1. Studije prisilne razgradnje.....	9
1.4.2. Razvoj i validacija stabilitetno-indikativne metode .....	11
1.4.3. Ispitivanje kompatibilnosti djelatne i pomoćne tvari .....	13
1.4. Bioanalitika .....	15
1.5.1. Priprema uzoraka u bioanalitici.....	16
1.5.2. Validacija bioanalitičkih metoda .....	18
1.5. Zelena analitička kemija.....	20
1.6. Pregled dosad objavljenih analitičkih metoda za etrasimod i ritlecitinib .....	23
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	25
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	26
3.2.2.1. Kemikalije i reagensi.....	26
Analitički standardi .....	26
Pomoćne tvari.....	26
Otapala, kiseline, lužine i soli .....	26
Pribor .....	28
Programi .....	29
3.2.2.1. Metode.....	30

3.2.1. Stabilitetno-indikativna metoda za etrasimod .....	30
3.2.1.1. Priprema standardnih otopina .....	30
3.2.1.2. HPLC-DAD- <u>QQQ</u> -MS/MS metoda .....	30
3.2.1.3. Validacija stabilitetno-indikativne metode .....	31
3.2.2. Stabilitetno-indikativna metoda za rilecitinib.....	32
3.2.2.1. Priprema standardnih otopina .....	32
3.2.2.2. HPLC-DAD- <u>QQQ</u> -MS/MS metoda .....	32
3.2.2.3. Validacija stabilitetno-indikativne metode .....	33
3.2.3. Studija prisilne razgradnje etrasimoda .....	34
3.2.3.1. Priprema standardne otopine etrasimoda .....	34
3.2.3.2. Priprema uzoraka za prisilnu razgradnju .....	34
3.2.3.2. Analiza uzoraka .....	35
3.2.4. Studija prisilne razgradnje ritlecitiniba .....	35
3.2.4.1. Priprema standardne otopine ritlecitiniba .....	36
3.2.4.2. Priprema uzoraka za prisilnu razgradnju .....	36
3.2.4.3. Analiza uzoraka .....	36
3.2.5. Ispitivanje kompatibilnosti etrasimoda i pomoćnih tvari .....	37
3.2.5.1. Priprema uzoraka etrasimoda i pomoćnih tvari za ispitivanje kompatibilnosti.....	37
3.2.5.3. Rengenska difrakcija (XRD) .....	37
3.2.5.4. Fourierova transformacijska infracrvena (FTIR) spektroskopija .....	37
3.2.5.5. Diferencijalna termalna analiza (DTA) i termogravimetrijska analiza (TGA) .....	37
3.2.5.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	38
3.2.5.7. Izotermalna studija razgradnje (IST) .....	38
3.2.6. Ispitivanje kompatibilnosti rilecitiniba i pomoćnih tvari .....	38

3.2.6.1. Priprema uzoraka ritlecitiniba i pomoćnih tvari za ispitivanje kompatibilnosti .....	38
3.2.6.3. Rengenska difrakcija (XRD) .....	39
3.2.6.4. Fourierova transformacijska infracrvena (FTIR) spektroskopija .....	39
3.2.6.5. Diferencijalna termalna analiza (DTA) i termogravimetrijska analiza (TGA) .....	39
3.2.6.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) .....	39
3.2.6.7. Izotermalna studija razgradnje (IST) .....	39
3.2.7. Bioanalitička metoda za etrasimod .....	40
3.2.7.1. Priprema standardnih otopina .....	40
3.2.7.2. Prikupljanje uzoraka .....	40
3.2.7.3. Priprema uzoraka .....	40
3.2.7.4. HPLC-DAD-QQQ-MS/MS bioanalitička metoda .....	41
3.2.7.5. Validacija bioanalitičke metode .....	41
3.2.8. Bioanalitička metoda za ritlecitinib .....	43
3.2.8.1. Priprema standardnih otopina .....	43
3.2.8.2. Prikupljanje uzoraka .....	43
3.2.8.3. Priprema uzoraka .....	44
3.2.8.4. HPLC-DAD-QQQ-MS/MS bioanalitička metoda .....	44
3.2.8.5. Validacija bioanalitičke metode .....	45
3.2.9. Vezivanje etrasimoda i ritlecitiniba za humani serumski protein .....	47
3.2.10. Procjena zelene analitičke kemije .....	47
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>48</b>
4.1. Razvoj i optimizacija stabilitetno-indikativne metode etrasimoda .....	48
4.2. Validacija stabilitetno-indikativne metode za određivanje etrasimoda .....	49
4.3. Studija prisilne razgradnje etrasimoda .....	53

4.4. Masena spektrometrija etrasimoda i produkata razgradnje .....	59
4.5. Razvoj i optimizacija stabilitetno-indikativne metode ritlecitiniba.....	64
4.6. Validacija stabilitetno-indikativne metode ritlecitiniba.....	66
4.7. Studija prisilne razgradnje ritlecitiniba .....	70
4.8. Masena spektrometrija ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje .....	76
4.9. Ispitivanje kompatibilnosti etrasimoda i ritlecitiniba s pomoćnim tvarima .....	80
4.9.1. XRD analiza .....	80
4.9.2. FTIR analiza.....	85
4.9.3. DTA–TGA analiza .....	90
4.9.4. SEM analiza .....	94
4.9.5. EDS analiza.....	96
4.9.6. Izotermalno ispitivanje razgradnje .....	98
4.10. Razvoj i optimizacija bioanalitičke metode za etrasimod .....	98
4.10.1. Optimizacija predobrade uzoraka plazme.....	98
4.10.2. Optimizacija uvjeta masene spektrometrije za etrasimod .....	99
4.11. Prikladnost sustava za bioanalitičku metodu za određivanje etrasimoda .....	101
4.12. Validacija bioanalitičke metode za određivanje etrasimoda u ljudskoj plazmi .....	102
4.13. Razvoj i optimizacija bioanalitičke metode za ritlecitinib .....	106
4.13.1. Optimizacija predobrade uzoraka plazme.....	106
4.13.1.1. Taloženje proteina .....	107
4.13.1.2. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) .....	108
4.13.1.3. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete (In-tip SPME) ....	110
4.13.1.4. Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (dLLME) .....	111
4.13.1.5. Ultrazvukom potpomognuta mikroekstrakcija tekuće-tekuće (UA-LLME) .....	112

4.13.1.6. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s pakiranim sorbensom (MEPS).....	114
4.13.1.7. Ekstrakcija čvrsto-tekuće (SLE) .....	115
4.13.1.8. Disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (dSPME) .....	115
4.13.2. Optimizacija uvjeta masene spektrometrije za ritlecitinib .....	117
4.14. Prikladnost sustava za bioanalitičku metodu za određivanje ritlecitiniba u ljudskoj plazmi .	121
4.15. Validacija bioanalitičke metode za određivanje ritlecitiniba u ljudskoj plazmi .....	122
4.16. Vezivanje etrasimoda i ritlecitiniba na humani serumski protein.....	126
4.17. Usporedna zelena procjena prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba .....	128
4.18. Usporedna zelena procjena novorazvijenih bioanalitičkih metoda za etrasimod i ritlecitinib	133
4.19. Usporedba zelene procjene prisilne razgradnje i bioanalitičkih metoda .....	139
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>140</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>143</b>
<b>7. PRILOZI (radovi).....</b>	<b>152</b>
<b>8. POPIS KRATICA I OZNAKA.....</b>	<b>153</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>156</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Upalna bolest crijeva

Upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*, IBD), u koju spadaju Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (engl. *Ulcerative colitis*, UC), predstavlja dugotrajnu, progresivnu i često recidivirajuću bolest gastrointestinalnog trakta. Riječ je o poligenском poremećaju u kojem interakcije između gena i okolišnih čimbenika igraju ključnu ulogu, iako etiologija ostaje nedovoljno shvaćena (1,2).

Pretpostavlja se da kombinacija genetskih faktora i okolišnih utjecaja dovodi do neravnoteže između upalnih i protuupalnih citokina unutar probavnog sustava, što rezultira ekstremnom upalnom reakcijom na luminalne antigene. Prema epidemiološkim istraživanjima, prevalencija upalne bolesti crijeva neprestano raste u proteklih pola stoljeća, s najvećim brojem slučajeva zabilježenih u Sjevernoj Americi, Ujedinjenom Kraljevstvu i sjevernoj Europi. Iako su se u tim regijama incidencija i prevalencija u novije vrijeme stabilizirale, broj oboljelih raste u zemljama u razvoju. Ovaj epidemiološki pomak vjerojatno je povezan s promjenama u načinu života, prehrambenim navikama i poboljšanom higijenom, što proizlazi iz socioekonomskog razvoja navedenih regija. Procjenjuje se da danas više od 12 000 ljudi u Hrvatskoj te oko 7 milijuna ljudi diljem svijeta boluje od upalne bolesti crijeva koja zahtijeva dugotrajno i složeno liječenje (1–3).

Ulcerozni kolitis karakterizira difuzna i površinska upala sluznice debelog crijeva i rektuma, dok Crohnova bolest izaziva upalu pune debljine crijevnog zida bilo gdje u probavnom traktu. U aktivnoj fazi bolesti najčešći simptomi uključuju proljev, rektalno krvarenje, bolove u trbuhu, gubitak težine, učestalu potrebu za pražnjenjem crijeva, umor, mučninu i povraćanje. Trenutne preporuke za liječenje upalne bolesti crijeva naglašavaju važnost rane terapijske intervencije, ciljanu terapiju i terapijskog praćenja lijekova. Glavni ciljevi liječenja su indukcija i održavanje kliničke remisije, prevencija komplikacija i postizanje zacjeljivanja sluznice. Patološki proces ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti dovodi do oštećenja crijeva koje nastaje kao posljedica pretjerane upalne reakcije (5–9).

Trenutne preporuke za liječenje upalne bolesti crijeva naglašavaju važnost rane terapijske intervencije, strategije „treat-to-target“ i terapijskog praćenja lijekova. Glavni ciljevi liječenja su indukcija i održavanje kliničke remisije, prevencija komplikacija i postizanje zacjeljivanja sluznice (10).

Suvremena farmakoterapija obuhvaća različite skupine lijekova, uključujući kortikosteroide (budesonid, beklometazon dipropionat), aminosalicilate (sulfasalazin, mesalazin, balsalazid), imunomodulatore (azatioprin, 6-merkaptopurin, metotreksat), antibiotike (metronidazol, ciprofloksacin) te inovativne modulatore receptora sfingozin-1-fosfata (engl. *Sphingosine-1-phosphate receptor modulator*, S1P) (ozanimod, etrasimod) i biološka terapija, poput inhibitora faktora tumorske nekroze alfa (engl. *Tumor necrosis factor-alpha*, TNF- $\alpha$ ) (adalimumab, infliksimab i dr.), inhibitora Janus kinaze (engl. *Janus kinase*, JAK) (tofacitinib, upadacitinib i dr.) i antagonista integrina (vedolizimab) (11,12).

Unatoč dostupnosti različitih skupina lijekova, značajan udio bolesnika ne postiže zadovoljavajući terapijski odgovor. Biološka terapija predstavlja standard u liječenju upalne bolesti crijeva i primjenjuje se više od dva desetljeća, no gotovo 30 % bolesnika ne reagira na nju, a do 40 % onih koji u početku reagiraju izgubi terapijski odgovor unutar godine dana. Osim toga, biološki lijekovi mogu izazvati nuspojave različite težine – od blagih alergijskih reakcija do ozbiljnih infekcija i maligniteta. Zbog potrebe za ranijim postizanjem i održavanjem remisije te boljim sigurnosnim profilom, posljednjih godina sve veći interes izazivaju lijekovi iz skupine malih molekula. Riječ je o spojevima male molekulske mase (ispod 500 Da) koji lako prolaze kroz stanične membrane, omogućuju jednostavnu oralnu primjenu, imaju kratki poluživot i brz početak djelovanja. U usporedbi s biološkim lijekovima, njihova je proizvodnja jednostavnija i ekonomičnija te ne zahtijeva bolničko liječenje. Među najznačajnijim predstavnicima ističu se S1P i JAK inhibitori, koji predstavljaju iskorak u optimizaciji učinkovitosti i sigurnosti liječenja te pružaju dodatnu mogućnost u odabiru terapijskih pristupa (14–18).

#### Modulatori receptora sfingozin-1-fosfata (S1P)

Modulatori sfingozin-1-fosfatnih (S1P) receptora predstavljaju novu skupinu lijekova koji djeluju kao funkcionalni antagonisti S1P receptora bitnog za migraciju limfocita iz limfnih čvorova u perifernu krv. S1P je membranski izvedeni signalni lipid uključen u mnoge fiziološke i patofiziološke procese. Unutarstanična sinteza S1P uključuje fosforilaciju sfingozina, a

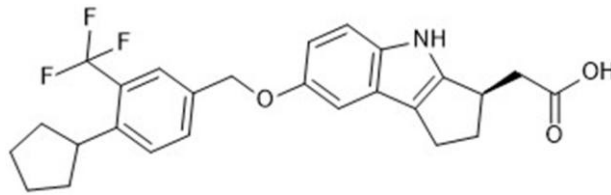
jednom kada nastane, S1P se transportira izvan stanica pomoću ABC transportera, gdje djeluje kao izvanstanični lipidni medijator putem aktivacije pet podtipova receptora S1PR<sub>1-5</sub>. S1P veže pet podtipova receptora (S1PR<sub>1-5</sub>) koji su različito distribuirani i imaju razne uloge (npr. S1PR<sub>1</sub> je dominantan u limfocitima, S1PR<sub>2/3</sub> u vaskularnim stanicama, S1PR<sub>4/5</sub> u imunim i živčanim tkivima) (19).

Modulatori S1PR djeluju tako da induciraju internalizaciju ili funkcionalnu antagonizaciju S1PR<sub>1</sub>, čime se limfociti zadržavaju u limfnim čvorovima i smanjuje njihova infiltracija u upalna žarišta. Iz kliničkih analiza poznato je da ova skupina lijekova može poboljšati kliničke i endoskopske ishode u kroničnim upalnim bolestima pri prihvatljivom sigurnosnom profilu. Za primjer, meta-analiza navodi da S1P modulatori omogućavaju postizanje kliničke remisije u bolesnika s ulceroznim kolitisom u indukcijskoj i održavajućoj fazi terapije bez pojave neželjenih učinaka lijeka (20,21).

Prvi lijek iz ove skupine, fingolimod, odobren je 2010. za liječenje multiple skleroze i predstavljao je značajan iskorak u razumijevanju S1P-signalizacije. Međutim, neselektivni je antagonist S1PR, što ga povezuje s većim rizikom od ozbiljnih nuspojava poput bradikardije i vaskularnih komplikacija. Druga generacija S1P modulatora razvijena je s ciljem povećanja selektivnosti i smanjenja toksičnosti. U 2021. godini Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and drug administration*, FDA) odobrila je ozanimod, agonist S1PR<sub>1</sub> i S1PR<sub>5</sub> receptora, za liječenje umjereno do teško aktivnog ulceroznog kolitisa (20–23).

### 1.2.1. Etrasimod

Etrasimod, (2-[(3R)-7-[[4-ciklopentil-3-(trifluormetil)fenil]metoksi]-1,2,3,4-tetrahidrociklopenta[b]indol-3-il]octena kiselina, je selektivni modulator sfingozin-1-fosfatnih receptora (S1PR) s visokim afinitetom prema podtipovima S1PR<sub>1</sub>, S1PR<sub>4</sub> i S1PR<sub>5</sub> (**slika 1**). Molekulska formula etrasimoda je C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>, a relativna molekulska masa iznosi 457,49 g/mol. Strukturno, etrasimod sadrži karboksilnu skupinu i aromatske sustave koji mogu utjecati na njegovu kemijsku stabilnost i potencijalne putove razgradnje u uvjetima stresa. Etrasimod, Velsipity® kojeg proizvodi Pfizer, odobren je od strane FDA 18. listopada 2023. godine za liječenje umjereno do teško aktivnog ulceroznog kolitisa u odraslih i adolescenata od 16 godina nadalje koji nisu adekvatno odgovorili na standardnu terapiju. Također, 16. veljače 2024. godine dobio je odobrenje za stavljanje u promet od strane Europske agencije za lijekove (engl. *European medicinal agency*, EMA) (24).



**Slika 1.** Kemijska struktura etrasimoda sfingozin-1-fosfata (S1P) modulatora receptora

Mehanizam djelovanja temelji se na reverzibilnom funkcionalnom antagonizmu S1PR<sub>1</sub> receptora, što dovodi do internalizacije receptora i zadržavanja aktiviranih limfocita unutar limfnih čvorova. Posljedično dolazi do smanjenja broja cirkulirajućih limfocita i modulacije imunološkog odgovora. Ova selektivnost je klinički važna jer omogućuje imunosupresiju usmjerenu na limfocitnu migraciju bez značajne interferencije sa S1PR<sub>2</sub> i S1PR<sub>3</sub> receptorima, koji su povezani s vaskularnim i srčanim nuspojavama. Time se etrasimod razlikuje od ranijih neselektivnih S1P modulatora poput fingolimoda, te pokazuje bolju podnošljivost i predvidljiv farmakodinamički profil (25–28).

Etrasimod se primjenjuje u dozi od 2 mg oralno jednom dnevno, s poluvremenom eliminacije 30–32 sata, što omogućuje koncentraciju lijeka u uvjetima dinamičke ravnoteže. Metabolizira se primarno putem jetrenih enzima CYP2C8, CYP2C9 i CYP3A4, uz manji doprinos drugih CYP enzima, a eliminira se uglavnom fecesom. Prije početka liječenja preporučuje se procjena krvne slike (uključujući limfocite), jetrene funkcije i srčanog ritma zbog mogućnosti prolaznog smanjenja broja limfocita te rijetkih poremećaja srčane frekvencije, osobito na početku terapije (28).

Najčešće nuspojave uključuju smanjenje broja limfocita, glavobolju i infekcije gornjih dišnih putova. Smanjenje limfocita predstavlja očekivani farmakodinamički učinak lijeka zbog redistribucije limfocita u limfoidna tkiva i obično je blagog do umjerenog stupnja. Rjeđe nuspojave uključuju poremećaje vida (npr. makularni edem), blage promjene plućne funkcije te prolazne kardiovaskularne učinke, osobito na početku liječenja. Zbog toga se preporučuje kliničko praćenje bolesnika tijekom terapije. U europskoj regulatornoj procjeni omjer koristi i rizika ocijenjen je povoljnim, s obzirom na klinički značajno poboljšanje simptoma i održavanje remisije uz prihvatljiv i predvidljiv sigurnosni profil (29–32).

Proveden je niz kliničkih ispitivanja etrasimoda na zdravim dobrovoljcima i bolesnicima, od kojih su ključne randomizirane faze 3 studije NCT03996369; ELEVATE UC 12 i

NCT03945188; ELEVATE UC 52. U publikaciji *Yarur A. J. i suradnika (29)* prikazani su rezultati ovih studija koje su uključile bolesnike s umjereno do teško aktivnim ulceroznim kolitisom. U studiji ELEVATE UC 12 nakon 12 tjedana liječenja klinička remisija postignuta je u približno 26 % bolesnika koji su primali etrasimod u usporedbi s oko 11 % bolesnika koji su primali placebo, pri čemu su endoskopski i histološki pokazatelji bili statistički značajno poboljšani. U studiji ELEVATE UC 52 klinička remisija u 52. tjednu postignuta je u oko 32 % bolesnika koji su primali etrasimod u usporedbi s oko 7 % bolesnika koji su primali placebo, što potvrđuje održavanje terapijskog učinka tijekom jednogodišnjeg liječenja. Analize podskupina pokazale su konzistentnu učinkovitost u različitim kliničkim prezentacijama bolesti. Također je zabilježeno rano poboljšanje simptoma tijekom rane faze liječenja. Najčešće nuspojave bile su u skladu s poznatim sigurnosnim profilom lijeka, što uključuje limfopeniju i infekcije gornjih dišnih putova.

Pregledni rad *Martínez-Molina C. i suradnika (26)* proširuje spoznaje o etrasimodu ističući njegov potencijal za primjenu i u drugim autoimunim bolestima. Autori navode da selektivnost prema S1PR<sub>1/4/5</sub> omogućuje ciljanu imunoregulaciju uz minimalni utjecaj na kardiovaskularni sustav, što bi moglo biti relevantno i u indikacijama poput Crohnove bolesti, atopijskog dermatitisa i multiple skleroze. Osim toga, u pregledu se naglašava potreba za podacima o dugoročnoj sigurnosti i učinkovitosti, osobito kod pacijenata koji su prethodno primali biološke lijekove ili JAK inhibitore. Autori sugeriraju da bi etrasimod mogao predstavljati most između oralnih imunomodulatora i bioloških terapija, nudeći povoljnu ravnotežu između učinkovitosti i sigurnosti.

## 1.2. Inhibitori Janus kinaze (JAK)

Janus kinaze (JAK) su obitelj relativno velikih (120-130 kDa) nerekceptorskih proteintirozin kinaza koju čine JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2 (tirozin kinaza-2). Prenose signale nizvodno od citokinskih receptora tipa I i tipa II putem signalnih transduktora i aktivatora transkripcije (engl. *Signal transducer and activator of transcription*, STAT). JAK-STAT signalni put, kao evolucijski očuvan mehanizam, ima ključnu ulogu u urođenom i adaptivnom imunitetu, hematopoezi te bolestima koje se često javljaju u kontekstu karcinoma, autoimunih i upalnih poremećaja (33,34).

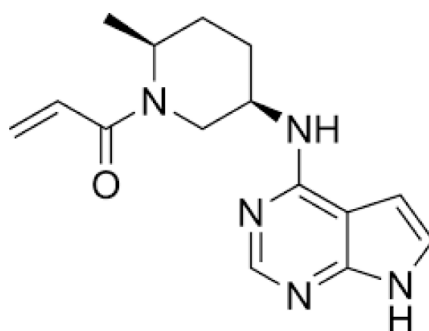
Inhibicija JAK-povezanih signalnih puteva predstavlja jedno od najvećih dostignuća u suvremenoj ciljanoj terapiji upalnih i imunološki posredovanih bolesti. Sprječavanjem

fosforilacije JAK enzima i posljedične aktivacije STAT proteina, JAK inhibitori smanjuju prekomjernu aktivnost citokina odgovornih za kroničnu upalu. Primjena JAK inhibitora ušla je u kliničku praksu za liječenje upalnih, autoimunih i mijeloproliferativnih bolesti. Od 2012. do danas, odobreno je 13 JAK inhibitora dostupnih u različitim oralnim i topikalnim oblicima, što je značajno unaprijedilo liječenje reumatoidnog artritisa, psorijatičnog artritisa, atopijskog dermatitisa i ulceroznog kolitisa. Obično se primjenjuju jednom ili dvaput dnevno u oralnim (tableta, kapsula i otopina) i topikalnim (krema, losion) oblicima lijeka, odobreno od strane nadležnih regulatornih tijela. Unatoč njihovoj rastućoj popularnosti, pojavile su se značajne rasprave o njihovom sigurnosnom profilu. JAK inhibitori prve generacije djeluju inhibicijom više Janus kinaza (JAK1, JAK2 i JAK3) istovremeno. Nuspojave JAK inhibitora prve generacije djelomično se mogu pripisati njihovoj neselektivnosti, što je potaknulo nedavna istraživanja na razvoj selektivnih JAK inhibitora druge generacije s ciljem povećanja učinkovitosti terapije i smanjenja pojava nuspojava (35–37). FDA je odobrila do sada neselektivni inhibitor tofacitinib te selektivne inhibitore JAK1 upadacitinib i filgotinib za liječenje umjerenog do teškog ulceroznog kolitisa (38–40).

### 1.3.1. Ritlecitinib

U drugu generaciju JAK inhibitora ubraja se ritlecitinib, ((1-[(2S,5R)-2-metil-5-(7H-pirol[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)piperidin-1-il]prop-2-en-1-on) (slika 2). Molekulska formula ritlecitiniba je  $C_{15}H_{19}N_5O$  te relativna molekulska masa 285,35 g/mol. Ritlecitinib se koristi za liječenje teške alopecije areate u odraslih i adolescenata u dobi od 12 godina i starijih budući da mu se mehanizam djelovanja temelji na selektivnoj inhibiciji enzima JAK3 i TYK2 koji su uključeni u upalu folikula dlake. Selektivnost ritlecitiniba omogućuje smanjenje rizika sistemskih nuspojava koje se javljaju kod neselektivnih JAK inhibitora (40,41).

U usporedbi s JAK inhibitorima prve generacije (npr. tofacitinib, baricitinib), ritlecitinib pokazuje bolji sigurnosni profil s najčešćim nuspojavama kao što su dijareja, akne, infekcije gornjeg dijela dišnog sustava te urtikarije. U placebo kontroliranim ispitivanjima ove nuspojave javljale su se s učestalošću od 9,2 % za proljev, 6,2 % za akne i infekcije gornjih dišnih putova te 4,6 % za koprivnjaču, uz dodatno zabilježene pojave osipa, folikulitisa i omaglice (42,43).



**Slika 2.** Kemijska struktura ritlecitiniba

Ritlecitinib proizvodi farmaceutska kompanija Pfizer u obliku tvrdih kapsula pod imenom Litfulo®, koje sadrže 50 mg ritlecitiniba u obliku ritlecitinibtosilata. Odobren je od strane FDA 23. lipnja 2023. godine u SAD-u, u Japanu 26. lipnja 2023., a 15. rujna 2023. dobio je odobrenje za stavljanje u promet s valjanošću u cijeloj Europskoj uniji, uključujući Island, Lihtenštajn i Norvešku. Britanska agencija za lijekove i medicinske proizvode (engl. *Medicines & healthcare products regulatory agency*, MHRA) odobrila je Litfulo 1. studenog 2023. te Kanada 13. veljače 2024. godine (33,40,42).

Ritlecitinib se primjenjuje oralno jednom dnevno, u obliku tvrdih kapsula, u dozi od 50 mg. Tijekom liječenja potrebno je periodično procjenjivati omjer koristi i rizika, a u bolesnika bez dokaza terapijskog odgovora preporučuje se razmotriti prekid liječenja nakon 36 tjedana. Lijek se brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta, a maksimalna koncentracija u plazmi postiže se unutar 1–2 sata nakon primjene. Bioraspoloživost mu oko 64 %, a farmakokinetički profil linearan u rasponu doza od 10 do 200 mg. Metabolizam ritlecitiniba odvija se putem više enzimskih sustava, uključujući CYP3A4 i CYP1A2, pri čemu nijedan pojedinačni put ne dominira, a lijek se primarno eliminira metabolizmom. Poluvrijeme eliminacije iznosi približno 3–5 sati, iako su u nekim analizama zabilježene niže vrijednosti (1,3–2,3 sata), što ne utječe na mogućnost jednokratnog dnevnog doziranja. Ritlecitinib se u niskom postotku (oko 14 %) veže na proteine plazme te pokazuje stabilan farmakodinamički učinak s reverzibilnom inhibicijom JAK3/TEC signalizacije, a razine citokina i staničnih markera vraćaju se na bazalne vrijednosti unutar nekoliko dana nakon prestanka terapije. Ritlecitinib pokazuje relativno nizak potencijal za klinički značajne interakcije u usporedbi s neselektivnim JAK inhibitorima, no djeluje kao umjereni inhibitor enzima CYP3A i CYP1A2, zbog čega je potreban oprez pri istodobnoj primjeni s lijekovima čija koncentracija može biti promijenjena, uključujući ciklosporin, takrolimus, kolhicin i teofilin (33,42–45).

U pivotalnom randomiziranom, placebo kontroliranom ispitivanju faze 2b/3 (NCT03732807; ALLEGRO-2b/3), primarni ishod bio je udio bolesnika koji su postigli vrijednost standardiziranog kliničkog indeksa za alopeciju areatu (engl. *Severity of alopecia tool*, SALT) manji ili jednak od 10 nakon 24 tjedna liječenja, što predstavlja klinički značajan ponovni rast kose kod pacijenata s alopecijom totalis i universalis. Integrirana analiza s više od 1 200 ispitanika i više od 2 000 pacijenta potvrdila je nisku incidenciju ozbiljnih nuspojava i dobru dugoročnu podnošljivost. Najčešće nuspojave bile su blage do umjerene (glavobolja, nazofaringitis i akne), dok su ozbiljni neželjeni događaji, poput tromboze ili maligniteta, bili rijetki (42,44).

Osim primarne indikacije, ritlecitinib se aktivno istražuje i u drugim autoimunim bolestima. U studiji faze 2b (NCT02958865; VIBRATO) koja je obuhvatila pacijente u dobi od 18 do 75 godina s dijagnozom ulceroznog kolitisa dužom od 3 mjeseca, ritlecitinib je u dozi od 100 mg pokazao značajno poboljšanje kliničkih i endoskopskih parametara u odnosu na placebo nakon osam tjedana liječenja. Istraživanje je potvrdilo održivost odgovora tijekom 52 tjedna terapije, sugerirajući potencijalnu ulogu ritlecitiniba kao selektivnog oralnog imunomodulatora u terapiji upalne bolesti crijeva (42,45–47).

U randomiziranom, placebo kontroliranom ispitivanju faze 2a (NCT03395184; PIZZICATO), ritlecitinib je u bolesnika s umjereno do teškom Crohnovom bolešću pokazao statistički značajno poboljšanje endoskopskih parametara u odnosu na placebo, pri čemu je veći udio bolesnika postigao smanjenje endoskopskog indeksa aktivnosti Crohnove bolesti za više od 50 % nakon 12 tjedana liječenja. Terapija je bila dobro podnošljiva, uz većinom blage do umjerene nuspojave, što upućuje na potencijalnu primjenu ritlecitiniba kao nove terapijske opcije u bolesnika s prethodnim neuspjehom standardnog liječenja. Potrebna su daljnja istraživanja dugoročne remisije i usporedbe s postojećim terapijama poput tofacitiniba, upadacitiniba i filgotiniba. S obzirom na selektivnost prema JAK3 i TEC-kinazama, ritlecitinib bi mogao predstavljati sljedeći korak u razvoju ciljane JAK terapije u usporedbi s neselektivnim inhibitorima. Njegova potencijalna primjena u liječenju upalnih bolesti crijeva može proširiti terapijske mogućnosti u gastroenterologiji, osobito u bolesnika s nedostatnim odgovorom na biološku terapiju (48–52).

### 1.3. Predformulacijske studije

Razvoj novog lijeka obuhvaća niz složenih procesa koji uključuju ispitivanje farmakoloških i toksikoloških svojstava djelatne tvari, dizajn formulacije i farmaceutskog oblika te provođenje kliničkih ispitivanja. U tom kontekstu, predformulacijske studije predstavljaju ključni inicijalni korak razvoja, a obuhvaćaju skup istraživanja i analiza koje se provode prije odabira konačne formulacije lijeka. Njihov osnovni cilj je razumijevanje fizikalno-kemijskih, bioloških i analitičkih svojstava djelatne tvari (engl. *Active pharmaceutical ingredient*, API) i odabranih pomoćnih tvari, kako bi se osigurala stabilnost, učinkovitost i sigurnost lijeka tijekom proizvodnje, skladištenja i primjene. Predformulacijske studije omogućuju identifikaciju potencijalnih izazova u ranim fazama razvoja, poput niske topljivosti, kemijske nestabilnosti ili nekompatibilnosti s pomoćnim tvarima. Uobičajeno obuhvaćaju određivanje molekulske mase, pKa, log*P* vrijednosti, polimorfizma, tališta, higroskopnosti, topljivosti, kao i ispitivanje stabilnosti tvari pri različitim uvjetima temperature, vlage i pH vrijednosti. Rezultati ovih ispitivanja čine osnovu za odabir farmaceutskog oblika, pomoćnih tvari i tehnološkog procesa, čime se smanjuju rizici i troškovi kasnijih razvojnih faza (53,54).

#### 1.4.1. Studije prisilne razgradnje

Studije prisilne razgradnje (engl. *Forced degradation studies*) predstavljaju važan dio predformulacijskih ispitivanja. Provođe se prema smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju (engl. *International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use*, ICH) te omogućuju uvid u stabilnost djelatne tvari pri različitim uvjetima stresa uključujući oksidaciju, kiselu i bazičnu hidrolizu, termičku i fotolitičku razgradnju. Primjenom ovih studija moguće je identificirati potencijalne putove razgradnje. Takve informacije omogućuju planiranje formulacijskih strategija i odabir odgovarajućih pomoćnih tvari koje mogu poboljšati stabilnost pripravka. Također, rezultati ovih ispitivanja pomažu u optimizaciji procesa proizvodnje, osobito u pogledu kontrole temperature, pH vrijednosti i izloženosti svjetlosti tijekom tehnoloških postupaka. Dobiveni podaci služe i kao osnova za razvoj stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda.

Osim procjene stabilnosti djelatne tvari, studije prisilne razgradnje omogućuju i razumijevanje kinetike procesa razgradnje u različitim uvjetima okoline. Analiza brzine razgradnje pruža informacije o kemijskoj i fizikalnoj stabilnosti molekule. Rezultati ovih ispitivanja mogu pomoći u predviđanju ponašanja djelatne tvari tijekom dugotrajnog skladištenja ili transporta.

Također, ovakva ispitivanja korisna su u usporedbi stabilnosti različitih polimorfnih oblika ili soli iste djelatne tvari.

Studije prisilne razgradnje imaju važnu ulogu u predviđanju kompatibilnosti djelatne tvari s pomoćnim tvarima. U suvremenoj analitici, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda i tandem masenom spektrometrijom (engl. *High-performance liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry*, HPLC-DAD-MS/MS) predstavlja zlatni standard za provedbu ovih ispitivanja, zbog svoje visoke selektivnosti i osjetljivosti (55–57).

Preporučuju se sljedeći uvjeti provedbe studije prisilne razgradnje:

#### *Kisela hidroliza*

- Otopina HCl 0,01–1 M
- Temperatura: sobna temperatura ili 40–60 °C

#### *Bazična hidroliza*

- Otopine NaOH ili KOH 0,01–1 M
- Temperatura: sobna temperatura ili 40–60 °C

#### *Oksidacijska razgradnja*

- Vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u koncentracijama 0,1–33 %
- Temperatura: sobna temperatura ili povišena temperatura

#### *Termička razgradnja*

- Izlaganje povišenim temperaturama 40, 60 ili 80 °C
- Može se provoditi u krutom stanju ili u otopini

#### *Fotolitička razgradnja*

- Izlaganje UV i vidljivoj svjetlosti prema ICH Q1B smjernici (58) (kontrolirana količina svjetlosne energije)

Smjernica ICH Q1A(R2) (59) određuje opće zahtjeve za ispitivanje stabilnosti djelatnih tvari i pripravaka, uključujući primjenu stresnih uvjeta (oksidacija, kisela i bazična hidroliza, svjetlost te povišena temperatura). Koncentracija djelatne tvari u studijama prisilne razgradnje nije strogo propisana, ali se preporučuje odabrati tako da omogućuje pouzdanu detekciju produkata razgradnje i istodobno bude prikladna za analitičku metodu koja se koristi. U većini studija koncentracija djelatne tvari u otopini najčešće se kreće u rasponu 0,1–1 mg/mL. Trajanje izlaganja pojedinom uvjetu stresa ovisi o kemijskoj stabilnosti ispitivane tvari. Ispitivanje se zaustavlja kada se postigne djelomična razgradnja djelatne tvari, najčešće u rasponu od približno 5 do 20 %, što omogućuje detekciju i karakterizaciju glavnih produkata razgradnje uz istodobno izbjegavanje pretjerane razgradnje i nastajanja sekundarnih produkata. Ovakav pristup omogućuje dobivanje relevantnih informacija o putevima razgradnje te istodobno osigurava prikladne uvjete za razvoj stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda (57–59).

#### 1.4.2. Razvoj i validacija stabilitetno-indikativne metode

Razvoj stabilitetno-indikativnih analitičkih metoda ključan je dio predformulacijskih studija jer osigurava mogućnost pouzdanog praćenja kvalitete djelatne tvari i gotovog proizvoda tijekom cijelog životnog ciklusa lijeka. Validacija analitičkih metoda koje se koriste u ovim studijama odvija se u skladu s smjernicama ICH Q2(R2) (60) koja definira kriterije za procjenu selektivnosti, linearnosti, točnosti, preciznosti, granice dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) i granice određivanja (engl. *Limit of quantification*, LOQ) te robusnosti.

Linearnost analitičke metode definira se kao njezina sposobnost da unutar jasno specificiranog koncentracijskog raspona daje odaziv detektora koji je izravno proporcionalni koncentraciji analita u ispitivanom uzorku. Procjenjuje se analizom više koncentracijskih razina analita (najmanje pet), pri čemu se konstruira kalibracijska krivulja i određuje koeficijent korelacije ( $r$ ) kao mjera proporcionalnosti između signala i koncentracije.

Točnost metode definira se kao stupanj slaganja između izmjerene i stvarne vrijednosti analita. Određuje se analizom najmanje devet ponovljenih mjerenja raspoređenih na tri različite koncentracijske razine unutar definiranog radnog područja. Izražava se kao analitički prinos (engl. *Recovery*, %) pri različitim koncentracijskim razinama.

Preciznost metode opisuje stupanj međusobnog slaganja rezultata dobivenih ponovljenim mjerenjima istog homogenog uzorka. Razlikuju se ponovljivost, koja se određuje pri istim eksperimentalnim uvjetima u kratkom vremenskom razdoblju, te međupreciznost, koja

uključuje varijacije poput različitih dana, analitičara ili instrumenata. Ponovljivost se najčešće procjenjuje analizom šest uzoraka na 100 % ciljane koncentracije analita, ili devet uzoraka raspoređenih na tri koncentracijske razine unutar radnog područja. Izražava se kao relativno standardno odstupanje (engl. *Relative standard deviation*, RSD).

LOD predstavlja najnižu količinu analita koja se može pouzdano detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. Može se odrediti na temelju omjera signal/šum, pri čemu se kao kriterij prihvatljivosti uzima vrijednost  $S/N \geq 3$ , ili primjenom statističkog pristupa koji uključuje standardnu devijaciju odziva i nagib kalibracijske krivulje. LOQ definira najnižu koncentraciju analita koja se može kvantitativno odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću. Također se može odrediti metodom signal/šum ( $S/N \geq 10$ ) ili statistički.

Selektivnost metode odnosi se na sposobnost pouzdanog određivanja analita u prisutnosti drugih sastavnica, Procjenjuje se analizom slijepog uzorka, matrice bez analita te uzorka koji sadrži analit, pri čemu se ispituje prisutnost mogućih interferencija. Kod kromatografskih metoda selektivnost se potvrđuje odgovarajućim razdvajanjem pikova, tj. razlučivanjem (engl. *Resolution factor*,  $R_s$ ). Dodatno, čistoća pika procijenjena primjenom DAD detektora je pokazatelj odsutnosti koeluirajućih spojeva, iako ovaj parametar nije definiran u smjernicama ICH Q2 (R2) (60) za procjenu selektivnosti analitičke metode.

Robusnost analitičke metode označava sposobnost metode da ostane pouzdana, točna i precizna unatoč malim, ali namjernim varijacijama u eksperimentalnim uvjetima (promjena pH i sastava mobilne faze, brzine protoka, temperature kolone i tipa kromatografske kolone). Ovaj parametar predstavlja važni aspekt validacije jer odražava stabilnost i praktičnu primjenjivost metode u različitim laboratorijskim uvjetima, osobito tijekom rutinske uporabe. Na temelju ovih parametara procjenjuje se prikladnost analitičke metode, a dobiveni rezultati uspoređuju se s unaprijed definiranim kriterijima prihvatljivosti. Selektivnost je temeljni parametar u kontekstu stabilitetno-indikativnih metoda jer metoda mora osigurati jasnu separaciju djelatne tvari od svih novonastalih produkata razgradnje (61,62).

U **tablici 1** prikazani su parametri validacije sa zadanim kriterijima prihvatljivosti za razvoj stabilitetno-indikativnih metoda za etrasimod i ritlecitinib.

**Tablica 1.** Validacija analitičke metode

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti
Linearnost	$r > 0,999$
Točnost	Analitički prinos (98–102 %)
Granica dokazivanja (LOD)	Brojčana vrijednost
Granica određivanja (LOQ)	Brojčana vrijednost
Preciznost	$RSD < 2 \%$
Selektivnost	$R_s \geq 1,5$ , čistoća pika $> 999$

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative standard deviation, RSD*)

$R_s$  – faktor rezolucije (engl. *Resolution factor,  $R_s$* )

#### 1.4.3. Ispitivanje kompatibilnosti djelatne i pomoćne tvari

Kompatibilnost između djelatne i pomoćnih tvari od presudne je važnosti za osiguranje stabilnosti i učinkovitosti lijeka. Tijekom razvoja lijeka provodi se niz fizikalno-kemijskih ispitivanja kako bi se uočile moguće interakcije koje bi mogle uzrokovati razgradnju djelatne tvari. Kompatibilnost se može odrediti: primjenom računalnih predviđanja i eksperimentalnim putem. Od računalnih programa koristi se PharmDE platforma - za *in silico* ispitivanje kompatibilnosti djelatne i 130 pomoćnih tvari.

Najčešće korištene eksperimentalne tehnike, prikazane u **tablici 2**, uključuju diferencijalnu pretražnu kalorimetriju (engl. *Differential scanning calorimetry, DSC*) i termogravimetrijsku analizu (engl. *Thermogravimetric analysis, TGA*), koje omogućuju uvid u termalne promjene i interakcije među djelatnom i pomoćnom tvari. Ove metode često se kombiniraju sa spektroskopskim tehnikama poput rendgenske difrakcije (engl. *X-ray diffraction, XRD*), infracrvene spektroskopije s Furierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infra-Red, FTIR*) te infracrvene spektroskopije (engl. *Infrared spectroscopy, IR*) koje omogućuju identifikaciju funkcionalnih skupina uključenih u interakcije. Dodatno, skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning electron microscope, SEM*) koristi se za procjenu morfoloških promjena uzrokovanih inkompatibilnošću. Izotermalno ispitivanje razgradnje (engl. *Isothermal stress testing, IST*) često se primjenjuje pri procjeni kompatibilnosti djelatne tvari s pomoćnim tvarima. Postupak se temelji na kontroliranom izlaganju uzoraka povišenim, ali stabilnim

temperaturama, najčešće u rasponu od 40 do 50 °C, kako bi se ubrzao potencijalni proces razgradnje. Nakon određenog vremena skladištenja provodi se analiza odgovarajućim analitičkim metodama.

Za karakterizaciju najčešće se koriste kromatografske tehnike, prvenstveno HPLC te različite spektroskopske metode, uključujući FTIR spektroskopiju. Takve tehnike omogućuju praćenje kemijskih interakcija te identifikaciju i kvantifikaciju produkata razgradnje. Rezultati predformulacijskih studija služe kao osnova za izbor optimalnog oblika lijeka, pomoćnih tvari i procesa proizvodnje. Time se omogućuje racionalan dizajn formulacije, smanjenje troškova i rizika u kasnijim fazama razvoja te povećava učinkovitost prijelaza iz laboratorijske u industrijsku fazu. U novije vrijeme u ovu fazu razvoja sve se više integriraju računalni modeli i umjetna inteligencija, koji ubrzavaju proces dizajna formulacija i povećavaju predvidljivost stabilnosti te interakcija u složenim sustavima (63–67).

**Tablica 2.** Tehnike eksperimentalnog ispitivanja kompatibilnost djelatne i pomoćne tvari

Tehnika	Vrsta	Rezultat
Izotermalna studija razgradnje (IST)	Termalna tehnika praćena kromatografskom analizom	Kromatogram (pojava pika, gubitak sadržaja)
Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)	Termalna tehnika	Termogram (pomaci pikova, promjena entalpija)
Termogravimetrijska analiza (TGA)	Termalna tehnika	Termogram (pomaci pikova, promjena entalpija)
Fourier-transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR)	Spektroskopska tehnika	Infracrveni spektar (nastanak/gubitak vrpci)
Rengenska difrakcija na praškastom uzorku (XRPD)	Spektroskopska tehnika	Difraktogram (pojava pikova)
Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)	Mikroskopska tehnika	Slika površinske morfologije

#### 1.4. Bioanalitika

Bioanalitika je interdisciplinarno područje koje obuhvaća razvoj, optimizaciju i primjenu analitičkih metoda za dokazivanje i određivanje lijekova, njihovih metabolita, toksina, biomarkera i endogenih molekula u biološkim matricama kao što su plazma, serum, krv, tkiva, urin ili cerebrospinalna tekućina. Njezina uloga ključna je u svim fazama razvoja lijeka od rane preklinike, farmakokinetičkih i farmakodinamskih studija, preko kliničkih faza, do terapijskog praćenja (engl. *Therapeutic drug monitoring*, TDM) i farmakovigilancije. Osnovna obilježja bioanalitike uključuju: analizu složenih matrica, zahtjev za visokom selektivnošću i osjetljivošću, pouzdan kvantitativni odgovor te mogućnost detekcije vrlo niskih koncentracija (ng/mL ili pg/mL). Zbog toga je zlatni standard u bioanalitici tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom (engl. *Liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS). Ova tehnika omogućuje visoku selektivnost i točnost (68,69).

Uz LC-MS tehnike, u bioanalitičkim istraživanjima koriste se i druge instrumentalne metode poput tekućinske kromatografije s UV ili fluorescentnom detekcijom, plinska kromatografije s masenom spektrometrijom te imunokemijskih metoda, ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima analita i zahtjevima analize. Međutim, razvoj suvremenih bioanalitičkih metoda danas je u velikoj mjeri usmjeren na primjenu HPLC-MS/MS tehnike, koja omogućuje istodobnu visoku selektivnost i osjetljivost. Ova tehnika posebno je pogodna za određivanje lijekova i njihovih metabolita u složenim biološkim matricama, gdje su koncentracije analita često vrlo niske, a prisutna je velika količina interferirajućih endogenih spojeva. Jedan od ključnih izazova u bioanalitici predstavlja priprema uzorka, koja uključuje izolaciju analita iz biološke matrice uz minimalan gubitak i smanjenje interferencija iz matrice. U tu svrhu najčešće se primjenjuju postupci poput taloženja proteina (engl. *Protein precipitation*, PPT), ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction*, LLE) i ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid phase extraction*, SPE). Odabir odgovarajuće metode pripreme uzorka značajno utječe na osjetljivost, ponovljivost i robusnost razvijene bioanalitičke metode (69,70).

Osim razvoja metode, iznimno važan korak u bioanalitici je i validacija metode, koja osigurava pouzdane i ponovljive rezultate analize. Validacija obuhvaća procjenu parametara kao što su selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, integritet razrjeđenja (engl. *Dilution integrity*), stabilnost analita, prijenos (engl. *Carry-over*) i utjecaj matrice (engl. *Matrix effect*). Smjernice za validaciju bioanalitičkih metoda definirane su od strane regulatornih tijela poput ICH (71), FDA (72) i EMA (73) te predstavljaju standard u razvoju i primjeni bioanalitičkih metoda u

farmaceutskoj industriji i istraživanjima, ali i u u kliničkim laboratorijima, gdje imaju važnu ulogu u terapijskom praćenju lijekova. Bioanalitičke metode imaju važnu ulogu u određivanju farmakokinetičkih parametara lijekova, uključujući apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju. Dobiveni podaci omogućuju bolje razumijevanje ponašanja lijeka u organizmu, optimizaciju doziranja te procjenu sigurnosti i učinkovitosti terapije. Uz to, bioanalitika je važna i u identifikaciji metabolita te proučavanju biotransformacijskih puteva lijekova. S razvojem novih terapijskih pristupa i sve složenijih molekula, uključujući male molekule, biološke lijekove i ciljane terapije, raste i potreba za naprednim bioanalitičkim metodama koje omogućuju visoku razinu osjetljivosti, selektivnosti i pouzdanosti, kako u prekliničkim i kliničkim ispitivanjima, tako i u kliničkoj rutinskoj praksi. Zbog toga bioanalitika danas predstavlja jedno od ključnih područja u suvremenom razvoju lijekova, translacijskoj medicini i individualizaciji terapije (70,74,75).

#### 1.5.1. Priprema uzoraka u bioanalitici

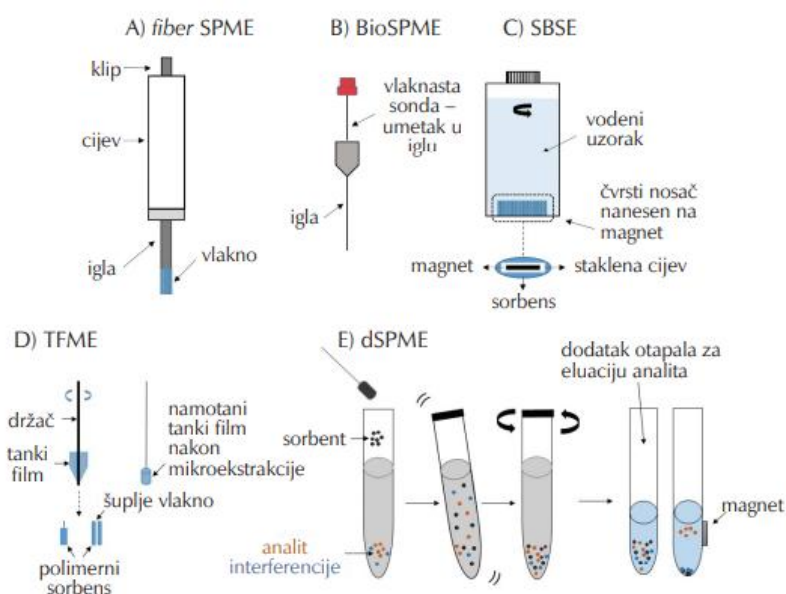
Glavni izazov bioanalitičkih mjerenja je priprema uzorka jer biološke matrice sadrže proteine, fosfolipide, soli, organske kiseline i druge interferirajuće sastavnice koje mogu uzrokovati supresiju ionizacije, kontaminaciju instrumenta i nepouzdanu rezultate analiza. Stoga se priprema uzoraka smatra središnjim dijelom bioanalitičkog procesa. Osim uklanjanja interferirajućih tvari, cilj pripreme uzorka je i koncentriranje analita, poboljšanje selektivnosti metode te osiguravanje ponovljivosti i točnosti kvantifikacije. U bioanalitičkim istraživanjima, osobito onima koja uključuju analizu lijekova i njihovih metabolita u plazmi, serumu ili urinu, priprema uzorka izravno utječe na osjetljivost i pouzdanost dobivenih rezultata (75).

Tradicionalne tehnike: taloženje proteina, ekstrakcija čvrstom fazom, ekstrakcija tekuće-tekuće i dalje su prisutne u laboratorijskoj praksi, no u posljednjem desetljeću dominira evolucija mikroekstrakcijskih tehnika. Klasične metode karakterizira relativno jednostavna primjena i dobra učinkovitost uklanjanja interferirajućih sastavnica matrice, no pojedine tehnike imaju ograničenja. Talozenje proteina ima nisku selektivnost i uklanja uglavnom samo proteine, dok ekstrakcija čvrstom fazom može biti složenija za izvođenje te često zahtijeva veće volumene uzorka i organskih otapala uz više koraka obrade. S druge strane, razvoj suvremenih bioanalitičkih metoda, osobito onih povezanih s HPLC-MS/MS analizom, potaknuo je potrebu za bržim, selektivnijim i ekološki prihvatljivijim pristupima pripreme uzoraka (76,77).

Mikroekstrakcija čvrstom fazom na temelju mehanizma difuzije dijeli se u dvije skupine: tehnike mikroekstrakcije posredovane miješanjem (engl. *Stirring mediated solid-phase*

*microextraction*) ili protokom (engl. *Flow through mediated solid-phase microextraction*). Ove tehnike temelje se na raspodjeli analita između uzorka i sorbensa male mase, pri čemu se postiže ravnoteža ili kinetički kontrolirana ekstrakcija. Prednost takvog pristupa je mogućnost rada s malim volumenima bioloških uzoraka, što je osobito važno u farmakokinetičkim i kliničkim studijama gdje je količina dostupnog uzorka često ograničena.

Kod mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane miješanjem odnosno statičkih tehnika čvrsti nosač može biti smješten na magnetu (engl. *Stir-bar sorptive microextraction*, SBSE), u obliku vlakna (engl. *Fiber solid-phase microextraction*, fiber SPME), odnosno tankog filma (engl. *Thin film solid-phase microextraction*, TFME) te u obliku praška (engl. *Dispersive solid-phase microextraction*, dSPME) (slika 3). U tim sustavima ekstrakcija se odvija difuzijom analita iz matrice prema sorbentu, a učinkovitost procesa ovisi o površini sorbensa, vremenu ekstrakcije, temperaturi i intenzitetu miješanja. Posebno se ističu tehnike koje koriste tanke filmove i dispergirane sorbense, jer omogućuju povećanje kontakta između uzorka i ekstrakcijskog materijala, što rezultira boljim iskorištenjem ekstrakcije i kraćim vremenom analize (78).

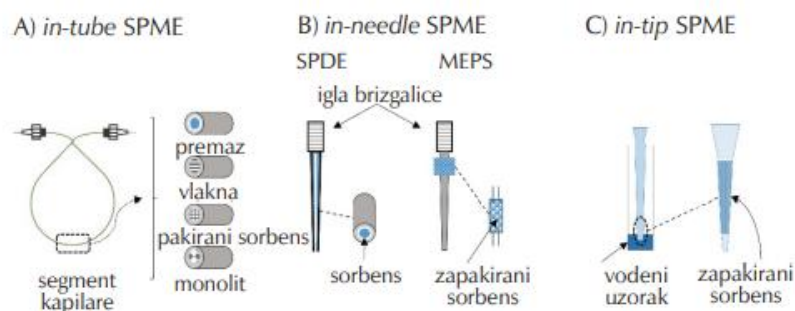


**Slika 3.** Prikaz tehnika mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane miješanjem: fiber SPME (A), BioSPME (B), SBSE (C), TFME (D) i dSPME (E) (78).

Podjela tehnika posredovanih protokom, odnosno dinamičkih tehnika, također se temelji na smještaju čvrstog nosača: u koloni (engl. *In-tube solid-phase microextraction*, IT-SPME), u igli (engl. *In-needle solid-phase microextraction*, in-needle SPME), sorbens smješten u spremniku igle, tj. pakirani sorbensom (engl. *Microextraction by packed sorbent*, MEPS) te u nastavku za

automatske pipete (engl. *In-tip solid-phase microextraction*, in-tip SPME) (**slika 4**). Ove tehnike često su integrirane s automatskim sustavima za uzorkovanje te omogućuju izravno spajanje s kromatografskim sustavima, čime se smanjuje broj koraka pripreme uzorka i mogućnost pogreške (78,79,80).

Zbog njihove mogućnosti miniaturizacije, smanjenja potrošnje otapala, automatizacije i poboljšane ekološke prihvatljivosti, ove tehnike predstavljaju važan napredak u pripremi uzoraka. One omogućuju kombinirano uzorkovanje i ekstrakciju, kao i izravnu primjenu u biološkim matricama te on-line konfiguracije uparene s HPLC-MS/MS sustavima. Osim toga, razvoj novih sorbensa, uključujući polimerne materijale, molekularno utisnute polimere i nanostrukturirane materijale, dodatno je proširio mogućnosti selektivne ekstrakcije ciljnih analita iz složenih bioloških matrica. Time se povećava analitička učinkovitost i smanjuje utjecaj matrice, što je ključno za postizanje visoke osjetljivosti i pouzdanosti bioanalitičkih metoda (81,82).



**Slika 4.** Prikaz tehnika mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane protokom: IT-SPME (A), in-needle SPME (B) i in-tip SPME (C) (78).

#### 1.5.2. Validacija bioanalitičkih metoda

Sve bioanalitičke metode namijenjene kliničkoj primjeni ili ispitivanju lijekova moraju biti validirane prema međunarodnim smjernicama kako bi se osigurala ponovljivost i pouzdanost dobivenih rezultata. Prije same analize neophodno je provesti pripremu uzorka iz biološke matrice te potom validirati metodu kako bi bila prikladna za farmakokinetičke i terapijske studije (69). Validacija bioanalitičke metode provodi se prema međunarodnim regulatornim ICH M10 smjernicama (71) s kriterijima prihvatljivosti navedenim u **tablici 3**. je dokumentirati da je metodom moguće pouzdano, točno i ponovljivo odrediti analit u biološkoj matrici.

Linearnost bioanalitičke metode procjenjuje se unutar koncentracijskog raspona koji obuhvaća donju granicu određivanja (engl. *Lower limit of quantitation*, LLOQ) i gornju granicu određivanja (engl. *Upper limit of quantitation*, ULOQ), na najmanje šest koncentracijskih razina. Rezultati se prikazuju za barem tri neovisne krivulje analizirane tijekom više dana, a odstupanja povratno izračunatih koncentracija trebaju biti unutar  $\pm 15\%$  od nominalne koncentracije, uz iznimku LLOQ gdje je dopušteno odstupanje do  $\pm 20\%$ . Također,  $\geq 75\%$  kalibracijskih standarda mora zadovoljavati navedene kriterije.

Preciznost i točnost procjenjuju se analizom kontrolnih uzoraka (engl. *Quality control*, QC) na četiri koncentracijske razine (LLOQ, niska, srednja i visoka QC razina) u peteroplikatu. Kriterij preciznosti metode smatra se zadovoljenim ako su RSD vrijednosti za svaku ispitivanu koncentraciju  $\leq 15\%$ , osim za LLOQ za koju treba biti do  $20\%$ . Kriterij točnosti smatra se zadovoljenim ako je analitički prinos na svakoj koncentraciji unutar  $15\%$  od nominalne vrijednosti koncentracije QC uzoraka, tj. unutar  $20\%$  za LLOQ.

Selektivnost se ispituje analizom slijepih uzoraka dobivenih od najmanje šest različitih dobrovoljnih davatelja, pri čemu interferencije pri vremenu zadržavanja analita ne smiju prelaziti  $20\%$  signala LLOQ te  $5\%$  signala internog standarda.

Utjecaj matrice procjenjuje se analizom slijepih uzoraka dobivenih od najmanje šest različitih dobrovoljnih davatelja na dvije QC razine, pri čemu su prihvatljivi kriteriji  $\pm 15\%$  za odstupanje od nominalne koncentracije i RSD vrijednosti ponovljenih mjerenja  $\leq 15\%$ .

Prijenos se ispituje analizom slijepog uzorka nakon uzorka visoke koncentracije te ne smije prelaziti  $20\%$  signala LLOQ ili  $5\%$  signala internog standarda.

Stabilnost analita ispituje se u uvjetima kratkoročnog i dugoročnog skladištenja, tijekom ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja te tijekom pohrane uzoraka u autosampleru, na najmanje dvije QC razine, pri čemu je prihvatljivo odstupanje od nominalne koncentracije unutar  $\pm 15\%$  u odnosu na koncentraciju analita u svježe pripremljenim uzorcima.

**Tablica 3.** Validacija bioanalitičke metode

Parametar validacije	Kriterij prihvatljivosti
Linearnost	Povratno izračunate koncentracije unutar $\pm 15$ % nominalne vrijednosti ( $\pm 20$ % za LLOQ); $\geq 75$ % kalibracijskih standarda mora zadovoljavati kriterije
Točnost	Odstupanje $\pm 15$ % od nominalne koncentracije za QC uzorke ( $\pm 20$ % za LLOQ)
Preciznost	RSD ponovljenih mjerenja $\leq 15$ % za QC uzorke ( $\leq 20$ % za LLOQ)
Selektivnost	Usporedba slijepog uzorka i uzorka plazme obogaćenog analitom, interferencije $\leq 20$ % LLOQ i $\leq 5$ % signala internog standarda
Prijenos	20 % signala LLOQ ili $\leq 5$ % signala internog standarda
Stabilnost	Odstupanje unutar $\pm 15$ % u odnosu na svježe pripremljene uzorke
Utjecaj matrice	Odstupanje unutar $\pm 15$ % od nominalne koncentracije i RSD ponovljenih mjerenja $\leq 15$ %

RSD – relativno standardno odstupanje, QC – kontrolni uzorci, LLOQ – donja granica kvantifikacije

### 1.5. Zelena analitička kemija

Koncept zelene analitičke kemije (engl. *Green analytical chemistry*, GAC) razvio se kao odgovor na potrebu smanjenja okolišnog otiska analitičkih metoda, uz istodobno očuvanje njihove učinkovitosti i pouzdanosti. Temeljen je na dvanaest načela koja obuhvaćaju minimalnu potrošnju energije i otapala, smanjenje opasnih kemikalija, miniaturizaciju postupaka, automatizaciju, smanjenje otpada i povećanje sigurnosti analitičkih procesa. Budući da je procjena „zelene“ komponente analitičkih metoda često složena i višedimenzionalna, razvijeno

je više numeričkih i vizualnih metrika koje omogućuju objektivnu i standardiziranu procjenu. Među najčešće korištenim alatima su Analytical Eco-Scale, AMGS, AGREE, AGREEprep, GAPI, ComplexGAPI, ComplexMoGAPI i BAGI, od kojih svaki pruža specifičan uvid u različite elemente ekološke i izvedive održivosti (83).

**Analytical Eco-Scale (AES)** predstavlja jednu od najstarijih i najjednostavnijih kvantitativnih metrika za procjenu ekološke prihvatljivosti analitičkih metoda. Temelji se na dodjeli negativnih bodova svakoj komponenti analitičkog postupka uključujući vrstu i opasnost korištenih reagensa, količinu otapala, energijsku zahtjevnost te količinu nastalog otpada. Negativni bodovi se oduzimaju od polazišnih 100 bodova, što omogućuje dobivanje jasnog numeričkog pokazatelja zelene prihvatljivosti. Prednost ove metrike jest njezina transparentnost, mogućnost brze primjene te jednostavno uspoređivanje metoda. Međutim, AES pristup ima i određena ograničenja: negativni bodovi mogu biti subjektivno dodjeljeni, ne postoji jasna vizualna komponenta prikaza, a procjena ne obuhvaća širi okolišni utjecaj povezan s proizvodnjom i zbrinjavanjem korištenih kemikalija i materijala, kao ni ukupnu energetske potrošnju svih korištenih instrumenata. Ipak, AES predstavlja koristan alat za brzu numeričku procjenu ekološke prihvatljivosti (84–86).

**AMGS (Analytical Method Greenness Score)** je alat za kvantitativnu procjenu održivosti analitičkih metoda, koji koristi sustav ponderiranih kriterija kako bi se izračunala jedinstvena ocjena ekološke prihvatljivosti. Za razliku od AES pristupa, koji temelji procjenu na negativnim bodovima, AMGS koristi algoritamski pristup u kojem se kombiniraju različiti parametri: volumen otapala, opasnost kemikalija, energijska potrošnja, broj koraka metode, vrijeme analize i količina otpada. Svakom se kriteriju dodjeljuje ponder, a konačna ocjena izražava se kao numerička vrijednost (0–100), gdje viši rezultat označava ekološki prihvatljiviju metodu. Prednosti AMGS-a uključuju smanjenu subjektivnost u odnosu na AES te mogućnost integracije više parametara u jedinstveni kvantitativni pokazatelj zelenosti metode. Procjena primarno usmjerena na operativni dio analitičkog postupka, bez uključivanja šireg okolišnog utjecaja (87–89).

**AGREE (Analytical GREENness Metric)** predstavlja sveobuhvatan pristup zelenoj procjeni. Ovaj alat procjenjuje ekološku prihvatljivost metode sukladno načelima zelene kemije dajući joj jedinstvenu ocjenu u rasponu od 0 do 1. Svaki se parametar metode vrednuje zasebno – od miniaturizacije, manjeg broja koraka i smanjene potrošnje otapala, do energetske učinkovitosti, otpada, automatizacije i sigurnosti operatera. AGREE generira kružni dijagram koji daje

intuitivan prikaz prednosti i nedostataka metode. Ovakav pristup omogućuje detaljnu i uravnoteženu procjenu. Također, AGREE ne obuhvaća u potpunosti procese koji prethode samoj analizi, poput proizvodnje i opskrbe kemikalijama i potrošnim materijalima, što može imati značajan utjecaj na ukupnu održivost metode. Posebnu vrijednost za analitičke metode koje uključuju opsežnu pripremu uzorka donosi **AGREEprep**, alat koji nadopunjava podatke dobivene putem AGREE-a, namijenjena procjeni zelenosti upravo ovog kritičnog dijela analitičkog procesa. AGREEprep se temelji na deset načela zelene pripreme uzoraka te uzima u obzir parametre koji se odnose posebice na pripremu uzoraka u što se ubrajaju: volumen otapala, mogućnosti miniaturizacije, sigurnost rada, vrste potrošnih materijala, trajanje postupka i stupanj automatizacije. Budući da je priprema uzorka često najzahtjevniji dio analitičkog procesa, AGREEprep omogućuje detaljniju i ciljanu procjenu ekološke prihvatljivosti pripreme uzoraka u odnosu na druge metrike. Međutim, za potpunu sliku ekološke prihvatljivosti analitičke metode, potrebno ga je koristiti u kombinaciji s drugim alatima (89–92).

**GAPI (Green Analytical Procedure Index)** jedan je od najpoznatijih vizualnih alata za procjenu održivosti analitičkih metoda. Metoda se prikazuje u obliku piktograma podijeljenog u više polja koja obuhvaćaju ključne korake analitičkog procesa, poput uzorkovanja, pripreme uzorka, uporabe reagensa, instrumentacije i generiranja otpada. Svako se polje označava crvenom, žutom ili zelenom bojom, ovisno o ekološkoj prihvatljivosti pojedinog koraka, čime se omogućuje brz i intuitivan uvid u prednosti i nedostatke metode. Nedostatak GAPI pristupa jest njegova pretežno kvalitativna priroda, budući da ne daje jedinstvenu numeričku vrijednost za ukupnu procjenu (93,94).

Daljnijim razvojem ovog pristupa uvedene su proširene verzije koje omogućuju cjelovitiji uvid. **ComplexGAPI** nadograđuje izvorni model uključivanjem dodatnih elemenata, osobito detaljnije razrade pripreme uzorka te povećanjem broja procjenjenih koraka, čime se dobiva sveobuhvatniji prikaz održivosti analitičkog postupka. **MoGAPI** predstavlja proširenu, moderniziranu verziju izvorne GAPI metrike, uvedenu radi preciznijeg vrednovanja analitičke održivosti. Za razliku od klasičnog GAPI-ja, MoGAPI uključuje numeričku procjenu u smislu izračuna indeksa, bolje razlikuje različite razine ekološke prihvatljivosti. Najnovija verzija, **ComplexMoGAPI**, zadržava istu osnovnu strukturu i vizualni prikaz, ali uvodi detaljniju numeričku procjenu pojedinih dijelova, čime se poboljšava objektivnost i usporedivost različitih metoda te sveobuhvatna procjena ekološke prihvatljivosti. ComplexGAPI predstavlja najsloženiju varijantu u smislu razrade piktograma i broja procjenjenih elemenata, dok

ComplexMoGAPI zadržava sličnu strukturu, ali dodatno povećava objektivnost kroz numeričku procjenu (95–97).

**Blue Applicability Grade Index (BAGI)** predstavlja metodu procjene praktičnosti i primjenjivosti analitičkih postupaka, razvijenu u okviru koncepta bijele analitičke kemije, koji objedinjuje ekološku održivost, analitičku učinkovitost i izvedivost. Za razliku od zelenih metrika koje naglasak stavljaju prvenstveno na ekološki aspekt metode, BAGI je usmjeren na procjenu toga koliko je određena analitička metoda jednostavna za izvođenje, dostupna, robusna i primjenjiva u laboratorijima s različitim razinama opremljenosti (97).

BAGI omogućuje sagledavanje metode iz perspektive stvarne laboratorijske izvedivosti te se temelji na procjeni više kriterija koji obuhvaćaju ključne aspekte operativne primjene metode, poput složenosti izvođenja, trajanja postupka, količine uzorka, potrebe za dodatnim koracima pripreme (npr. koncentriranje), vrste i količine reagensa, razine automatizacije te mogućnosti istodobnog određivanja većeg broja analita. Kriteriji se vrednuju numerički, a ukupni BAGI indeks dobiva se njihovom kombinacijom, pri čemu rezultat odražava ukupnu praktičnost i izvedivost metode. Rezultat se prikazuje brojčano i grafički, najčešće u obliku višekutnog dijagrama, čime se jasno uočavaju prednosti i ograničenja metode u pogledu njezine primjenjivosti u laboratorijskoj praksi. Posebna vrijednost BAGI pristupa leži u tome što usmjerava pozornost na operativne zahtjeve metode u realnim uvjetima rada. Važno je naglasiti da BAGI ne obuhvaća ekološki aspekt analitičkog postupka, već je usmjeren isključivo na njegovu praktičnost. Stoga ga je preporučljivo koristiti u kombinaciji s metrikama zelene analitičke kemije kako bi se dobio cjelovit uvid u održivost metode. Također, metode koje uključuju višestupanjske postupke pripreme uzorka mogu imati niže BAGI vrijednosti bez obzira na njihov znanstveni ili klinički značaj (98–100).

#### 1.6. Pregled dosad objavljenih analitičkih metoda za etrasimod i ritlecitinib

Pregledom dostupne literature utvrđeno je da su podaci o analitičkim metodama za etrasimod ograničeni. U studiji *Lee i suradnika* (101) primijenjen je [<sup>14</sup>C]-obilježeni etrasimod radi praćenja njegove raspodjele i eliminacije u zdravih odraslih ispitanika, pri čemu je mjerena ukupna radioaktivnost koja obuhvaća sve <sup>14</sup>C-obilježene spojeve (etrasimod i njegove metabolite), bez kvantifikacije pojedinačne tvari. U radu nisu prikazani detalji kromatografskih niti spektrometrijskih uvjeta analitičke metode.

S druge strane, u radu *Wang i suradnika* (102) koncentracija etrasimoda u plazmi zdravih odraslih ispitanika, uključenih u kliničku studiju, određivana je validiranom HPLC-MS/MS metodom. Primijenjen je mali volumen uzorka (100 µL plazme), uz linearan analitički raspon od 0,250 do 100 ng/mL, pri čemu je LLOQ iznosio 0,250 ng/mL. Metoda je pokazala visoku točnost i preciznost unutar prihvatljivih kriterija, uz uspješno provedenu reanalizu uzoraka (engl. *Incurred sample reanalysis*, ISR) koja je potvrdila pouzdanost bioanalitičkog određivanja.

Podaci o analitičkim metodama za ritlecitinib također su ograničeni. U studiji *Bauman i suradnika* (103) primijenjen je [<sup>14</sup>C]-obilježeni ritlecitinib u kombinaciji s akcelatorskom masenom spektrometrijom za praćenje raspodjele i metabolizma ritlecitiniba i njegovih metabolita u biološkim uzorcima ispitanika, bez detaljnog opisa analitičkih uvjeta.

Nasuprot tome, *Kumar i suradnici* (104) razvili su HPLC-MS/MS metodu za određivanje ritlecitiniba u plazmi štakora, uz pripremu uzorka taloženjem proteina acetonitrilom. Kromatografsko razdvajanje provedeno je, u gradijentnom načinu radu, primjenom C18 kolone, a mobilna faza A bila je ultračista voda, dok je acetonitril služio kao mobilna faza B; obje faze zakiseljene mravljom kiselinom (0,1 %). Analiza uzoraka provedena je primjenom HPLC-MS/MS tehnike s ionizacijom elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionization*, ESI) u pozitivnom načinu rada uz praćenje višestrukih reakcija prijelaza (engl. *Multiple reaction monitoring*, MRM) 286,1 → 105,7 za ritlecitinib i 290,1 → 109,7 za interni standard. Metoda je validirana te je pokazala zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost.

Unatoč razvoju analitičkih postupaka za određivanje lijekova u biološkim uzorcima, u literaturi i dalje nedostaju detaljno opisane stabilitetno-indikativne metode, i za etrasimod i ritlecitinib, koje uključuju detaljno opisane kromatografske uvjete, pripremu uzoraka te identifikaciju produkata razgradnje što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima u ovom području.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Upalna bolest crijeva je kronična i progresivna bolest. Unatoč globalnom povećanju njene učestalosti, točan uzrok je nerazjašnjen, pri čemu se pretpostavlja da je kombinacija genetskih faktora i okolišnih utjecaja ključna u razvoju bolesti. Biološka terapija predstavlja značajan pomak u liječenju bolesnika. Nažalost, dio bolesnika ne reagira ili izgubi odgovor na biološku terapiju. S obzirom na potrebu za ranim postizanjem i održavanjem remisije, sljedeće desetljeće donosi nadu u razvoj lijekova iz skupine malih molekula s inovativnim mehanizmima djelovanja, kojima bi se dodatno proširile terapijske mogućnosti. Među terapijskim rješenjima ističu se modulatori receptora sfingozin-1-fosfata (S1P) i inhibitori Janus kinaze (JAK). Ovo istraživanje obuhvaća razvoj ekološki prihvatljivih analitičkih metoda primjenjivih u predformulacijskim i bioanalitičkim ispitivanjima etrasimoda (modulator S1P receptora) te ritlecitiniba (JAK inhibitor).

Stoga je glavni cilj istraživanja bio razviti ekološki prihvatljive kromatografske metode primjenjive u predformulacijskim i bioanalitičkim studijama etrasimoda i ritlecitiniba.

To obuhvaća slijedeće specifične ciljeve:

1. Razviti i validirati metode za određivanje sadržaja etrasimoda i ritlecitiniba primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS tehnike.
2. Razviti i validirati stabilitetno-indikativne metode za etrasimod i ritlecitinib primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS tehnike.
3. Provesti studiju prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba te strukturnu karakterizaciju produkata razgradnje primjenom MS/MS tehnike.
4. Provesti studije kompatibilnosti etrasimoda i ritlecitiniba s pomoćnim tvarima korištenjem različitih analitičkih tehnika.
5. Razviti i validirati bioanalitičke metode za etrasimod i ritlecitinib.
6. Primijeniti načela zelene kemije u razvoju analitičkih metoda i procijeniti njihovu ekološku prihvatljivost.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.2.1. Kemikalije i reagensi

##### Analitički standardi

- Etrasimod, >99 % – MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, SAD
- Ozanimod, >99 % – MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, SAD
- Ritlecitinib, >99 % – MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, SAD
- Tofacitinib citrate, >97 % – Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD
- Varfarin, p.a. čistoće – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

##### Pomoćne tvari

- Natrijev hijaluronidat, kozmetički – Fagron, D. Zelina, Hrvatska
- Kitozan – TCI, Tokio, Japan
- Ksantan guma – Fagron, D. Zelina, Hrvatska

##### Otapala, kiseline, lužine i soli

- Acetonitril, HPLC čistoće – J. T. Baker, Griesheim, Njemačka
- Etanol, 96 % – MilliporeSigma, Burlington, MA, SAD
- Fosfatni pufer – Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Klorovodična kiselina, 37 % – Carlo Erba, Val-de-Reuil, Francuska
- Metanol, HPLC čistoće – J. T. Baker, Griesheim, Njemačka
- Mravlja kiselina, >98 % – Merck, Darmstadt, Njemačka
- Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat, p.a. čistoće – Merck, Darmstadt, Njemačka
- Natrijev hidroksid, 97 % – Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Propan-2-ol, HPLC čistoće – ITW Reagents, Castellar del Vallès, Barcelona, Španjolska
- Vodikov peroksid, 33 % – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

##### Instrumenti

- Analitička automatska igla MEPS eVol® XR – Trajan, Victoria, Australija
- Analitička vaga s mogućnošću očitavanja 0,001 mg, MX5 –Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- Analitička vaga s mogućnošću očitavanja 0,01 mg, AG245 – Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska

- Analizator za simultanu termalnu analizu NETZSCH STA 409 °C – Netzsch-Gerätebau GmbH, Selb, Njemačka
- Centrifuga MiniSpin, polumjera 6 cm, brzina do 10 200 okr/min – Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Centrifuga Z 326 K, polumjera 14,7 cm, brzina do 4 500 okr/min – Hermle, Gosheim, Njemačka
- Centrifugalni vakuumski uparivač Concentrator plus – Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Diferencijalni pretražni kalorimetar Perkin-Elmer Diamond – PerkinElmer Inc., Waltham, MA, SAD
- Difraktometar XRD 6000 – Shimadzu, Tokio, Japan
- EDS detektor Bruker B-Quantax – Bruker Optics, Karlsruhe, Njemačka
- Inkubator (thermostat) ES-20/60 – Biosan, Riga, Latvija
- Mikroskop Tescan Vega 3 Easyprobe – Tescan, Brno, Češka
- pH metar FiveEasy – Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- pH elektroda LE438 – Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska
- Spektrometar Bruker Vertex 70 – Bruker Optics, Karlsruhe, Njemačka
- Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) s DAD detektorom i binarnom pumpom Agilent 1260 – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti spregnut s masenim spektrometrom trostrukog kvadrupola s ionizacijom elektroraspršenjem (HPLC-DAD-QQQ-MS/MS) Agilent 1260 Infinity II – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti spregnut s masenim spektrometrom kvadrupola s vremenom prolaza (engl. *Quadrupole time-of-flight*, Q-TOF) s ionizacijom elektroraspršenjem (HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS) Agilent 1260 Infinity – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Ultrazvučna kupelj S30H Elmasonic – Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- Uređaj za pročišćavanje vode Milli-Q IQ 7100 – Merck, Darmstadt, Njemačka
- Vakuumska pumpa Laboport N 816 – KNF, Freiburg im Breisgau, Njemačka
- Vakuumski razdjelnik Visiprep – Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Vrtložna miješalica Vortex 2 – IKA, Staufen, Njemačka

- BD Vacutainer® Serum Tube – SKU 367812 | Red Top, Blood Collection 13x75 mm tube, 4 mL draw volume, clot activator, silicone coated – Becton Dickinson Franklin Lakes, New Jersey, USA

#### Pribor

- Automatske mikropipete raznih volumnih raspona –Rainin, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- Eppendorf epruvete 2 mL – Kefo, Sisak, Hrvatska
- Epruvete za centrifugiranje 15 mL – AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, Njemačka
- Epruvete za centrifugiranje 50 mL – ISOLAB, Wertheim, Njemačka
- Filter injekcijski 25 µm – Filter-Bio, Nantong City, Jiangsu, Kina
- Inerti za viala – Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi Oasis HLB, 30 mg/6 mL – Waters, Milford, MA, SAD
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi Oasis PRiME HLB, 200 mg/1 mL – Waters, Milford, MA, SAD
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi C18, 500 mg/3 mL – Waters, Milford, MA, SAD
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi Bond Elut 18, 500 mg/6 mL – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi Bond Elut Plexa, 200 mg/6 mL – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi Bond Elut Plexa PAX, 30 mg/6 mL – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Kolone za ekstrakciju na čvrstoj fazi Discovery® DSC-18 SPE Tube, 500 mg/3 mL – Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Kolone za uklanjanje fosfolipida Phree™ Phospholipid removal tubes, 50 mg/1 mL – Phenomenex, Torrance, CA, SAD
- Kolone za uklanjanje fosfolipida Isolute® PLD+, 50 mg/1 mL – Biotage, Uppsala, Švedska
- Kromatografska kolona Kinetex ECO C18 Core-Shell, 100 × 3,0 mm, 2,6 µm – Phenomenex, Torrance, CA, SAD
- Kromatografska kolona Poroshell 120 SB-C18, 100 × 3,0 mm, 2,7 µm – Agilent technologies, Santa Clara, CA, SAD

- Nastavci za mikropipete volumena 20, 200, 1000  $\mu\text{L}$  i 10 mL – Rainin, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- Nastavci za ekstrakciju na čvrstoj fazi pomoću vakuumskog razdjelnika – Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Odmjerne tikvice klase A raznih volumea – ISOLAB, Wertheim, Njemačka
- Plastične epruvete 2mL – DELTALAB S. L., Barcelona, Španjolska
- Septe i čepovi za viala – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Viala za HPLC 2mL – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD

#### Programi

- Agilent Chemstation 10 – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Agilent MassHunter Qualitative and Quantitative Analysis – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- Agilent OpenLab – Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD
- AGREE v. 0.5 2020 – Pena-Pereira i suradnici, Vigo, Španjolska (Online dostupno na: <https://agree-index.anvil.app/>)
- AGREEprep 2022 – Wojnowski i suradnici, Gdansk, Poljska (Online dostupno na: <https://agreeprep.anvil.app/>)
- AMGS – Laurent Lehmann, Bristol-Myers Squibb, New Brunswick, NJ, SAD (Online dostupno na: <https://acsgcipr.org/amgs/>)
- Analytical Eco-Scale – Gałuszka i suradnici, Gdansk, Poljska
- BAGI 2023 – Manousi i suradnici, Thessaloniki, Grčka (Online dostupno na: <https://bagi-index.anvil.app/>)
- GAPI i ComplexMoGAPI – Zavod za analitičku kemiju, Sveučilište u Gdansku, Gdansk, Poljska (Online dostupno na: <https://fotouhmanour.github.io/ComplexMoGAPI/>)
- Microsoft Office Excel v. 2410 – Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD
- OriginLab 8.0 v8.0724 – OriginLab Corporation, Northampton, MA, SAD

### 3.2.2.1. Metode

#### 3.2.1. Stabilitetno-indikativna metoda za etrasimod

##### 3.2.1.1. Priprema standardnih otopina

Primarna otopina standarda etrasimoda pripremljena je otapanjem analitičkog standarda u metanolu do koncentracije od 1 mg/mL. Pripremljena otopina stavljena je 15 minuta u ultrazvučnu kupelj. Primarna otopina standarda pohranjena je na temperaturi od 4 °C, zaštićena od svjetlosti, do provedbe analize.

Radne otopine standarda pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajućih volumena primarne standardne otopine u smjesi metanola i ultračiste vode (50:50, v/v) kako bi se dobile otopine željene koncentracije. Radne otopine standarda pripremljene su neposredno pred analizu.

##### 3.2.1.2. HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metoda

Analiza etrasimoda provedena je primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS tehnike. Za analizu i obradu rezultata korišten je računalni program OpenLab ChemStation v2.8 i Mass Hunter Workstation.

Kromatografska separacija provedena je na koloni Poroshell 120 SB-C18 (3,0 × 100 mm, 2,7 μm) pri temperaturi kolone od 40 ± 0,1 °C, koristeći ultračistu vodu kao mobilnu fazu A, dok je acetonitril služio kao mobilna faza B; obje su zakiseljene mravljom kiselinom (0,1 %). Elucija je provedena primjenom gradijentnog načina prema sljedećem protokolu: 0–6 min 15–50 % B, 6–13 min 50–95 % B, 13–14,5 min 95 % B, 14,5–18 min 95–15 % B uz protok mobilne faze od 0,8 mL/min. Volumen injektiranja iznosio je 5 μL.

Detekcija DAD-om provedena je pri valnoj duljini od 227 nm, uz širinu proreza od 4 nm, dok su UV spektri prikupljeni u rasponu od 200 do 600 nm. Strukturna karakterizacija etrasimoda i produkata razgradnje provedena je pomoću trostrukog kvadrupola u pozitivnom ESI načinu rada. Kapilarni napon iznosio je 3500 V, tlak raspršivača 30 psi, temperatura plina 350 °C, a protok plina 11 L/min. Maseni spektri snimani su u rasponu  $m/z$  100–600. Kao kolizijski plin korišten je dušik (N<sub>2</sub> >99,9995 %) uz energiju kolizije od 40 V, dok je napon fragmentatora iznosio 135 V.

### 3.2.1.3. Validacija stabilitetno-indikativne metode

Stabilitetno-indikativna metoda za etrasimod validirana je u skladu sa smjernicama ICH Q2(R2) (60). Validacijski postupak obuhvaćao je ispitivanje sljedećih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti, točnosti i osjetljivosti.

Selektivnost metode procijenjena je analizom uzoraka iz studije prisilne razgradnje, pri čemu se razmatra razdvajanje etrasimoda od produkata razgradnje i odsutnost interferencija na vremenu zadržavanja analita, vrijednošću čistoće pika (engl. *Peak purity*) etrasimoda dobivene DAD analizom te faktorom razlučivanja ( $R_s$ ).

Linearnost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda etrasimoda u koncentracijskom rasponu od 2 do 10  $\mu\text{g/mL}$  u triplikatu. Kalibracijska krivulja konstruirana je metodom najmanjih kvadrata, a prihvatljivost linearnosti procijenjena je na temelju koeficijenta korelacije ( $r$ ) koji je trebao biti  $> 0,999$ .

Preciznost analitičke metode potvrđena je ispitivanjem ponovljivosti i međupreciznosti. Ponovljivost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda koncentracije 6  $\mu\text{g/mL}$  pripremljenih i analiziranih u šesteroplikatu tijekom jednog dana.

Međupreciznost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda koncentracije 6  $\mu\text{g/mL}$  tijekom tri dana. Otopine su pripremljene i analizirane u triplikatu. Rezultati su izraženi brojčano kao relativne standardne devijacije (RSD) koncentracija etrasimoda u radnim otopinama standarda između ponovljenih mjerenja te grafički preko Box-and-whisker dijagrama. Kriterij preciznosti metode smatrao se zadovoljenim ako su RSD vrijednosti ponovljenih mjerenja  $< 2\%$ .

Točnost metode određena je analizom radnih otopina standarda etrasimoda na trima koncentracijskim razinama (2, 6 i 10  $\mu\text{g/mL}$ ) pripremljenih u analiziranih u triplikatu. Rezultat je izražen kao postotak analitičkog prinosa, izračunat usporedbom eksperimentalno određene i nominalne koncentracije analita. Kriterij točnosti metode smatrao se zadovoljenim ako su analitički prinosi bili u rasponu 98–102 %.

Granica dokazivanja (LOD) i granica određivanja (LOQ) određene su eksperimentalno, na temelju omjera signal–šum (S/N), pri čemu je za LOD prihvaćen omjer 3:1, a za LOQ omjer 10:1.

Ispitivanje stabilnosti analita provedeno je analizom radne otopine standarda etrasimoda koncentracije 6 µg/mL. Stabilnost radnih otopina standarda etrasimoda procijenjena je pri trima različitim uvjetima skladištenja: na sobnoj temperaturi gdje je otopina pohranjena 4 sata, u autosampleru HPLC uređaja (4 °C), gdje je otopina čuvana 8 sati te u zamrzivaču (-20 °C) gdje je otopina pohranjena 7 dana. Stabilnost je procijenjena usporedbom izmjerenih koncentracija etrasimoda u svježe pripremljenim otopinama i otopinama nakon izlaganja definiranim uvjetima čuvanja. Da bi se zadovoljio kriterij stabilnosti, rezultati su trebali biti unutar 15 % od nominalne vrijednosti.

### 3.2.2. Stabilitetno-indikativna metoda za ritlecitinib

#### 3.2.2.1. Priprema standardnih otopina

Primarna otopina standarda ritlecitiniba pripremljena je otapanjem analitičkog standarda u metanolu do koncentracije od 1 mg/mL. Pripremljena otopina stavljena je 15 minuta u ultrazvučnu kupelj. Primarna otopina standarda pohranjena je na temperaturi od 4 °C, zaštićena od svjetlosti, do provedbe analize.

Radne otopine standarda pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajućih volumena primarne standardne otopine u smjesi metanola i ultračiste vode (50:50, v/v) kako bi se dobile otopine željene koncentracije. Radne otopine standarda pripremljene su neposredno pred analizu.

#### 3.2.2.2. HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metoda

Analiza ritlecitiniba provedena je primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS tehnike. Za analizu i obradu rezultata korišten je računalni program OpenLab ChemStation v2.8 i Mass Hunter Workstation.

Kromatografska separacija provedena je na koloni Kinetex EVO C18 Core-Shell (3,0 mm × 100 mm, veličina čestica 2,6 µm) pri temperaturi kolone od 40 ± 0,1 °C, koristeći ultračistu vodu kao mobilnu fazu A, dok je acetonitril služio kao mobilna faza B; obje su zakiseljene mravljom kiselinom (0,1 %). Elucija je provedena primjenom gradijentnog načina prema sljedećem protokolu: 0–4 min 0–25 % B, 4–6 min 25–80 % B, 6–13 min 80–0 % B uz protok mobilne faze od 0,8 mL/min. Volumen injektiranja iznosio je 5 µL.

Detekcija DAD-om provedena je pri valnoj duljini od 280 nm, uz širinu proreza od 4 nm, dok su UV spektri prikupljeni u rasponu od 200 do 600 nm. Strukturna karakterizacija ritlecitiniba i produkata razgradnje provedena je pomoću trostrukog kvadrupola u pozitivnom ESI načinu

rada. Kapilarni napon iznosio je 3500 V, tlak raspršivača 30 psi, temperatura plina 350 °C, a protok plina 11 L/min. Maseni spektri snimani su u rasponu  $m/z$  100–600. Kao kolizijski plin korišten je dušik ( $N_2 >99,9995\%$ ) uz energiju kolizije od 40 V, dok je napon fragmentatora iznosio 135 V.

### 3.2.2.3. Validacija stabilitetno-indikativne metode

Stabilitetno-indikativna metoda za ritlecitinib validirana je u skladu sa smjernicama ICH Q2(R2) (60). Validacijski postupak obuhvaćao je ispitivanje sljedećih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti, točnosti i osjetljivosti.

Selektivnost metode procijenjena je analizom uzoraka iz studije prisilne razgradnje, pri čemu se razmatra razdvajanje ritlecitiniba od produkata razgradnje i odsutnost interferencija na vremenu zadržavanja analita, vrijednošću čistoće pika ritlecitiniba dobivene DAD analizom te  $R_s$  vrijednošću.

Linearnost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda ritlecitiniba u koncentracijskom rasponu od 2 do 10  $\mu\text{g/mL}$  u triplikatu. Kalibracijska krivulja konstruirana je metodom najmanjih kvadrata, a prihvatljivost linearnosti procijenjena je na temelju koeficijenta korelacije ( $r$ ) koji je trebao biti  $> 0,999$ .

Preciznost analitičke metode potvrđena je ispitivanjem ponovljivosti i međupreciznosti. Ponovljivost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda koncentracije 6  $\mu\text{g/mL}$  pripremljenih i analiziranih u šesteroplikatu tijekom jednog dana.

Međupreciznost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda koncentracije 6  $\mu\text{g/mL}$  tijekom tri dana. Otopine su pripremljene i analizirane u triplikatu. Rezultati su izraženi brojčano kao RSD vrijednost koncentracija etrasimoda u radnim otopinama standarda između ponovljenih mjerenja te grafički preko Box-and-whisker dijagrama. Kriterij preciznosti metode smatrao se zadovoljenim ako su RSD vrijednosti  $< 2\%$ .

Točnost metode određena je analizom radnih otopina standarda ritlecitiniba na trima koncentracijskim razinama (2, 6 i 10  $\mu\text{g/mL}$ ) pripremljenih i analiziranih u triplikatu. Rezultat je izražen kao postotak analitičkog prinosa, izračunat usporedbom eksperimentalno određene i nominalne koncentracije analita. Kriterij točnosti metode smatrao se zadovoljenim ako su analitički prinosi bili u rasponu 98–102 %.

LOD i LOQ određene su eksperimentalno, na temelju omjera signal–šum (S/N), pri čemu je za LOD prihvaćen omjer 3:1, a za LOQ omjer 10:1.

Ispitivanje stabilnosti analita provedeno je analizom radne otopine standarda ritlecitiniba koncentracije 6 µg/mL. Stabilnost radnih otopina standarda ritlecitiniba procijenjena je pri trima različitim uvjetima skladištenja: na sobnoj temperaturi gdje je otopina pohranjena 4 sata, u autosampleru HPLC uređaja (4 °C), gdje je otopina čuvana 8 sati te u zamrzivaču (-20 °C) gdje je otopina pohranjena 7 dana. Stabilnost je procijenjena usporedbom izmjerenih koncentracija svježe pripremljenih otopina i otopina nakon izlaganja definiranim uvjetima čuvanja. Da bi se zadovoljio kriterij stabilnosti, rezultati su trebali biti unutar 15 % od nominalne vrijednosti.

### 3.2.3. Studija prisilne razgradnje etrasimoda

Studija prisilne razgradnje etrasimoda provedena je u skladu sa smjernicama ICH Q1A(R2) i ICH Q1B (58,59). Ispitivanja su provedena pod različitim stresnim uvjetima, uključujući kiselu, bazičnu, oksidativnu, fotolitičku i termičku razgradnju, s ciljem procjene stabilnosti etrasimoda te potvrde selektivnosti prethodno razvijene stabilitetno-indikativne analitičke metode.

Uzorci su analizirani u početnom trenutku ( $t=0$ ) te nakon izlaganja stresnim uvjetima, pri čemu je cilj bio postići razgradnju etrasimoda od 10 do 20 %. Ukoliko se nije postigla razgradnja od 10 % unutar 10 dana ispitivanje je završeno.

#### 3.2.3.1. Priprema standardne otopine etrasimoda

Primarna standardna otopina etrasimoda koncentracije 100 µg/mL pripremljena je otapanjem analitičkog standarda u metanolu. Pripremljena otopina stavljena je u ultrazvučnu kupelj 15 minuta.

#### 3.2.3.2. Priprema uzoraka za prisilnu razgradnju

Uzorci za prisilnu razgradnju pripremljeni su iz primarne standardne otopine etrasimoda koncentracije 100 µg/mL te izloženi različitim stresnim uvjetima, kako je prikazano u nastavku.

Kisela hidroliza provedena je tijekom 10 dana pri 70 °C dodatkom 1 M HCl u radnu otopinu standarda etrasimoda (konačna koncentracija etrasimoda 10 µg/mL, omjer radne otopine standarda i stresora 1:9).

Bazična hidroliza provedena je tijekom 72 sata pri sobnoj temperaturi dodatkom 1 M otopine NaOH u radnu otopinu standarda etrasimoda (konačna koncentracija etrasimoda 10 µg/mL, omjer radne otopine standarda i stresora 1:9).

Oksidativna razgradnja provedena je tijekom 48 sati pri sobnoj temperaturi dodatkom 33%-tne otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u radnu otopinu standarda etrasimoda (konačna koncentracija etrasimoda 10 µg/mL, omjer radne otopine standarda i stresora 1:9).

Fotolitička razgradnja provedena je tijekom 10 dana pri sobnoj temperaturi izlaganjem radne otopine standarda etrasimoda (koncentracije 10 µg/mL) kombinaciji UV i vidljive svjetlosti.

Termička razgradnja provedena je pri 70 °C tijekom 10 dana pohranjivanjem radne otopine standarda etrasimoda (koncentracije 10 µg/mL) u inkubatoru.

Za svaki stresni uvjet pripravljena je i odgovarajuća slijepa otopina koja je podvrgnuta identičnim eksperimentalnim uvjetima, ali bez dodatka analita.

#### 3.2.3.2. Analiza uzoraka

Svi uzorci prisilne razgradnje etrasimoda analizirani su primjenom prethodno razvijene i validirane stabilitetno-indikativne HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metode opisane u poglavlju 3.2.1. Metoda je korištena za praćenje koncentracije etrasimoda, identifikaciju produkata razgradnje te procjenu selektivnosti i sposobnosti razdvajanja analita od produkata razgradnje u svim ispitivanim uzorcima.

Za ispitivanje kinetike, uzorci su pohranjeni te analizirani tijekom 30 dana ili dok nije postignuta 50%-tna razgradnja etrasimoda.

#### 3.2.4. Studija prisilne razgradnje ritlecitiniba

Studija prisilne razgradnje ritlecitiniba provedena je u skladu sa smjernicama ICH Q1A(R2) i ICH Q1B (58,59). Ispitivanja su provedena pod različitim stresnim uvjetima, uključujući kiselu, bazičnu, oksidativnu, fotolitičku i termičku razgradnju, s ciljem procjene stabilnosti etrasimoda te potvrde selektivnosti prethodno razvijene stabilitetno-indikativne analitičke metode.

Uzorci su analizirani u početnom trenutku ( $t=0$ ) te nakon izlaganja stresnim uvjetima, pri čemu je cilj bio postići razgradnju ritlecitiniba od 10 do 20 %. Ukoliko se nije postigla razgradnja od 10 % unutar 10 dana ispitivanje je završeno.

#### *3.2.4.1. Priprema standardne otopine ritlecitiniba*

Primarna standardna otopina ritlecitiniba koncentracije 100 µg/mL pripremljena je otapanjem analitičkog standarda u metanolu. Pripremljena otopina stavljena je u ultrazvučnu kupelj 15 minuta.

#### *3.2.4.2. Priprema uzoraka za prisilnu razgradnju*

Uzorci za prisilnu razgradnju pripremljeni su iz primarne standardne otopine ritlecitiniba koncentracije 100 µg/mL te izloženi različitim stresnim uvjetima, kako je prikazano u nastavku.

Kisela hidroliza provedena je tijekom 10 dana pri 70 °C dodatkom 1 M HCl u radnu otopinu standarda ritlecitiniba (konačna koncentracija ritlecitiniba 10 µg/mL, omjer radne otopine standarda i stresora 1:9).

Bazična hidroliza provedena je tijekom 72 sata pri sobnoj temperaturi dodatkom 1 M otopine NaOH u radnu otopinu standarda ritlecitiniba (konačna koncentracija ritlecitiniba 10 µg/mL, omjer radne otopine standarda i stresora 1:9).

Oksidativna razgradnja provedena je tijekom 48 sati pri sobnoj temperaturi dodatkom 33 %-tne otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u radnu otopinu standarda ritlecitiniba (konačna koncentracija ritlecitiniba 10 µg/mL, omjer radne otopine standarda i stresora 1:9).

Fotolitička razgradnja provedena je tijekom 10 dana pri sobnoj temperaturi izlaganjem radne otopine standarda ritlecitiniba (koncentracije 10 µg/mL) kombinaciji UV i vidljive svjetlosti.

Termička razgradnja provedena je pri 70 °C tijekom 10 dana pohranjivanjem radne otopine standarda ritlecitiniba (koncentracije 10 µg/mL) u inkubatoru.

Za svaki stresni uvjet pripremljena je i odgovarajuća slijepa otopina koja je podvrgnuta identičnim eksperimentalnim uvjetima, ali bez dodatka analita.

#### *3.2.4.3. Analiza uzoraka*

Svi uzorci prisilne razgradnje ritlecitiniba analizirani su primjenom prethodno razvijene i validirane stabilitetno-indikativne HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metode opisane u poglavlju 3.2.2. Metoda je korištena za praćenje koncentracije ritlecitiniba, identifikaciju produkata

razgradnje te procjenu selektivnosti i sposobnosti razdvajanja analita od produkata razgradnje u svim ispitivanim uzorcima.

Za ispitivanje kinetike, uzorci su pohranjeni te analizirani tijekom 30 dana ili dok nije postignuta 50 %-tna razgradnja ritlecitiniba.

### 3.2.5. Ispitivanje kompatibilnosti etrasimoda i pomoćnih tvari

#### 3.2.5.1. Priprema uzoraka etrasimoda i pomoćnih tvari za ispitivanje kompatibilnosti

Ispitivanje kompatibilnosti etrasimoda s kitozanom, ksantan gumom i hijaluronskom kiselinom provedeno je na pojedinačnoj djelatnoj i pomoćnim tvarima, kao i na njihovim binarnim smjesama pripremljenima u masenom omjeru 1:1, približno 5 mg po sastavnici.

#### 3.2.5.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Prije analize, diferencijalni pretražni kalorimetar kalibriran je indijem (99,98 % čistoće; talište 156,61 °C; entalpija taljenja 28,71 J/g). Uzorci mase 3–5 mg vagani su u aluminijske posudice od 50 µL i zatvoreni probušenim aluminijskim poklopcem. Mjerenja su provedena u struji čistog dušika (25 mL/min) pri brzini zagrijavanja od 10 °C/min, u rasponu temperatura od 25 do 350 °C. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

#### 3.2.5.3. Rengenska difrakcija (XRD)

Analiza uzoraka rendgenskom difrakcijom provedena je uporabom difraktometra s radnim parametrima: akceleracijski napon od 40 kV i struju od 30 mA. Prikupljanje podataka izvedeno je u koracima (*step-scan* način) unutar 2θ područja od 10° do 105°, uz veličinu koraka od 0,02° i vrijeme zadržavanja od 0,6 s po koraku. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

#### 3.2.5.4. Fourierova transformacijska infracrvena (FTIR) spektroskopija

FTIR spektri su snimani u području od 4000 do 400 cm<sup>-1</sup>, pri razlučivosti od 2 cm<sup>-1</sup>, uz prosječno 32 skeniranja po uzorku. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

#### 3.2.5.5. Diferencijalna termalna analiza (DTA) i termogravimetrijska analiza (TGA)

10 mg svakog uzorka stavljeno je u korundni lončić te zagrijavano do 1000 °C konstantnom brzinom od 10 °C/min u atmosferi sintetskog zraka protoka 30 cm<sup>3</sup>/min. Kao referentni

materijal korišten je korundni lončić. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

#### 3.2.5.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Prije snimanja, pojedinačni uzorci (5 mg) i uzorci smjesa (10 mg) pričvršćeni su na aluminijske nosače pomoću obostrane ugljikove ljepljive trake i prevučeni tankim slojem zlato-palatinške legure metodom isparavanja.

#### 3.2.5.7. Izotermalna studija razgradnje (IST)

Za provedbu studije izotermalne razgradnje priređene su dvije skupine uzoraka. Uzorci su vizualno pregledani te su nakon toga pohranjeni pri definiranim uvjetima. Jedna skupina pohranjena je na povišenoj temperaturi od 50 °C, dok je druga skupina pohranjena na sobnoj temperaturi (25 ± 2 °C). Uzorci su inkubirani tijekom četiri tjedna u zatvorenim staklenim bočicama, zaštićenima od svjetlosti. Nakon isteka razdoblja inkubacije, uzorci su razrijeđeni smjesom metanola i ultračiste vode (50:50, v/v) do koncentracije od 100 µg/mL. Prije analize uzorci su stavljeni na vortex mješalicu, a po potrebi filtrirani primjenom injekcijskih filtara 25 µm. Nakon pripreme uzoraka isti su analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metodom za određivanje sadržaja etrasimoda (*Poglavlje 3.2.1.*).

#### 3.2.6. Ispitivanje kompatibilnosti ritlecitiniba i pomoćnih tvari

##### 3.2.6.1. Priprema uzoraka ritlecitiniba i pomoćnih tvari za ispitivanje kompatibilnosti

Ispitivanje kompatibilnosti ritlecitiniba s kitozanom, ksantan gumom i hijaluronskom kiselinom provedeno je na pojedinačnoj djelatnoj i pomoćnim tvarima, kao i na njihovim binarnim smjesama pripremljenima u masenom omjeru 1:1, približno 5 mg po sastavnici.

##### 3.2.6.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Prije analize, diferencijalni pretražni kalorimetar kalibriran je indijem (99,98 % čistoće; talište 156,61 °C; entalpija taljenja 28,71 J/g). Uzorci mase 3–5 mg vagani su u aluminijske posudice od 50 µL i zatvoreni probušenim aluminijskim poklopcem. Mjerenja su provedena u struji čistog dušika (25 mL/min) pri brzini zagrijavanja od 10 °C/min, u rasponu temperatura od 25 do 350 °C. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

### 3.2.6.3. Rengenska difrakcija (XRD)

Analiza uzoraka rendgenskom difrakcijom provedena je uporabom difraktometra s radnim parametrima: akceleracijski napon od 40 kV i struju od 30 mA. Prikupljanje podataka izvedeno je u koracima (*step-scan* način) unutar  $2\theta$  područja od  $10^\circ$  do  $105^\circ$ , uz veličinu koraka od  $0,02^\circ$  i vrijeme zadržavanja od 0,6 s po koraku. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

### 3.2.6.4. Fourierova transformacijska infracrvena (FTIR) spektroskopija

FTIR spektri su snimani u području od  $4000$  do  $400\text{ cm}^{-1}$ , pri razlučivosti od  $2\text{ cm}^{-1}$ , uz prosječno 32 skeniranja po uzorku. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

### 3.2.6.5. Diferencijalna termalna analiza (DTA) i termogravimetrijska analiza (TGA)

10 mg svakog uzorka stavljeno je u korundni lončić te zagrijavano do  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  konstantnom brzinom od  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  u atmosferi sintetskog zraka protoka  $30\text{ cm}^3/\text{min}$ . Kao referentni materijal korišten je korundni lončić. Rezultati su prikazani korištenjem OriginLab (Northampton, MA, SAD) 8.0 v8.0724 programa.

### 3.2.6.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Prije snimanja, pojedinačni uzorci (5 mg) i uzorci smjesa (10 mg) pričvršćeni su na aluminijske nosače pomoću obostrane ugljikove ljepljive trake i prevučeni tankim slojem zlato-palatinske legure metodom isparavanja.

### 3.2.6.7. Izotermalna studija razgradnje (IST)

Za provedbu studije izotermalne razgradnje priređene su dvije skupine uzoraka. Uzorci su vizualno pregledani te su nakon toga pohranjeni pri definiranim uvjetima. Jedna skupina pohranjena je na povišenoj temperaturi od  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , dok je druga skupina pohranjena na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ). Uzorci su inkubirani tijekom četiri tjedna u zatvorenim staklenim bočicama, zaštićenima od svjetlosti. Nakon isteka razdoblja inkubacije, uzorci su razrijeđeni smjesom metanola i ultračiste vode (50:50, v/v) do koncentracije od  $10\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ . Prije analize uzorci su stavljani na vortex mješalicu, a po potrebi filtrirani primjenom injekcijskih filtara  $25\text{ }\mu\text{m}$ . Nakon pripreme uzoraka isti su analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metodom za određivanje sadržaja ritlecitiniba (*Poglavlje 3.2.2.*)

### 3.2.7. Bioanalitička metoda za etrasimod

#### 3.2.7.1. Priprema standardnih otopina

Primarne standardne otopine etrasimoda te unutarnjeg standarda ozanimoda koncentracije 100 µg/mL pripremljene su otapanjem analitičkih standarda u metanolu. Pripremljene otopine stavljene su u ultrazvučnu kupelj 15 minuta.

#### 3.2.7.2. Prikupljanje uzoraka

Venska krv zdravih dobrovoljca prikupljena je u vacutainer epruvete za odvajanje seruma. Plazma je sakupljena nakon centrifugiranja pri 1500 g tijekom 10 minuta te je pohranjena na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize. Prije provedbe eksperimenata, plazma je odmrznuta na sobnoj temperaturi. Istraživanje je odobreno od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (klasa 004-01/24-03/01, ur. broj 251-62-03-24-18, od 13. ožujka 2024.)

#### 3.2.7.3. Priprema uzoraka

Uzorci plazme obogaćeni standardnom otopinom etrasimoda pripremljeni su dodatkom radnih otopina standarda u slijepe uzorke plazme. Uklanjanje fosfolipida i proteina iz uzoraka plazme provedeno je primjenom Phree™ Phospholipid removal filtera i taloženjem proteina metanolom. U Eppendorf epruvetu je dodano 300 µL plazme, 120 µL odgovarajuće radne standardne otopine etrasimoda i 120 µL standardne otopine ozanimoda (koncentracije 100 µg/mL).

Taloženje proteina provedeno je dodatkom 660 µL metanola, čime je postignut omjer plazme i organskog otapala 1:3 te ukupni volumen uzorka od 1200 µL. Zatim, uzorci su intenzivno vortexirani 30 sekundi i centrifugirani tijekom 5 minuta na 14 000 okr/min.

Nakon taloženja proteina, 1000 µL dobivene otopine preneseno je na Phree™ Phospholipid removal filter. Uzorci su centrifugirani pri 14 000 okr/min tijekom 10 min čime su učinkovito uklonjeni fosfolipidi i preostali proteini. Dobiveni eluati upareni su do suha u uređaju Concentrator plus pri temperaturi od 60 °C. Suhi ostatak ponovno je otopljen u 1 mL smjese ultračiste vode i metanola (50:50, v/v).

#### 3.2.7.4. HPLC-DAD-QQQ-MS/MS bioanalitička metoda

Analiza etrasimoda provedena je primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS tehnike. Za analizu i obradu rezultata korišten je računalni program OpenLab ChemStation v2.8 i Mass Hunter Workstation.

Kromatografska separacija etrasimoda provedena je na koloni Poroshell 120 SB-C18 ( $3,0 \times 100$  mm,  $2,7 \mu\text{m}$ ) s radnom temperaturom kolone  $40 \pm 0,1$  °C, koristeći ultračistu vodu kao mobilnu fazu A, dok je acetonitril služio kao mobilna faza B; obje su zakiseljene mravljom kiselinom (0,1 %). Eluacija je provedena primjenom gradijentnog načina prema sljedećem protokolu: 0–4 min → 30–90 % B, 4–5 min → 90 % B, 5–13 min → 90–30 % B pri protoku mobilne faze 0,8 mL/min. Volumen injektiranja iznosio je 5  $\mu\text{L}$ , a valna duljina DAD detekcije 227 nm i širina proreza 4 nm. Apsorbancija analita tijekom kromatografske analize prikupljena je u spektralnom rasponu od 200 do 600 nm.

Kvantifikacija etrasimoda u uzorcima plazme provedena je pomoću trostrukog kvadrupola u pozitivnom ESI načinu rada dok je kvantifikacija provedena u MRM načinu rada s praćenjem MS/MS prijelaza etrasimoda  $m/z$  458 → 159 te ozanimoda  $m/z$  405 → 146. Kapilarni napon iznosio je 3500 V, tlak raspršivača 30 psi, temperatura plina 350 °C, a protok plina 11 L/min. Maseni spektri snimani su u rasponu  $m/z$  100–600. Kao kolizijski plin korišten je dušik ( $\text{N}_2$  >99,9995 %) uz energiju kolizije od 40 V, dok je napon fragmentatora iznosio 135 V.

#### 3.2.7.5. Validacija bioanalitičke metode

Bioanalitička metoda za etrasimod validirana je u skladu sa smjernicama ICH M10 (71). Validacijski postupak obuhvaćao je ispitivanje sljedećih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti, točnosti, osjetljivosti, utjecaja matrice, prijenos analita, integriteta razrjeđenja, stabilnosti te robusnosti.

Selektivnost metode procijenjena je slijepim uzorcima (uzorci matrice obrađeni bez dodavanja analita ili IS-a) dobivenim od 6 dobrovoljnih davaoca. Površine pikova koji se mogu pripisati interferirajućim sastavnicama nisu smjele biti veći od 20 % površine pika analita pri LLOQ-u i ne veći od 5 % površine pika IS-a u LLOQ uzorku za svaki pojedinačni slijepi uzorak.

Linearnost metode ispitana je analizom uzoraka plazme obogaćenih standardnom otopinom etrasimoda na šest koncentracijskih razina u koncentracijskom rasponu od 50 do 2000 ng/mL u triplikatu. Uzorci za izradu kalibracijskog pravca pripremljeni su dodatkom standardne otopine etrasimoda u plazmu dobrovoljnih davaoca. Raspon kalibracije definiran je s najnižom

granicom određivanja LLOQ (najniži kalibracijski standard) te s najvišom granicom određivanja ULOQ (najviši kalibracijski standard). Kalibracijska krivulja konstruirana je metodom najmanjih kvadrata, a prihvatljivost linearnosti procijenjena je na temelju koeficijenta korelacije ( $r$ ) te povratno izračunatih koncentracija koje su trebale biti unutar propisanog raspona do 15% od nominalne koncentracije za svaki kalibracijski standard te unutar 20 % za LLOQ.

Kontrolni uzorci korišteni za određivanje preciznosti i točnosti pripremljeni su na četiri razine koncentracije: donja granica određivanja (LLOQ) 50 ng/mL, niska QC 250 ng/mL, srednja QC 500 ng/mL i visoka QC 2000 ng/mL te analizirani u peterplikatu u tri ponavljanja. Rezultati preciznosti izraženi su brojačano kao RSD vrijednosti koncentracija etrasimoda u uzorcima plazme obogaćenim standardnom otopinom etrasimoda između ponovljenih mjerenja te grafički preko Box-and-whisker dijagrama. Kriterij preciznosti metode smatrao se zadovoljenim ako su RSD vrijednosti za svaku ispitanu koncentraciju unutar 15 %, tj. unutar 20 % za LLOQ.

Točnost metode iskazana je kao postotak analitičkog prinosa, izračunat usporedbom eksperimentalno određene i nominalne koncentracije analita. Analitički prinos na svakoj koncentraciji morao je biti unutar 15 % nominalne vrijednosti koncentracije QC uzoraka odnosno unutar 20 % za LLOQ.

LOD i LOQ su određene na temelju standardne devijacije odgovora i nagiba pravca koji se mogu izraziti kao:  $LOD = 3,3 \sigma/S$  odnosno,  $LOQ = 10 \sigma/S$  gdje  $\sigma$  predstavlja standardnu devijaciju odsječka na osi y regresijskog pravca, a  $S$  nagib pravca procijenjen iz kalibracijske krivulje analita.

Utjecaj matrice ispitan je usporedbom površina pikova etrasimoda u radnim otopinama standarda etrasimoda niske (50 ng/mL) i visoke (2000 ng/mL) koncentracije i uzorcima plazme obogaćenima standardnom otopinom etrasimoda u triplikatu. Kriterij se smatra zadovoljenim ako su RSD vrijednosti za svaku ispitanu koncentraciju bile unutar 15 %.

Prijenos analita ispitan je analizom slijepog uzorka nakon analize uzorka plazme obogaćenom standardnom otopinom etrasimoda visoke koncentracije 2000 ng/mL. Dobiveni rezultat uspoređivao se s površinom etrasimoda na najnižoj granici određivanja (LLOQ) te nije smio biti veći od 20 % površine pika etrasimoda na koncentracijskoj razini LLOQ.

Integritet razrjeđivanja ispitan je razrjeđivanjem uzoraka plazme obogaćene standardnom otopinom etrasimoda koncentracije iznad ULOQ. Pripremljen je kontrolni uzorak koncentracije 10 000 ng/ml te zatim razrijeđen na koncentracije 1000 i 2000 ng/mL matricom. Uzorci su analizirani u peteroplikatu. Da bi kriterio bio zadovoljen, rezultati su trebali biti unutar 15 % od nominalnih vrijednosti.

Ispitivanje stabilnosti analita provedeno je analizom uzoraka plazme obogaćene standardnom otopinom etrasimoda koncentracije 250 ng/mL. Stabilnost je procijenjena pri četiri različitim uvjetima skladištenja: na radnom stolu pri sobnoj temperaturi gdje je uzorak pohranjen 4 sata, u autosampleru HPLC uređaja pri 4 °C gdje je pohranjen 8 sati, u zamrzivaču pri -20 °C gdje je čuvan 7 dana. Dodatno je provedeno ispitivanje pri čemu se uzorak zamrzavao pri -20 °C i odmrzavao pri sobnoj temperaturi u tri ciklusa po 24 sata (engl. *Freeze-and-thaw*). Stabilnost je procijenjena usporedbom izmjerenih koncentracija svježih pripremljenih uzoraka i uzoraka nakon izlaganja definiranim uvjetima čuvanja. Da bi se zadovoljio kriterij stabilnosti, rezultati su trebali biti unutar 15 % od nominalne vrijednosti.

Robusnost analitičkog postupka ispitana je namjernim varijacijama parametara metode: promjena temperature kolone  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ , promjena početnog sastava mobilne faze  $\pm 1\%$  (vodene te organske faze) te promjena brzine protoka mobilne faze za  $\pm 0,05\text{ mL/min}$ .

### 3.2.8. Bioanalitička metoda za ritlecitinib

#### 3.2.8.1. Priprema standardnih otopina

Primarne standardne otopine ritlecitiniba i unutarnjeg standarda tofacitiniba koncentracije 100  $\mu\text{g/mL}$  pripremljene su otapanjem analitičkih standarda u metanolu. Pripremljene otopine stavljene su u ultrazvučnu kupelj 15 minuta.

#### 3.2.8.2. Prikupljanje uzoraka

Venska krv zdravih dobrovoljca prikupljena je u u vacutainer epruvete za odvajanje seruma. Plazma je sakupljena nakon centrifugiranja pri 1500 g tijekom 10 minuta te je pohranjena na  $-18^{\circ}\text{C}$  do analize. Prije provedbe eksperimenata, plazma je odmrznuta na sobnoj temperaturi. Istraživanje je odobreno od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (klasa 004-01/24-03/01, ur. broj 251-62-03-24-18, od 13. ožujka 2024.)

### 3.2.8.3. Priprema uzoraka

Uzorci plazme obogaćeni standardnom otopinom ritlecitiniba pripremljeni su dodatkom radnih otopina standarda u slijepe uzorke plazme. Uklanjanje fosfolipida i proteina iz uzoraka plazme provedeno je primjenom Phree™ Phospholipid removal filtera i taloženjem proteina metanolom. U Eppendorf epruvetu je dodano 300 µL plazme, 120 µL odgovarajuće radne standardne otopine ritlecitiniba i 120 µL standardne otopine tofacitiniba (koncentracije 100 µg/mL).

Taloženje proteina provedeno je dodatkom 660 µL metanola, čime je postignut omjer plazme i organskog otapala 1:3 te ukupni volumen uzorka od 1200 µL. Zatim, uzorci su intenzivno vortexirani 30 sekundi i centrifugirani tijekom 5 minuta na 14 000 okr/min.

Nakon taloženja proteina, 1000 µL dobivene otopine preneseno je na Phree™ Phospholipid removal filter. Uzorci su centrifugirani pri 14 000 okr/min tijekom 10 minuta čime su učinkovito uklonjeni fosfolipidi i preostali proteini. Dobiveni eluati upareni su do suha u uređaju Concentrator plus pri temperaturi od 60 °C. Suhi ostatak ponovno je otopljen u 1 mL smjese ultračiste vode i metanola (50:50, v/v).

### 3.2.8.4. HPLC-DAD-QQQ-MS/MS bioanalitička metoda

Analiza ritlecitiniba provedena je primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS tehnike. Za analizu i obradu rezultata korišten je računalni program OpenLab ChemStation v2.8 i Mass Hunter Workstation.

Optimalna separacija ritlecitiniba postignuta je pomoću Kinetex EVO C18 Core-Shell analitičke kolone (3,0 mm × 100 mm, veličina čestica 2,6 µm) pri radnoj temperaturi od 40,0 ± 0,1 °C. Mobilna faza A bila je ultračista voda, dok je acetonitril služio kao mobilna faza B; obje faze zakiseljene mravljom kiselinom (0,1 %). Elucija je provedena primjenom gradijentnog načina prema slijedećom protokolu: 0–4 min: 0–25% B; 4–7 min: 25–100% B; 7–7,10 min: 100%; 7,10–12 min: 100–0% B. Protok mobilne faze iznosio je 0,55 mL/min s volumenom injektiranja 5 µL. Tijekom kromatografske analize, apsorbanca analita zabilježena je u spektralnom rasponu od 200 do 400 nm, dok je valna duljina za procjenu ritlecitiniba određena na 280 nm s prorezom od 4 nm.

Kvantifikacija ritlecitiniba u uzorcima plazme provedena je pomoću trostrukog kvadrupola u pozitivnom ESI načinu rada dok je kvantifikacija provedena u MRM načinu rada s praćenjem MS/MS prijelaza ritlecitiniba  $m/z$  286 → 152 te tofacitiniba  $m/z$  313 → 149. Kapilarni napon

iznosio je 3500 V, tlak raspršivača 30 psi, temperatura plina 350 °C, a protok plina 11 L/min. Maseni spektri snimani su u rasponu  $m/z$  100–600. Kao kolizijski plin korišten je dušik ( $N_2$  >99,9995 %) uz energiju kolizije od 40 V, dok je napon fragmentatora iznosio 135 V.

#### 3.2.8.5. Validacija bioanalitičke metode

Bioanalitička metoda za ritlecitinib validirana je u skladu sa smjernicama (ICH M10) (71). Validacijski postupak obuhvaćao je ispitivanje sljedećih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti, točnosti, osjetljivosti, utjecaja matrice, prijenos analita, integriteta razrjeđenja, stabilnosti te robusnosti.

Selektivnost metode procijenjena je slijepim uzorcima (uzorci matrice obrađeni bez dodavanja analita ili IS-a) dobivenim od 6 dobrovoljnih davaoca. Površine pikova koji se mogu pripisati interferirajućim sastavnicama nisu smijeli biti veći od 20 % površine pika analita pri LLOQ-u i ne veći od 5 % površine pika IS-a u LLOQ uzorku za svaki pojedinačni slijepi uzorak.

Linearnost metode ispitana je analizom uzoraka plazme obogaćenih standardnom otopinom ritlecitiniba na šest koncentracijskih razina u koncentracijskom rasponu od 50 do 2000 ng/mL u triplikatu. Uzorci za izradu kalibracijskog pravca pripremljeni su dodatkom standardne otopine ritlecitiniba u plazme dobrovoljnih davaoca. Raspon kalibracije definiran je s najnižom granicom određivanja LLOQ (najniži kalibracijski standard) te s najvišom granicom određivanja ULOQ (najviši kalibracijski standard). Kalibracijska krivulja konstruirana je metodom najmanjih kvadrata, a prihvatljivost linearnosti procijenjena je na temelju koeficijenta korelacije ( $r$ ) te povratno izračunatih koncentracija koje su trebale biti unutar propisanog raspona do 15% od nominalne koncentracije za svaki kalibracijski standard te unutar 20 % za LLOQ.

QC uzorci korišteni za određivanje preciznosti i točnosti pripremljeni su na četiri razine koncentracije: donja granica određivanja (LLOQ) 50 ng/mL, niska QC 250 ng/mL, srednja QC 500 ng/mL i visoka QC 2000 ng/mL te analizirani u peterplikatu u tri ponavljanja. Rezultati preciznosti izraženi su broičano kao RSD vrijednosti koncentracija etrasimoda u uzorcima plazme obogaćenim standardnom otopinom ritlecitiniba između ponovljenih mjerenja te grafički preko Box-and-whisker dijagrama. Kriterij preciznosti metode smatrao se zadovoljenim ako su RSD vrijednosti za svaku ispitanu koncentraciju unutar 15 %, tj. unutar 20 % za LLOQ.

Točnost metode iskazana je kao postotak analitičkog prinosa, izračunat usporedbom eksperimentalno određene i nominalne koncentracije analita. Analitički prinos na svakoj koncentraciji morao je biti unutar 15 % nominalne vrijednosti koncentracije QC uzoraka odnosno unutar 20 % za LLOQ.

LOD I LOQ su određene na temelju standardne devijacije odgovora i nagiba pravca koji se mogu izraziti kao:  $LOD = 3,3 \sigma/S$  odnosno,  $LOQ = 10 \sigma/S$  gdje  $\sigma$  predstavlja standardnu devijaciju odsječka na osi y regresijskog pravca, a S nagib pravca procijenjen iz kalibracijske krivulje analita.

Utjecaj matrice ispitan je usporedbom površina pikova ritlecitiniba u radnim otopinama standarda ritlecitiniba niske (50 ng/mL) i visoke (2000 ng/mL) koncentracije i uzorcima plazme obogaćenima standardnom otopinom ritlecitiniba u triplicatu. Kriterij se smatrao zadovoljenim ako su RSD vrijednosti za svaku ispitanu koncentraciju bile unutar 15 %.

Prijenos analita ispitan je analizom slijepog uzorka nakon analize uzorka plazme obogaćenom standardnom otopinom ritlecitiniba visoke koncentracije 2000 ng/mL. Dobiveni rezultat uspoređivao se s površinom ritlecitiniba na najnižoj granici određivanja (LLOQ) te nije smio biti veći od 20 % površine pika ritlecitiniba na koncentracijskoj razini LLOQ.

Integritet razrjeđivanja ispitan je razrjeđivanjem uzoraka plazme obogaćene standardnom otopinom ritlecitiniba koncentracije iznad ULOQ. Pripremljen je kontrolni uzorak koncentracije 10 000 ng/ml te zatim razrijeđen na koncentracije 1000 i 2000 ng/mL matricom. Uzorci su analizirani u peteroplukatu. Da bi kriterio bio zadovoljen, rezultati su trebali biti unutar 15 % od nominalnih vrijednosti.

Ispitivanje stabilnosti analita provedeno je analizom uzoraka plazme obogaćene standardnom otopinom ritlecitiniba koncentracije 250 ng/mL. Stabilnost je procijenjena pri četiri različitim uvjetima skladištenja: na radnom stolu pri sobnoj temperaturi gdje je uzorak pohranjen 4 sata, u autosampleru HPLC uređaja pri 4 °C gdje je pohranjen 8 sati, u zamrzivaču pri -20 °C gdje je čuvan 7 dana. Dodatno je provedeno ispitivanje pri čemu se uzorak zamrzavao pri -20 °C i odmrzavao pri sobnoj temperature u tri ciklusa po 24 sata. Stabilnost je procijenjena usporedbom izmjerenih koncentracija svježe pripremljenih uzoraka i uzoraka nakon izlaganja definiranim uvjetima čuvanja. Da bi se zadovoljio kriterij stabilnosti, rezultati trebaju biti unutar 15 % od nominalne vrijednosti.

Robusnost analitičkog postupka ispitana je namjernim varijacijama parametara metode: promjena temperature kolone  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ , promjena početnog sastava mobilne faze  $\pm 1\%$  (vodene te organske faze) te promjena brzine protoka mobilne faze za  $\pm 0,05\text{ mL/min}$ .

### 3.2.9. Vezivanje etrasimoda i ritlecitiniba za humani serumski protein

Vezivanje etrasimoda i ritlecitiniba za humani serumski protein (engl. *Human serum albumin*, HSA) iz plazme analizirano je afinitetnom kromatografijom s kolonom tvrtke ChromTech. Korištena je kolona s imobiliziranim proteinima HSA ( $4,6\text{ mm} \times 50\text{ mm}$ , veličina čestica  $5\text{ }\mu\text{m}$ ). Volumen injektiranja bio je  $10\text{ }\mu\text{L}$ . Mobilna faza sastojala se od  $20\text{ mmol/L}$  kalijevog fosfatnog pufera ( $\text{pH } 7,4$ ) kao faze A i *i*-propanola kao faze B. Elucija je provedena primjenom linearnog gradijentnog načina prema slijedećom protokolu: 0–6 min: 0–30 % B; 6–15 min: 30 % B. Brzina protoka mobilne faze održavana je na  $1,5\text{ mL/min}$ . Između svakog ciklusa provedena je petominutna rekaliibracija kolone. Kromatografske analize provedene su na kontroliranoj temperaturi od  $25,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Vremena zadržavanja zabilježena su na valnim duljinama od  $227\text{ nm}$  za etrasimod i  $280\text{ nm}$  za ritlecitinib. Kalibracija HSA kolone, opisana je u našoj prethodno objavljenoj studiji, provedena je varfarinom (105).

### 3.2.10. Procjena zelene analitičke kemije

Za procjenu razine usklađenosti primijenjenih analitičkih postupaka s načelima zelene analitičke kemije korišteno je više online dostupnih alata i platformi za procjenu: AMGS, Analytical Eco-Scale, AGREE, AGREEprep, GAPI, ComplexGAPI i BAGI.

Navedeni alati omogućuju procjenu utjecaja (bio)analitičkih metoda na okoliš, uzimajući u obzir različite kriterije poput potrošnje reagensa i otapala, generiranja otpada, energetske učinkovitosti, sigurnosti rada te ukupne održivosti analitičkog postupka. Procjena je provedena unosom relevantnih parametara pojedine (bio)analitičke metode u svaku od navedenih platformi, nakon čega su dobiveni odgovarajući indeksi, bodovi ili grafički prikazi koji opisuju stupanj „zelenosti” analiziranih metoda.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Razvoj i optimizacija stabilitetno-indikativne metode etrasimoda

Kromatografski uvjeti optimizirani su tijekom razvoja metode, uzimajući u obzir kemijsku strukturu i fizikalno-kemijska svojstva etrasimoda. Na temelju podataka izračunatih programom ACD/Labs, predviđena je visoka lipofilnost (ACD/LogP vrijednost 6.43) etrasimoda.

Ispitane su različite kromatografske kolone obrnutih faza (vrsta stacionarne faze: C8 i C18; duljina kolone: 100 i 150 mm; veličina čestica: 2,7, 3,5 i 5,0  $\mu\text{m}$ ), vrsta organske faze (metanol i acetonitril), postotak (10–90 %) u mobilnoj fazi, vrsta elucije (izokratna i gradijentna) i protok (0,5–1,0 mL/min) kako bi se postigli prikladni kromatografski odazivi. Zbog strukturne sličnosti između etrasimoda i njegovih produkata razgradnje dobivenih tijekom provedbe studije prisilne razgradnje, njihovo simultano radvajanje bilo je otežano.

Od svih ispitanih kolona obrnutom fazom, s Poroshell 120 SB-C18 kolonom dobivena je visoka učinkovitost pri nižim tlakovima i najbolje razlučivanje između etrasimoda i produkata razgradnje prisilne razgradnje, s oštrim pikovima zahvaljujući svojim površinski poroznim česticama stacionarne faze koje imaju čvrstu jezgru i porozni vanjski sloj.

Sljedeći korak u procesu razvoja metode bio je odabir mobilne faze. Metanol i acetonitril korišteni su za razvoj metode kao najčešće korišteni organski modifikatori u kromatografiji obrnute faze zbog svojih iznimnih svojstava. Među njima su: potpuna miješljivost s vodom, relativno niska viskoznost njihovih vodenih otopina (posebice u slučaju acetonitrila) i niski UV prag (190 nm acetonitril i 205 nm metanol). Također, dostupni su u visokom stupnju čistoće potrebnoj za tekućinsku kromatografiju i masenu spektrometriju.

Tijekom procesa optimizacije mobilne faze korišteno je nekoliko izokratnih uvjeta poput mješavina metanola odnosno acetonitrila u vodi u različitim volumnim omjerima. Primijećeno je da je acetonitril bolji u usporedbi s metanolom jer je postignuto bolje razlučivanje i oštriji pikovi. Mravlja kiselina korištena je kao modifikator mobilne faze. UV spektar etrasimoda pokazao je najvišu apsorbanciju na valnoj duljini od 227 nm. Kromatogrami su snimani na valnoj duljini od 280 nm, zbog bolje razlučivosti pikova i manjeg šuma bazne linije, dok je spektar praćen u rasponu od 200 do 400 nm.

Ispitivanje prikladnosti sustava služi za procjenu prikladnosti analitičkog instrumenta, reagensa i kolone za provedbu određene analize. Ispitani su parametri: vrijeme zadržavanja, površina, čistoća, simetrija pika te kapacitet za pikove. Eksperimentalno dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 4**, a svi ispitani parametri udovoljavaju prihvatljivim kriterijima u skladu s važećim ICH Q2(R2) (60) i USP smjernicama (106).

**Tablica 4.** Parametri prikladnosti sustava za novo razvijenu stabilitetno-indikativnu metodu etrasimoda (koncentracija 6 µg/mL,  $n = 6$ ).<sup>a</sup>

Parametar	Simbol	Vrijednost	RSD (%)
Vrijeme zadržavanja (min)	$t_R$	12,01	0,10
Površina pika (mAU·s)	$A$	164,41	0,20
Čistoća pika	$P$	999,99	0,01
Simetrija pika	$A_s$	0,96	0,29
Kapacitet za pikove	$P_c$	356,03	-

<sup>a</sup> Kriteriji prihvatljivosti: Čistoća pika > 999,0, Simetrija – između 0,8 i 1,8.  
RSD – relativno standardno odstupanje

#### 4.2. Validacija stabilitetno-indikativne metode za određivanje etrasimoda

Stabilitetno-indikativna metoda uspješno je validirana za određivanje etrasimoda u skladu sa smjernicama ICH Q2(R2) (60) za parametre: linearnost, LOD i LOQ, preciznost, točnost i stabilnost standardne otopine.

Linearnost metode definira se kao sposobnost analitičke metode da unutar određenog radnog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji djelatne tvari u ispitivanom uzorku. U ovom istraživanju, procjena linearnog odaziva detektora provedena je mjerenjem pet radnih otopina standarda etrasimoda u koncentracijskom rasponu 2–10 µg/mL (**tablica 5**). Svaka radna otopina standarda etrasimoda pripravljena je u triplikatu, a validacija analitičke metode potvrđena je statističkom analizom dobivene regresijske krivulje. Visoka vrijednost

koeficijenta korelacije ( $r = 0,9998$ ) ukazuje na zadovoljavajuću linearnost metode u navedenom rasponu koncentracija.

**Tablica 5.** Rezultati validacije stabilitetno-idikativne metode za određivanje etrasimoda

Parametar validacije	Vrijednost
<i>Linearnost</i>	
Raspon ( $\mu\text{g/mL}$ )	2–10
Jednadžba	$y = 28,031x - 4,8094$
Standardna pogreška nagiba	0,26
Standardna pogreška odsječka	1,74
Koeficijent korelacije ( $r$ )	0,9998
Regresijska suma kvadrata	31445
Rezidualna suma kvadrata	8,25
Ukupno suma kvadrata	31453
<i>Osjetljivost</i>	
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,10
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,34
<i>Preciznost</i>	
Ponovljivost ( $n = 6$ ; RSD, %)	0,26
Međupreciznost ( $n = 9$ ; RSD, %)	0,39
<i>Točnost</i>	
Niska koncentracijska razina (2 $\mu\text{g/mL}$ ) ( $n = 3$ ; srednji analitički prinos, % /RSD, %)	102,0 / 0,26
Srednja koncentracijska razina (6 $\mu\text{g/mL}$ ) ( $n = 3$ ; srednji analitički prinos, % /RSD, %)	100,5 / 0,28

Visoka koncentracijska razina (10 µg/mL)

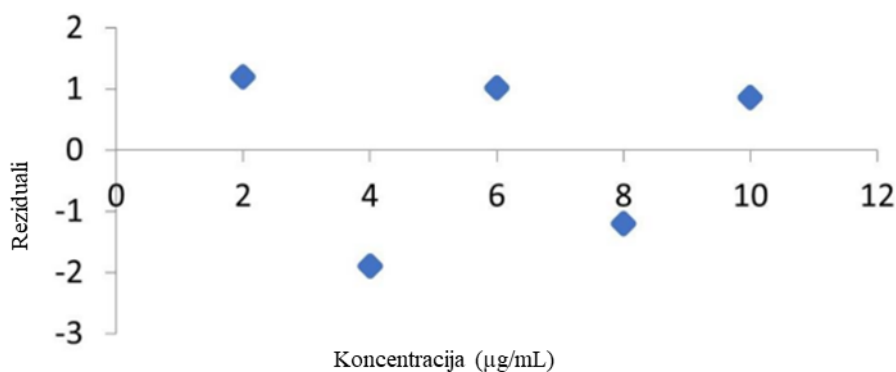
100,3 / 0,09

( $n = 3$ ; srednji analitički prinos, % /RSD, %)

LOD – granica dokazivanja, LOQ – granica određivanja, RSD – relativno standardno odstupanje

Odsječak kalibracijskog pravca iznosi -4,8094 sa standardnom pogreškom 1,74, što pokazuje da je vrijednost odsječka mala u odnosu na raspon mjerenih signala i ne utječe značajno na linearnost metode. Kalibracijski pravac ima nagib od 28,03 sa standardnom pogreškom 0,26, što pokazuje da je nagib statistički vrlo značajan uz dobru osjetljivost metode. Regresijska suma kvadrata iznosi 31 445 te je daleko veća od rezidualne sume kvadrata 8,25. Iz toga proizlazi da linearni model vrlo dobro opisuje podatke. Uz navedeno, regresijski pravac etrasimoda objašnjava gotovo cjelokupnu varijabilnost izmjerenih podataka i odgovara stvarnim podacima, dok je udio pogreške (reziduala) zanemariv.

Nadalje, povratno su izračunate koncentracije svake radne otopine standarda etrasimoda te je utvrđeno da su unutar  $\pm 2,1$  % od nominalne koncentracije na svim ispitivanim koncentracijskim razinama. Također, provedena je i analiza reziduala prikazana na **slici 5** reziduali su nasumično raspoređeni oko nule u grafičkom prikazu što pokazuje da su pogreške imale konstantnu varijancu i da je svaka pogreška bila neovisna o svim drugim pogreškama.



**Slika 5.** Graf reziduala u funkciji nominalne koncentracije etrasimoda

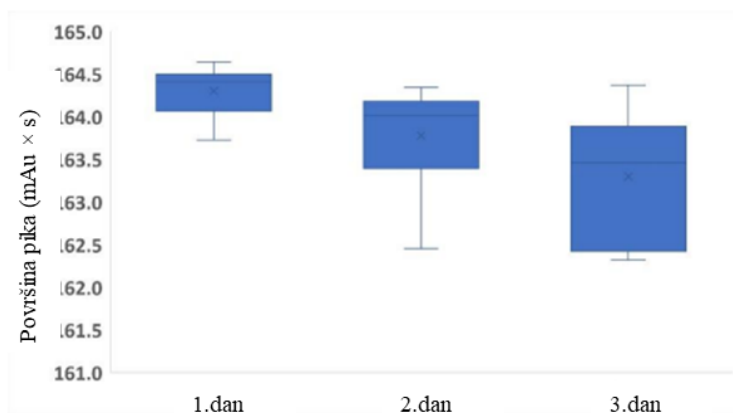
LOD i LOQ vrijednosti za etrasimod izračunate su u skladu sa smjernicama ICH Q2(R2) (60). Dobivene vrijednosti iznosile su 0,10 µg/mL (LOD) i 0,34 µg/mL (LOQ). Dobivene vrijednosti potvrđuju dovoljnu osjetljivost metode za pouzdano kvantitativno određivanje etrasimoda u ispitivanom rasponu koncentracija 2–10 µg/mL (**tablica 5**).

Preciznost analitičke metode definira se kao stupanj podudarnosti rezultata dobivenih nizom ponovljenih mjerenja istog homogenog uzorka, provedenih pod istim uvjetima ispitivanja. U ovom radu procjena preciznosti obuhvatila je ponovljivost i međupreciznost.

Ponovljivost metode ispitana je je analizom radnih otopina standarda etrasimoda koncentracije 6  $\mu\text{g/mL}$  pripremljenih i analiziranih u šesteroplikatu tijekom jednog dana. Rezultati je iskazan kao RSD vrijednost izmjerene koncentracije analita, a dobivena vrijednost iznosila je 0,26 % što je ispod zadane vrijednosti validacijskog kriterija od 2 %.

Međupreciznost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda etrasimoda koncentracije 6  $\mu\text{g/mL}$  tijekom drugog i trećeg dana ispitivanja. Otopine su pripremljene i analizirane u šesteroplikatu. Dobivena RSD vrijednost iznosila je 0,39 %. Izmjerene vrijednosti bile su unutar zadane vrijednosti kriterija prihvatljivosti ( $\text{RSD} < 2 \%$ ), čime se potvrđuje međupreciznost analitičkog postupka (**tablica 5**).

Na **slici 6** prikazana je distribucija prikupljenih podataka Box-and-whiskerovim dijagramom. Box-and-whisker dijagram prikazuje raspodjelu vrijednosti površine pika kroz tri dana, što omogućuje procjenu preciznosti metode. Dijagram pokazuje da metoda ima zadovoljavajuću međudnevnu preciznost, uz nešto veću varijabilnost trećega dana.



**Slika 6.** Box-and-whisker dijagram podataka preciznosti. Prosječna vrijednost je označena kao križić, središnja linija predstavlja medijan, a veliki kvadrat označava interkvartilni raspon (od 1. do 3. kvartila). Gornje i donje linije odgovaraju najvišim i najnižim vrijednostima.

Točnost analitičke metode definira se kao stupanj podudarnosti između srednje vrijednosti eksperimentalno izmjerenih rezultata i stvarnih, odnosno prihvaćenih referentnih vrijednosti. U

ovom istraživanju, točnost razvijene stabilitetno-indikativne metode procijenjena je ispitivanjem analitičkog prinosa. Ispitivanje je provedeno na tri koncentracijske razine: 2 µg/mL (nisko područje), 6 µg/mL (srednje područje) i 10 µg/mL (visoko područje). Svaka razina analizirana je u triplikatu kako bi se osigurala reprezentativnost mjerenja. Prinos je određen kao omjer eksperimentalno dobivene koncentracije, izračunate iz regresijske jednadžbe kalibracijske krivulje, i nominalne koncentracije. Analitički prinosi u rasponu od 100,3 do 102,0 % s RSD vrijednostima nižim od 0,28 % pokazuju zadovoljavajuću točnost metode.

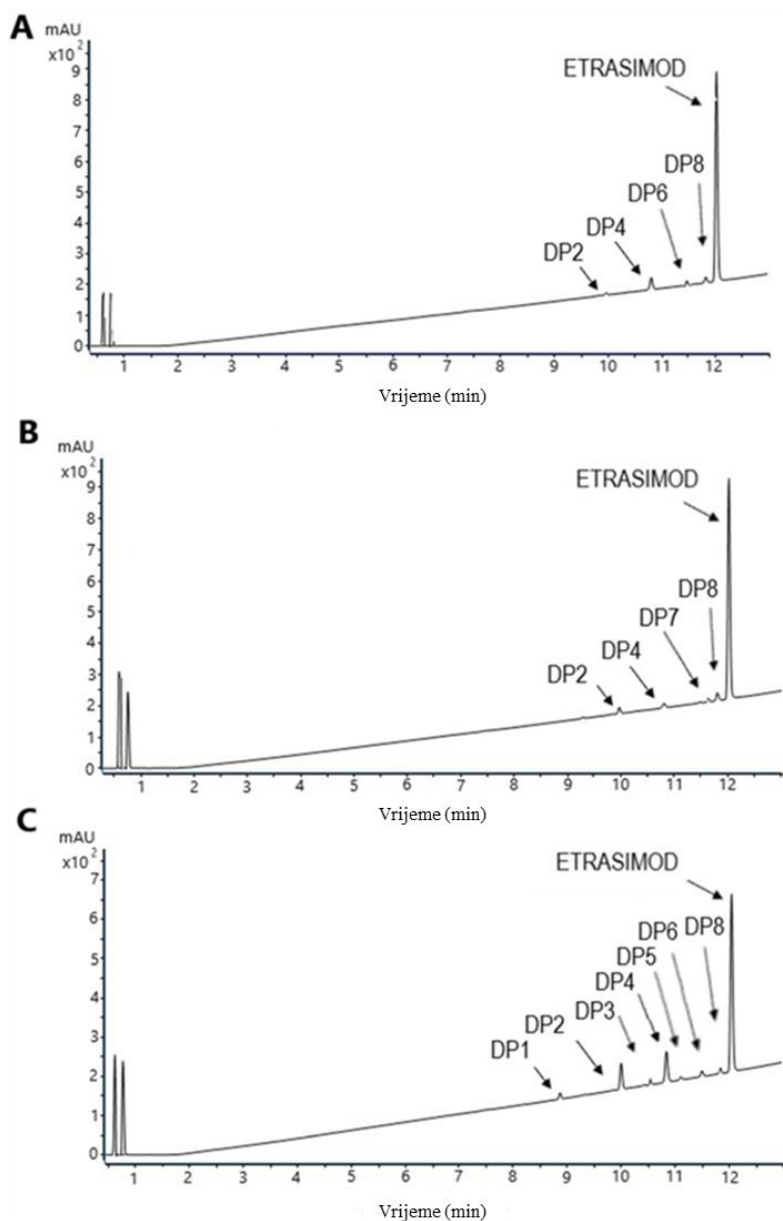
Ispitivanje stabilnosti otopina provedeno je korištenjem radnih otopina standarda etrasimoda koncentracije 6 µg/mL. Ispitana je stabilnost na sobnoj temperaturi tijekom razdoblja od 4 sata čime su simulirani uvjeti kratkoročnog izlaganja u laboratoriju ili tijekom pripreme uzoraka, zatim u autosampleru HPLC uređaja (4 °C) tijekom 8 sati. Također, radna otopina standarda etrasimoda pohranjena je u zamrzivaču (-20 °C) tijekom 7 dana radi procjene dugoročne stabilnosti pri niskim temperaturama. Uzorci za ispitivanje stabilnosti uspoređeni su sa svježe pripremljenim uzorcima. Svi uzorci analizirani su u triplikatu, a rezultati su izraženi kao analitički povrat u odnosu na početnu vrijednost. Dobiveni analitički povrati u rasponu od 100,1 do 101,2 % pri čemu vrijednosti bliske 100 % upućuju na odsutnost značajnih razgradnih procesa tijekom ispitivanog vremenskog okvira. Ovi rezultati potvrđuju da su radne otopine standarda etrasimoda stabilne pri svim ispitivanim uvjetima skladištenja.

#### 4.3. Studija prisilne razgradnje etrasimoda

Studija prisilne razgradnje provedena je kako bi se definirala kemijska stabilnost etrasimoda pri različitim uvjetima stresa. Provedeno je prema ICH smjernicama (Q1A(R2) i Q1B) (58, 59). Primarni uvjeti stresa koje smo odabrali bili su 0,01 M HCl, 0,1 M HCl, 1 M HCl, 0,01 M NaOH, 0,1 M NaOH, 1 M NaOH, 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, svjetlo i temperatura od 60 °C.

Studija prisilne razgradnje etrasimoda provodila se s ciljem postizanja stupnja razgradnje u rasponu od približno 10–20 % ili najdulje tijekom razdoblja od 10 dana. Takav stupanj razgradnje smatrao se prikladnim jer je omogućio nastanak relevantnih produkata razgradnje uz istodobno izbjegavanje pretjerane razgradnje i nastajanja sekundarnih produkata. Za određivanje koncentracije etrasimoda u uzorcima prisilne razgradnje korištena je ranije opisana stabilitetno-indikativna metoda etrasimoda (*poglavlje 3.2.1.*).

Na **slici 7** prikazani su kromatogrami uzoraka prisilne razgradnje etrasimoda pri kiselim, oksidativnim i fotolitičkim uvjetima stresa. Ukupno je nastalo osam novih produkata razgradnje, koji su po prvi puta opisani u literaturi. Po četiri ih je nastalo pri kiselim i oksidativnim uvjetima stresa dok je pri fotolitičkim uvjetima stresa nastalo ukupno sedam produkata razgradnje.



**Slika 7.** Kromatogrami etrasimoda pri kiselim (A), oksidativnim (B) i fotolitičkim uvjetima stresa (C)

Relativna vremena zadržavanja svih produkata razgradnje su u rasponu 0,73–0,99 te su manja od 1,0, što ukazuje na manju hidrofobnost produkata razgradnje u odnosu na etrasimod. Prema

rastućem vremenu zadržavanja, produkti razgradnje označeni su od DP1 do DP8 (**tablice 6 i 7**).

**Tablica 6.** Rezultati prisilne razgradnje etrasimoda

Uvjeti stresa	Temperatura/vrijeme	Razgradnja etrasimoda (%)	Zapažanje
Bazična hidroliza (1 M NaOH)	sobna temperatura/7dana; 60 °C/7 dana	–	Bez razgradnje.
Kisela hidroliza (0,01 M HCl)	sobna temperatura/5 h	10,46	Nastanak produkata razgradnje: DP2, DP4, DP6, DP8
Oksidacija 33 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	sobna temperatura/5 h	10,12	Nastanak produkata razgradnje: DP2, DP4, DP7, DP8
Termička razgradnja	60 °C/7 dana	-	Bez razgradnje.
Fotolitička razgradnja	Sobna temperatura/ 5 h	10,32	Nastanak produkata razgradnje: DP1, DP2, DP3, DP4, DP6, DP8

DP1 – produkt razgradnje 1, DP2 – produkt razgradnje 2, DP3 – produkt razgradnje 3, DP4 – produkt razgradnje 4, DP5 – produkt razgradnje 5, DP6 – produkt razgradnje 6, DP7 – produkt razgradnje 7, DP8 – produkt razgradnje 8.

**Tablica 7.** Kromatografski i masenospektrometrijski podaci etrasimoda i njegovih produkata razgradnje dobivenih studijom prisilne razgradnje

Analit	Vrijeme zadržavanja (min)	Relativno vrijeme zadržavanja (RRT)	Faktor zadržavanja ( <i>k</i> )	Glavni pik ( <i>m/z</i> )	Glavni fragmenti ( <i>m/z</i> )
Etrasimod	12,01	0,0	14,49	458	430, 398, 389, 231, 227, 203, 186, 171, 159, 144
DP1	8,80	0,73	10,35	288	310, 272, 149
DP2	10,02	0,83	11,93	490	528, 512, 472, 458, 412, 227, 159
DP3	10,47	0,87	12,51	508	556, 522, 490, 472, 458, 428, 412, 338, 316, 280, 227, 159, 149
DP4	10,86	0,90	13,01	490	528, 512, 472, 458, 402, 338, 227, 159, 149
DP5	11,24	0,94	13,59	428	338, 284
DP6	11,50	0,96	13,83	504	556, 526, 458, 430, 338, 284, 149

DP7	11,62	0,97	14,00	561	583, 531, 458, 430, 338, 272, 149
DP8	11,89	0,99	14,34	326	364, 338, 284, 257, 149

DP1 – produkt razgradnje 1, DP2 – produkt razgradnje 2, DP3 – produkt razgradnje 3, DP4 – produkt razgradnje 4, DP5 – produkt razgradnje 5, DP6 – produkt razgradnje 6, DP7 – produkt razgradnje 7, DP8 – produkt razgradnje 8.

Sedam od osam produkata razgradnje s relativnim vremenima zadržavanja 0,73, 0,83, 0,87, 0,90, 0,94, 0,96 i 0,99 (DP1 - DP6 i DP8) nastali su fotolitičkom razgradnjom unutar 5 sati (**slika 10C**).

Razgradnja etrasimoda u kiselim uvjetima dosegla je 10 % tijekom 5 sati pri čemu su nastala četiri produkta razgradnje označena kao DP2, DP4, DP6 i DP8 (**slika 10A**).

Brzina razgradnje pri oksidativnim uvjetima bila je sporija u usporedbi s hidrolizom u kiselom. Na kromatogramu prikazanom na **slici 10B** može se vidjeti da je oksidativna razgradnja dovela do nastanka četiri produkta razgradnje označena kao DP2, DP4, DP7 i DP8.

DP2, DP4 i DP8 nastali su tijekom kisele hidrolize, fotolitičke i oksidativne razgradnje, dok je DP7 zabilježen isključivo pri oksidativnim uvjetima stresa. Razgradnja etrasimoda u bazičnim uvjetima uz primjenu 1 M NaOH tijekom sedam dana nije bila značajna. Također, bazični uvjeti nisu uzrokovali razgradnju etrasimoda ni pri povišenoj temperaturi od 60 °C. Značajna razgradnja nije primijećena ni tijekom termičkih uvjeta stresa nakon sedmodnevnog izlaganja, što ukazuje na visoku stabilnost etrasimoda pri povišenim temperaturama.

Kako bi se ispitala selektivnost metode, provedena je spektralna analiza čistoće pika korištenjem detektora s nizom dioda. Čistoća pika etrasimoda u svim uzorcima prisilne razgradnje bila je veća od 999. Studija prisilne razgradnje etrasimoda dokazala je da je razvijena metoda stabilitetno-indikativna i sposobna je razdvojiti produkte razgradnje koji se eluiraju u blizini (razlučivanje između susjednih pikova bilo je veće od 1,5 u svim uzorcima prisilne razgradnje).

Nadalje, procijenjena je kinetika razgradnje etrasimoda s ciljem utvrđivanja roka valjanosti te određivanja optimalnih uvjeta skladištenja djelatne tvari i gotovih farmaceutskih oblika. Kako bi se ispitala kinetika razgradnje etrasimoda, uzorci su prikupljeni u unaprijed definiranim vremenskim intervalima (podaci prikupljeni u šest vremenskih točaka: 0, 1, 2, 3, 4 i 5 sati).

Kinetika, odnosno red reakcije razgradnje etrasimoda određena je prema jednadžbama u **tablici 8**. Izračunate su regresijske jednadžbe, dobiveni su koeficijenti korelacije ( $r$ ), a najbolje prilagođeni model ukazao je na red reakcije.

**Tablica 8.** Redovi reakcije razgradnje

Red reakcije razgradnje	Jednadžba brzine razgradnje
Nulti-red	$R = \frac{-d[A]}{dt} = k_0$
Prvi-red	$R = \frac{-d[A]}{dt} = kA$
Drugi-red	$d[A] = \frac{-kA^2}{dt^2}$

Rezultati su pokazali da studija prisilne razgradnje etrasimoda odgovara kinetici prvog reda jer je brzina razgradnje u svim uvjetima stresa bila proporcionalna smanjenju početne koncentracije lijeka u funkciji vremena (**tablica 8**). Najveći koeficijent brzine razgradnje ( $k$ ) postignut je za razgradnju u kiselom ( $k = 0,022 \text{ h}^{-1}$ ) (**tablica 9**), što ukazuje na najbržu razgradnju etrasimoda u kiselom okruženju.

**Tablica 9.** Rezultati kinetike prisilne razgradnje etrasimoda

Uvjeti stresa	Konstanta brzine reakcije ( $k$ ), 1/h	Koeficijent korelacije ( $r$ )
Bazična hidroliza (1 M NaOH)	–	–
Kisela hidroliza (0,01 M HCl)	0,0220	0,987
Oksidacija 33 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0047	0,990
Termička razgradnja	-	-
Fotolitička razgradnja	0,0161	0,950

#### 4.4. Masena spektrometrija etrasimoda i produkata razgradnje

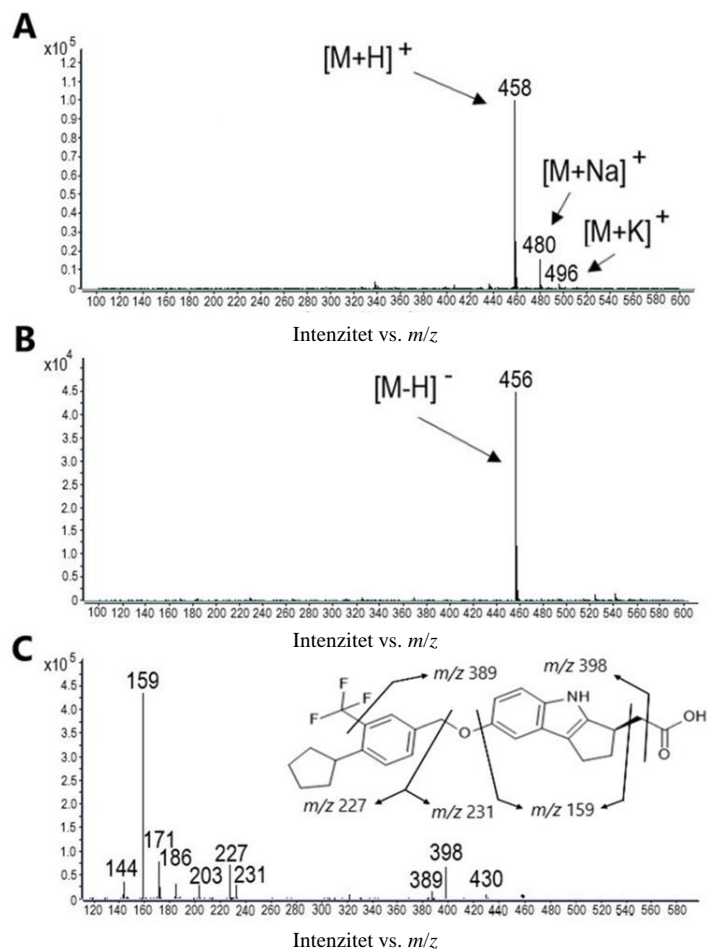
Nastanak produkata razgradnje etrasimoda utvrđen je pojavom novih pikova na DAD kromatogramima, dok je njihova identifikacija provedena analizom masenih spektara. Fragmentacijski put etrasimoda određen je na temelju MS/MS spektra. Sve analize provedene su primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metode opisane u *Poglavlju 3.2.1.*

Optimizacija detekcije etrasimoda primjenom QQQ masenog detektora započeta je odabirom optimalnih parametara ionizacije i fragmentacije za etrasimod. U tu svrhu ispitan je utjecaj

energije kolizije, kapilarnog napona i napona fragmentatora na intenzitet signala te stabilnost nastalih produkt iona (engl. *Product ion*).

Energija kolizije postupno je mijenjana u rasponu 10–80 V kako bi se postigla učinkovita fragmentacija prekursor iona etrasimoda uz nastajanje dovoljno intenzivnih i stabilnih produkt iona. Tijekom optimizacije uočeno je da niže vrijednosti energije kolizije rezultiraju nedovoljnom fragmentacijom, dok više vrijednosti dovode do prekomjerne fragmentacije i smanjenja intenziteta produkt iona. Najbolji odaziv etrasimoda postignut je pri energiji kolizije od 40 V i naponu fragmentatora od 135 V, uz kapilarni napon od 3500 V i ostale prethodno opisane uvjete rada sustava (*poglavlje 3.2.1.2.*).

Za početnu karakterizaciju, uzorak etrasimoda analiziran je snimanjem masenog spektra (engl. *Full scan*) u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije. Iako je negativni način ionizacije pokazao manji šum bazne linije, viši intenzitet signala postignut je u pozitivnom načinu ionizacije (**slika 8**). Pseudomolekulski ion etrasimoda koji odgovara protoniranoj molekuli  $[M+H]^+$  opažen je pri  $m/z$  458. Na istom spektru je zapažen i aduktor s ionom natrija  $[M+Na]^+$  pri  $m/z$  480 i kalija  $[M+K]^+$  pri  $m/z$  496.



**Slika 8.** MS i MS/MS spektar etrasimoda: pozitivni ESI-MS spektar (A), negativni ESI-MS spektar (B), ESI-MS/MS spektar  $[M+H]^+$  iona ( $m/z$  458) s predloženim fragmentacijskim putem (C).

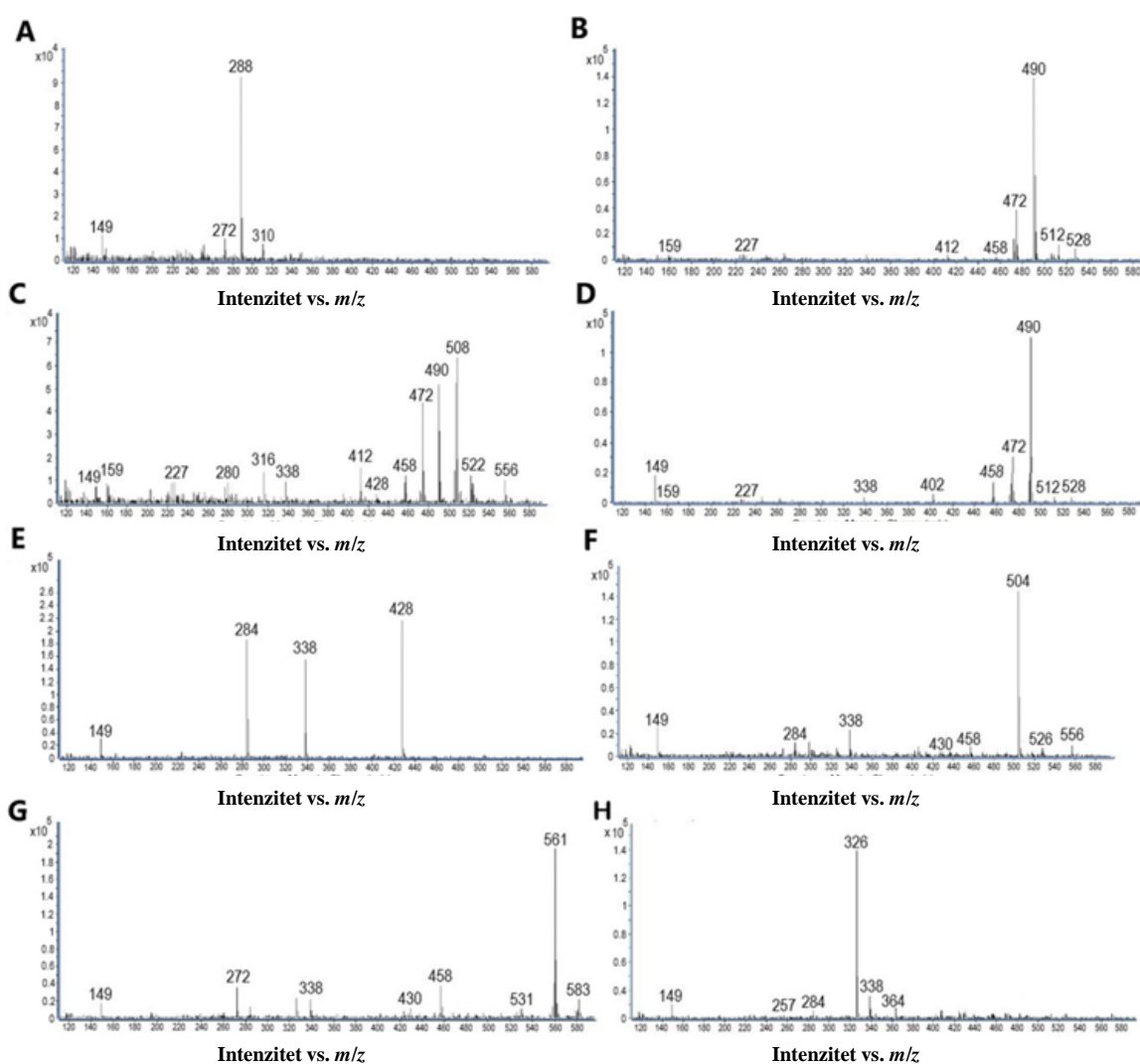
Nakon toga, snimljen je MS/MS spektar etrasimoda, odnosno tandemski spektrometrija masa (engl. *Tandem mass spectrometry*, MS/MS). MS/MS podrazumijeva kombinaciju više analizatora masa kako bi se ionizirane molekule odabrale, fragmentirale i analizirale. U našem slučaju pseudomolekulski ion etrasimoda  $m/z$  458 podvrgnuo se dodatnoj analizi kako bi se steklo sveobuhvatno znanje o fragmentacijskom putu etrasimoda.

ESI-MS/MS spektar etrasimoda prikazan je na **slici 9**. Fragmentacijski put etrasimoda pokazuje pucanje prekursor iona  $m/z$  458 na mnoge različite produkt ione ( $m/z$  430, 398, 389, 231, 227, 203, 186, 171, 159 i 144).

Jedan od najistaknutijih pikova ( $m/z$  398) nastao je McLafferty reorganizacijom koja se događa pored karboksilne skupine.

Produkt ion  $m/z$  389 nastao je iz prekursor iona gubitkom trifluorometilne skupine kroz cijepanje C–C veze. Heterolitičko cijepanje C–O veze između fenilnog prstena i središnjeg tricikličnog ciklopenta[b]indol prstena rezultiralo je generiranjem dva iona pri  $m/z$  227 i 231.

Za glavni pik pri  $m/z$  159 smatra se da odgovara središnjem tricikličnom prstenu koji nastaje uklanjanjem fragmenta 4-ciklopentil-3-(trifluorometil)fenil]metoksi, nakon čega slijedi neutralni gubitak 60 Da koji je zabilježen cijepanjem fragmenta  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ . Nakon procjene fragmentacijskog puta etrasimoda, MS/MS podaci su prikupljeni za svaki uzorak prisilne razgradnje etrasimoda. Na **slici 9** prikazani su spektri svih osam produkata razgradnje (DP1–DP8) nastalih izlaganjem etrasimoda različitim uvjetima stresa.



**Slika 9.** ESI-MS spektar produkata razgradnje: DP1 (A), DP2 (B), DP3 (C), DP4 (D), DP5 (E), DP6 (F), DP7 (G) i DP8 (H).

Nastajanje produkta razgradnje DP1 izazvano je fotolitičkom razgradnjom. MS spektar najhidrofilnijeg produkta razgradnje (RRT = 0,73) pokazao je pseudomolekulski ion  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  288 i aduktor s ionom natrija  $[M+Na]^+$  pri  $m/z$  310. Razlika mase od 170 Da u odnosu na pseudomolekulski ion etrasimoda odgovara značajnoj razgradnji molekule etrasimoda. MSTools simulator korišten je za prijedlog molekulske formule za DP1. Program je otkrio da DP1 može nastati gubitkom  $-CH_2COOH$  i  $-CF_3$  skupina s molekulskom formulom  $C_{20}H_{17}NO$ .

MS spektri produkata razgradnje DP2 (RRT = 0,83) i DP4 (RRT = 0,90) pokazuju pseudomolekulski ion  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  490 s aduktor ionima natrija  $[M+Na]^+$  i kalija  $[M+K]^+$  pri  $m/z$  512 i 528. Oba MS spektra s razlikom masa od 32 Da u odnosu na pseudomolekulski ion etrasimoda pokazuju međusobnu sličnost. Međutim, intenziteti produkt iona su različiti što sugerira postojanje izomernih struktura za produkte razgradnje DP2 i DP4.

Nadalje, prisutnost kiralnog centra u etrasimodu omogućuje nastanak izomernih produkata razgradnje. Spektri oba produkta razgradnje pokazuju ion pri  $m/z$  472, što ukazuje na gubitak  $H_2O$  iz pseudomolekulskog iona  $[M+H-H_2O]^+$ . Također, ion koji odgovara pseudomolekulskom ionu etrasimoda pri  $m/z$  458 opažen je u njihovim spektrima. Iako su neki autori istraživali mogućnost razlučivanja izomera pomoću MS/MS na temelju „dijagnostičkih fragmenata“, ovi produkti razgradnje moraju se dodatno razlikovati korištenjem kiralnog kromatografskog sustava (104), tj. za enantiomernu separaciju etrasimoda i njegovih onečišćenja (3S), potrebno je koristiti kiralnu kromatografsku kolonu.

Fotolitičkom razgradnjom nastao je produkt razgradnje DP3. Analiza spektra ovog produkta razgradnje pokazala je osnovni pik pri  $m/z$  508 i druge istaknute ione pri  $m/z$  490 (nastao gubitkom  $H_2O$  od osnovnog pika) i 472 (nastao daljnjim gubitkom  $H_2O$ ). Ioni pri  $m/z$  458, 227 i 159, koji su slični onima nastalim za etrasimod, također su opaženi.

Naša istraživanja dodatno su potvrđena dostupnošću sintetizirane referentne nečistoće etrasimoda  $m/z$  490 ( $C_{26}H_{26}F_3NO_5$ ) koja odgovara razgradnom produktu DP3.

Također, fotolitičkom razgradnjom nastao je produkt razgradnje DP5 (RRT = 0,94), čiji maseni spektar pokazuje tri istaknuta pika ( $m/z$  428, 338 i 284). Osnovni pik DP5 pokazao je razliku masa od 30 Da u odnosu na pseudomolekulski ion etrasimoda  $m/z$  458, a MSTools simulator predložio je da je fotolitička razgradnja uzrokovala gubitak dva kisika i nastajanje produkta s molekulskom formulom  $C_{26}H_{28}ONF_3$ .

MS spektar produkta razgradnje DP6 (RRT = 0,96) pokazuje pseudomolekulski ion  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  504 s razlikom masa od 46 Da u odnosu na pseudomolekulski ion etrasimod  $m/z$  458. U spektru je opažen niskointenzivni aduktor ion natrija  $[M+Na]^+$  pri  $m/z$  526, kao i ioni pri  $m/z$  458 i 430, koji su slični onima nastalim za etrasimod.

Oksidativna razgradnja dovela je do nastanka produkta razgradnje DP7 (RRT = 0,97) s pseudomolekulskim ionom  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  561 i niskointenzivnim aduktor ionom natrija  $[M+Na]^+$  pri  $m/z$  583, kao i ione pri  $m/z$  458 i 430, koji su slični onima nastalim za etrasimod.

Produkt razgradnje DP8 (RRT = 0,99) nastao kiselom razgradnjom, oksidativnom i fotolitičkom razgradnjom pokazao je pseudomolekulski ion  $[M+H]^+$  pri  $m/z$  326 i niskointenzivni aduktor ion kalija  $[M+K]^+$  pri  $m/z$  364. Ion  $m/z$  257 nastao je iz pseudomolekulskog iona gubitkom trifluorometilne skupine (gubitak 69 Da) kroz cijepanje C–C veze.

#### 4.5. Razvoj i optimizacija stabilitetno-indikativne metode ritlecitiniba

Tijekom razvoja stabilitetno-indikativne metode za ritlecitinib ispitani su različiti kromatografski uvjeti uzimajući u obzir kemijsku strukturu i fizikalno-kemijska svojstva ritlecitiniba. Ritlecitinib je pirolpirimidin koji sadrži tri prstena, tri rotacijske veze i šest heteroatoma (jedan atom kisika i pet atoma dušika). Četiri od njih su akceptori, dok su dva donori vodikovih iona.

Ritlecitinib je bijela krutina netopiva u vodi. Prema podacima dobivenim korištenjem programa ALOGPS v2.1, njegova topljivost u vodi iznosi 0,46 mg/mL. Umjereno je lipofilan, s predviđenim  $\log P$  vrijednostima u rasponu od 1,27 (program ACD/Labs v9.0) do 1,95 (program Mcule v1.0). Ritlecitinib je poliprotini spoj s disocijacijskim konstantama ( $pK_a$ ) u rasponu od 6,6 do 13,6.

Cilj ovog dijela istraživanja bio je postići kromatografsko razdvajanje ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje, kao i kvantifikaciju ritlecitiniba u uzorcima podvrgnutim studiji prisilne razgradnje. Od svih ispitanih kolona obrnutom fazom, najbolje razdvajanje ritlecitiniba i produkata razgradnje postignuto je korištenjem Core-Shell tehnologije s kromatografskom kolonom punjenom česticama manjih veličina (3.0 mm × 100 mm × 2.6  $\mu$ m). C18 kolona pokazala je veće hidrofobno vrijeme zadržavanja, pogodno za ritlecitinib i njegove nepolarne produkte razgradnje, u usporedbi s C8 kolonom. C18 kolone prethodno su koristili Bauman i

suradnici (101) za profiliranje metabolita ritlecitiniba kao i Kumar i suradnici (102) za određivanje ritlecitiniba u plazmi štakora.

Nakon odabira stacionarne faze, optimiziran je sastav mobilne faze kako bi se postiglo željeno vrijeme zadržavanja ritlecitiniba i selektivnost kromatografske analize. Modifikatori mobilne faze uzrokovali su različite viskoznosti mobilnih faza i UV granice apsorpcije, što se također uzelo u obzir pri odabiru sustava mobilnih faza. Budući da su hlapljivost i sposobnost otapala da donira proton ključni faktori elektronsprejnoj ionizaciji (ESI), ovi su parametri dodatno proučeni prilikom odabira mobilnih faza. Prelimenarni testovi pokazali su da je primjena acetonitrila, u usporedbi s metanolom i etanolom, rezultirala oštrim i dobro odvojenim kromatografskih pikovima ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje.

Ispitani su različiti modifikatori mobilne faze pokrivajući pH vrijednosti od kiselih do neutralnih. Niže pH vrijednosti omogućile su bolju separaciju i poboljšanu rezoluciju kromatografskih pikova. Uočili smo da je osjetljivost detekcije ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje poboljšana uporabom mravlje kiseline (pKa 3,75) kao modifikatora mobilne faze za HPLC-DAD-QQQ-MS/MS analizu. Ovi optimirani parametri su u skladu s analitičkim metodama koje su prethodno razvili Bauman i suradnici te Kumar i suradnici (103,104).

Analizom uzoraka prisilne razgradnje ritlecitiniba uočeno je da su manje polarni produkti razgradnje pri nižem udjelu vodene faze pokazivali odgovarajuće zadržavanje na koloni (tj. nisu eluirali prebrzo), dok su polarni produkti razgradnje optimalno zadržavanje postizali pri nižem udjelu organske faze. Stoga, korišten je gradijentni sustav kako bi se povećala elucijska snaga i postiglo optimalno razdvajanje svih komponenti.

Kromatogrami ritlecitiniba snimani su na valnoj duljini od 280 nm, dok je spektar praćen u rasponu od 200 do 400 nm.

Primjenom optimiziranih kromatografskih uvjeta određeni su parametri prikladnosti sustava. Parametri prikladnosti sustava za predloženu metodu utvrđeni su na ciljnoj koncentraciji ritlecitiniba (10 µg/mL). Predložena analitička metoda zadovoljava ICH i USP standarde (60,106) za prikladnost sustava. Vrijeme zadržavanja ritlecitiniba iznosilo je 3,77 minuta, uz ukupno vrijeme analize od 13 minuta, čineći metodu vremenski i ekonomski učinkovitim. Eksperimentalno dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 10**, a svi ispitani parametri

udovoljavaju prihvatljivim kriterijima u skladu s važećim ICH Q2(R2) (60) i USP smjericama (106).

**Tablica 10.** Parametri prikladnosti sustava za novo razvijenu stabilitetno-indikativnu metodu ritlecitiniba (koncentracija 10 µg/mL;  $n = 6$ ).<sup>a</sup>

Parametar	Simbol	Vrijednost	RSD (%)
Vrijeme zadržavanja (min)	$t_R$	3,77	0,02
Površina pika (mAU·s)	$A$	68,90	0,97
Čistoća pika	$P$	999,80	0,20
Simetrija	$A_s$	1,00	0,78
Kapacitet pika	$P_c$	280,04	/

<sup>a</sup> Kriteriji prihvatljivosti: Čistoća pika > 999,0, Simetrija – između 0.8 i 1.8

RSD – relativno standardno odstupanje

#### 4.6. Validacija stabilitetno-indikativne metode ritlecitiniba

Prema ICH Q2(R2) (60) smjericama, validirana je novorazvijena stabilitetno-indikativna metoda ispitivanjem parametara, uključujući linearnost, osjetljivost, preciznost, točnost i stabilnost standardne otopine.

Za izradu kalibracijske krivulje korištene su radne otopine standarda ritlecitiniba u rasponu koncentracija od 2 do 100 µg/mL. Rezultati regresijske analize prikazani su u **tablici 11**. Koeficijent korelacije ( $r$ ) iznosio je 0,999, što ukazuje na zadovoljavajuću linearnost metode u navedenom rasponu koncentracija.

**Tablica 11.** Rezultati validacije stabilitetno-indikativne metode za određivanje ritlecitiniba

Validacijski parametar	Vrijednost
<i>Linearnost</i>	
Raspon ( $\mu\text{g/mL}$ )	2–100
Jednadžba pravca	$y = 18,31x - 6,59$
Standardna pogreška nagiba	0,02
Standardna pogreška odsječka	0,94
Koeficijent korelacije ( $r$ )	0,999
Regresijska suma kvadrata	3 439 121
Rezidualna suma kvadrata	30,06
Ukupna suma kvadrata	3 439 151
<i>Osjetljivost</i>	
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,04
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,14
<i>Preciznost</i>	
Ponovljivost ( $n = 6$ ; RSD, %)	0,12
Međupreciznost ( $n = 18$ ; RSD, %)	0,15
<i>Točnost</i>	
Niska koncentracijska razina (2 $\mu\text{g/mL}$ ) ( $n = 3$ ; srednji analitički prinos, %/RSD, %)	100,3 / 0,3
Srednja koncentracijska razina (10 $\mu\text{g/mL}$ ) ( $n = 3$ ; srednji analitički prinos, %/RSD, %)	99,9 / 0,7
Visoka koncentracijska razina (100 $\mu\text{g/mL}$ ) ( $n = 3$ ; srednji analitički prinos, %/RSD, %)	100,3 / 0,7

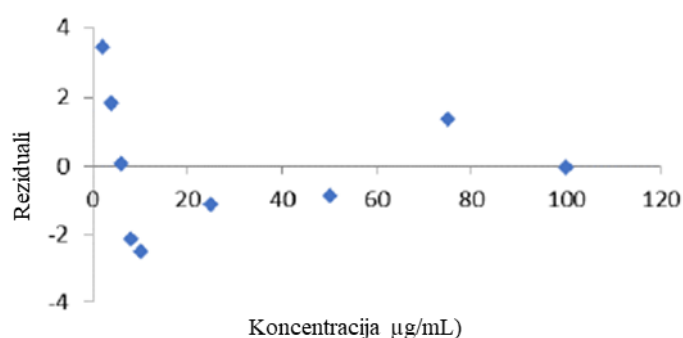
LOD – granica dokazivanja, LOQ – granica određivanja, RSD – relativno standardno odstupanje

Odsječak kalibracijskog pravca iznosi -6,59 uz standardnu pogrešku 0,94, što ukazuje na to da je njegova vrijednost mala u odnosu na ukupni raspon izmjerenih signala te stoga nema značajan utjecaj na linearnost metode. Nagib kalibracijskog pravca iznosi 18,31 sa standardnom pogreškom 0,02, što upućuje na visoku statističku značajnost nagiba i dobru osjetljivost metode na promjene koncentracije analita.

Regresijska suma kvadrata iznosi 3 439 121 i znatno je veća od rezidualne sume kvadrata koja iznosi 30,06, što pokazuje da većina varijabilnosti izmjerenih podataka potječe od promjena koncentracije, a ne od slučajne pogreške. Takav odnos vrijednosti potvrđuje da linearni regresijski model vrlo dobro opisuje eksperimentalne podatke.

Iz toga slijedi da kalibracijski pravac ritlecitiniba pokazuje vrlo dobru podudarnost s eksperimentalnim rezultatima te objašnjava gotovo cjelokupnu varijabilnost dobivenih signala. Preostala varijabilnost pripisana rezidualima vrlo je mala, što dodatno potvrđuje pouzdanost i prikladnost primijenjene linearne metode za kvantitativno određivanje analita.

Također, povratno su izračunate koncentracije svake radne radne otopine standarda ritlecitiniba te je utvrđeno da su unutar  $\pm 2,24$  % od nominalne koncentracije na svim ispitivanim koncentracijskim razinama. Nadalje, provedena je analiza reziduala kako bi se procijenile pretpostavke linearnosti i homogenosti varijance (**slika 10**). Vizualnim pregledom grafikona reziduala u odnosu na predviđene vrijednosti utvrđeno je da su reziduali nasumično raspoređeni oko nule, bez prepoznatljivih obrazaca, što ukazuje da predloženi linearni model dobro aproksimira eksperimentalne podatke.



**Slika 10.** Graf reziduala u funkciji nominalne koncentracije ritlecitiniba

Vrijednosti LOD i LOQ određene su eksperimentalno primjenom metode temeljene na omjeru signala i šuma (S/N). Utvrđene su vrijednosti 0,04 µg/mL (LOD) i 0,14 µg/mL (LOQ) što

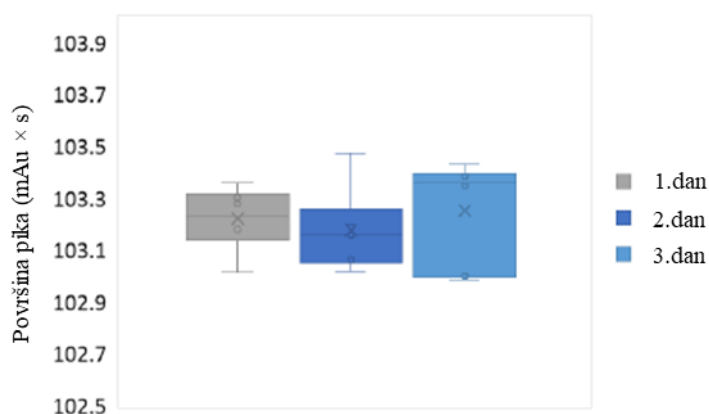
potvrđuje visoku osjetljivost metode za pouzdano kvantitativno određivanje etrasimoda u ispitivanom rasponu koncentracija 2–10 µg/mL. (**tablica 13**).

Preciznost analitičke metode definira se kao stupanj podudarnosti rezultata dobivenih nizom ponovljenih mjerenja istog homogenog uzorka, provedenih pod istim uvjetima ispitivanja. U ovom radu procjena preciznosti obuhvatila je ponovljivost i međupreciznost.

Ponovljivost metode ispitana je je analizom radnih otopina standarda ritlecitiniba koncentracije 10 µg/mL pripremljenih i analiziranih u šesteroplikatu tijekom jednog dana. Preciznost je iskazana kao RSD vrijednost izmjerene koncentracije analita, a dobivena vrijednost iznosila je 0,12 % što je ispod zadane vrijednosti validacijskog kriterija od 2 %.

Međupreciznost metode ispitana je analizom radnih otopina standarda ritlecitiniba koncentracije 10 µg/mL tijekom drugog i trećeg dana ispitivanja. Otopine su pripremljene i analizirane u šesteroplikatu. Dobivena vrijednost relativne standardne devijacije iznosila je 0,15 %. Izmjerene vrijednosti bile su unutar zadane vrijednosti kriterija prihvatljivosti (RSD < 2 %), čime se potvrđuje međupreciznost analitičkog postupka (**tablica 13**).

Na **slici 11** prikazan je Box-and-whisker dijagram koji prikazuje raspodjelu površine pika tijekom tri dana mjerenja, pri čemu su medijani i srednje vrijednosti vrlo slični, što upućuje na dobru ponovljivost metode. Treći dan pokazuje nešto veći raspon vrijednosti što ukazuje na nešto veću varijabilnost u odnosu na prvi i drugi dan.



**Slika 11.** Box-and-whisker dijagram podataka srednje preciznosti. Prosječna vrijednost je označena kao križić, središnja linija predstavlja medijan, a veliki kvadrat označava interkvartilni raspon (od 1. do 3. kvartila). Gornje i donje linije odgovaraju najvišim i najnižim vrijednostima.

Točnost analitičke metode definira se kao stupanj podudarnosti između srednje vrijednosti eksperimentalno izmjerenih rezultata i stvarnih, odnosno prihvaćenih referentnih vrijednosti. Određena je analizom radnih otopina standarda ritlecitiniba na trima koncentracijskim razinama (niska – 2 µg/mL, srednja – 10 µg/mL, visoka – 100 µg/mL), koje su pokrivale raspon linearnosti. Sve otopine su pripravljene i analizirane u triplicatu. Analitički prinos određen je kao omjer eksperimentalno dobivene koncentracije, izračunate iz regresijske jednadžbe kalibracijske krivulje, i nominalne koncentracije. Dobiveni su analitički prinosi u rasponu 99,9–100,3 % s RSD vrijednostima  $\leq 0,7$  % što pokazuje zadovoljavajuću točnost metode.

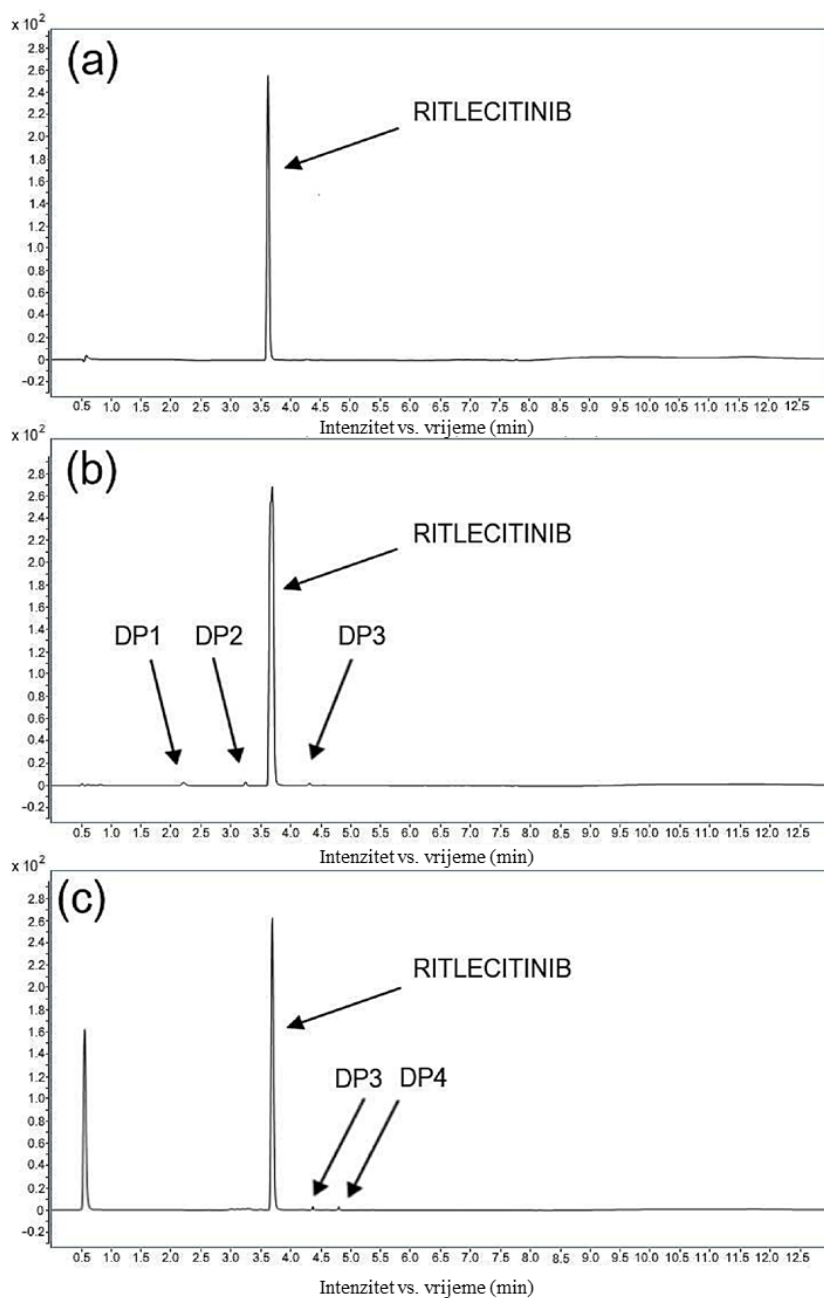
Ispitivanje stabilnosti otopina provedeno je korištenjem radnih otopina standarda ritlecitiniba koncentracije 10 µg/mL. Ispitana je stabilnost na sobnoj temperaturi tijekom razdoblja od 8 sata čime su simulirani uvjeti kratkoročnog izlaganja u laboratoriju ili tijekom pripreme uzoraka, zatim u autosampleru HPLC uređaja (4 °C) tijekom 72 sata. Također, radna otopina standarda ritlecitiniba pohranjena je u zamrzivaču (-20 °C) tijekom 7 dana radi procjene dugoročnije stabilnosti pri niskim temperaturama. Uzorci za ispitivanje stabilnosti uspoređeni su sa svježe pripremljenim uzorcima. Svi uzorci analizirani su u triplicatu, a rezultati su izraženi kao analitički prinos u odnosu na početnu vrijednost. Dobiveni analitički prinosi u rasponu 99,2–99,7 % pri čemu vrijednosti bliske 100 % upućuju na odsutnost značajnih procesa razgradnje tijekom ispitivanog vremenskog okvira. Ovi rezultati potvrđuju da su radne otopine standarda ritlecitiniba stabilne pri svim ispitivanim uvjetima skladištenja.

#### 4.7. Studija prisilne razgradnje ritlecitiniba

Studija prisilne razgradnje provedena je prema ICH smjernicama (Q1A(R2) i Q1B) (58,59) pri različitim uvjetima stresa uključujući kisele (0,01–1 M HCl), bazične (0,01–1 M NaOH), oksidativne (3–33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), fotolitičke (izlaganje dnevnom svjetlu) i termičke uvjete (zagrijavanje na 40 °C i 70 °C). Ključan aspekt dizajniranja eksperimenta bio je određivanje intenziteta i trajanja izloženosti za svaki uvjet. Dva su kriterija odabrana za određivanje kraja eksperimenta: razgradnja ritlecitiniba između 10–20 % i maksimalno trajanje ispitivanja do 10 dana. Za određivanje koncentracije ritlecitiniba u uzorcima prisilne razgradnje korištena je ranije opisana stabilitetno-indikativna metoda ritlecitiniba (*Poglavlje 3.2.2.*).

Kromatogrami prisilne razgradnje ritlecitiniba pri različitim uvjetima stresa prikazani su na **slici 12**. Pri primijenjenim uvjetima stresa identificirana su četiri nova produkta razgradnje koji su po prvi puta opisani u literaturi.

Analiza svih uzoraka prisilne razgradnje pokazala je da vrijeme zadržavanja ritlecitiniba nije bilo promijenjeno u usporedbi s kontrolnom otopinom standarda ritlecitiniba ( $t_R(\text{prosjeck}) = 3,74$  min; RSD = 1,1 %). Čistoća pika ritlecitiniba u svim uzorcima bila je iznad 999,1, dok je razlučivost između ritlecitiniba i produkata razgradnje bila veća od 6,5. To potvrđuje da je koncentracija ritlecitiniba u uzorcima prisilne razgradnje pouzdano kvantificirana te da su produkti razgradnje uspješno razdvojeni, što ukazuje na visoku specifičnost i stabilitetno-indikativnu moć razvijene metode.



**Slika 12.** Reprezentativni LC kromatogrami uzoraka ritlecitiniba (100  $\mu\text{g/mL}$ ): (a) kontrolni uzorak, (b) bazična i (c) oksidativna razgradnja

Rezultati kisele, bazične, oksidativne, termičke i fotolitičke razgradnje ritlecitiniba prikazani su u **tablici 12**. Prema rastućem vremenu zadržavanja, produkti razgradnje označeni su kao DP1 do DP4 (**tablica 13**). Relativna vremena zadržavanja svih produkata razgradnje su u rasponu 0,59–1,29. Relativna vremena zadržavanja produkata razgradnje DP1 i DP2 su manja od 1,0, što ukazuje na manju hidrofobnost produkta razgradnje u odnosu na ritlecitinib, dok su relativna vremena zadržavanja produkata razgradnje DP3 i DP4 veća od 1,0 što ukazuje na veću hidrofobnost u odnosu na ritlecitinib.

**Tablica 12.** Rezultati prisilne razgradnje ritlecitiniba

Uvjeti stresa	Temperatura/vrijeme	Razgradnja ritlecitiniba (%)	Zapažanje
Bazična hidroliza (1 M NaOH)	sobna temperatura/72 h	12,60	Nastanak razgradnih produkata: DP1, DP2 i DP3.
Kisela hidroliza (1 M HCl)	70 °C/10 dana	-	Bez razgradnje.
Oksidacija (33 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	sobna temperatura/48 h	9,50	Nastanak razgradnih produkata: DP3 i DP4.
Termička razgradnja	70 °C/10 dana	-	Bez razgradnje.
Fotolitička razgradnja	Sobna temperatura/ 10 dana	-	Bez razgradnje.

**Tablica 13.** Kromatografski i masenospektrometrijski podaci ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje dobivenih studijom prisilne razgradnje

Analit	Uvjeti stresa	Vrijeme zadržavanja (min)	Relativno vrijeme zadržavanja (RRT)	Faktor zadržavanja ( <i>k</i> )	Glavni pik ( <i>m/z</i> )	Glavni fragmenti ( <i>m/z</i> )
Ritlecitinib	-	3,77	-	5,18	286	286, 215, 185, 173, 159, 152, 135, 119, 108
DP1	Bazična hidroliza	2,24	0,59	2,67	331	331, 274, 232, 224, 183, 140, 119
DP2	Bazična hidroliza	3,28	0,87	4,38	304	333, 304, 205, 183, 137, 119
DP3	Bazična hidroliza/ Oksidativna razgradnja	4,37	1,16	6,16	571	571, 286, 159, 152, 119
DP4	Oksidativna razgradnja	4,79	1,27	6,85	302	302, 286, 225, 152, 119

DP1 – produkt razgradnje 1, DP2 – produkt razgradnje 2, DP3 – produkt razgradnje 3, DP4 – produkt razgradnje 4.

Tijekom 72 sata, ritlecitinib se značajno razgradio bazičnom hidrolizom na sobnoj temperaturi. Primijenjeni uvjeti stresa doveli su do 12,6 % razgradnje ritlecitiniba uz nastanak tri produkta razgradnje označena kao DP1, DP2 i DP3. Relativna vremena zadržavanja (RRT) za DP1 i DP2 bila su manja od 1,0, što ukazuje na njihovu nižu hidrofobnost u odnosu na ritlecitinib, dok je RRT DP3 bio veći od 1,0, što ukazuje na višu hidrofobnost ovog razgradnog produkta.

Razgradnja ritlecitiniba pri oksidativnim uvjetima stresa, korištenjem 33%-tne otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, odvijala se brzo, pri čemu je unutar 48 sati došlo do 9,5 % razgradnje. Kromatogram oksidativne razgradnje pokazao je jasnu separaciju između ritlecitiniba i dva hidrofobnija razgradna produkta, DP3 i DP4.

Ispitivanje kisele razgradnje provedeno je u 1 M HCl tijekom 10 dana na sobnoj temperaturi i pri 70 °C. Rezultati su pokazali da je ritlecitinib stabilan u kiselim uvjetima stresa, s razgradnjom manjom od 1 %. Za provedbu termičke razgradnje, radna otopina standarda ritlecitiniba čuvana je 10 dana na 40 i 70 °C, ali nije došlo do značajne razgradnje (manje od 1 %). Fotolitička razgradnja rezultirala je razgradnjom ritlecitiniba od 1 % bez stvaranja produkata razgradnje.

Rezultati su pokazali da dolazi do razgradnje ritlecitiniba pri bazičnim i oksidativnim uvjetima stresa, dok je stabilan pri kiselim, termičkim i fotolitičkim uvjetim stresa. Ovi podaci su ključni za optimizaciju sinteze, razvoj formulacije i način skladištenja farmaceutskih proizvoda. Rano rješavanje izazova povezanih sa stabilnošću može osigurati proizvodnju visokokvalitetnih formulacija ritlecitiniba s inovativnim pomoćnim tvarima.

Nakon studije prisilne razgradnje, procijenjena je kinetika bazične i oksidativne razgradnje ritlecitiniba. Uzorci su prikupljeni u unaprijed određenim vremenskim intervalima (do 30 dana ili dok nije postignuta 50 %-tna razgradnja ritlecitiniba). Različiti modeli kinetike analizirani su kako bi se ispitala brzina procesa razgradnje. Red reakcije određen je iz grafičkog prikaza koncentracije lijeka (nulti red), logaritma koncentracije (prvi red) i recipročnog iznosa koncentracije (drugi red) u odnosu na vrijeme. Red brzine reakcije određen je prema jednadžbama u **tablici 14**. Izračunate su regresijske jednadžbe, dobiveni su koeficijenti korelacije ( $r$ ), a najbolje prilagođeni model ukazao je na red reakcije.

Za bazičnu razgradnju, koeficijenti korelacije bili su  $r = 0,983$  (nulti red),  $r = 0,989$  (prvi red) i  $r = 0,994$  (drugi red). Na temelju toga, zaključeno je da bazična razgradnja ritlecitiniba pripada kinetici drugog reda, što znači da ovisi o koncentraciji lijeka i stresora.

Kod oksidativne razgradnje, kinetika nultog reda imala je najviši koeficijent korelacije ( $r = 0,999$ ) u odnosu na prvi ( $r = 0,997$ ) i drugi red ( $r = 0,993$ ). To sugerira da oksidativna razgradnja ritlecitiniba pripada kinetici nultog reda, što znači da nije ovisna o koncentraciji lijeka i stresora.

Kinetika, odnosno red reakcije razgradnje ritlecitiniba, vrijeme poluraspada ( $t_{50}$ ) i vrijeme potrebno da se koncentracija djelatne tvari smanji na 90 % ( $t_{90}$ ) određeni su prema jednadžbama

u **tablici 14**. Dobiveni rezultati prikazani u **tablici 15**, predstavljaju ključne parametre u kinetici razgradnje. Vrijednosti  $t_{50}$  i  $t_{90}$  bile su niže za oksidativnu razgradnju u usporedbi s bazičnom hidrolizom.

**Tablica 14.** Redovi reakcije razgradnje i jednadžbe za izračun kinetičkih parametara

Red reakcije razgradnje	Jednadžba brzine razgradnje	Jednadžba vremena potrebnog da se koncentracija djelatne tvari smanji na 50 %	Jednadžba vremena potrebnog da se koncentracija djelatne tvari smanji na 90 %
Nulti-red	$R = \frac{-d[A]}{dt} = k_0$	$t_{1/2} = [A]_0 / 2k$	$t_{0.9} = 0.1[A]_0 / k_0$
Prvi-red	$R = \frac{-d[A]}{dt} = kA$	$t_{1/2} = \ln(2) / k$	$t_{0.9} = 0.105 / k_1$
Drugi-red	$d[A] = \frac{-kA^2}{dt^2}$	$t_{1/2} = 1 / k[A]_0$	$t_{0.9} = (0.11 / k) [A]_0$

**Tablica 15.** Rezultati kinetike prisilne razgradnje ritlecitiniba i izračuna kinetičkih parametara

Uvjeti razgradnje	Trajanje studije kinetike	Red reakcije	Konstanta brzine reakcije ( $k$ , $\mu\text{gmL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	Vrijeme potrebno da se koncentracija djelatne tvari smanji na 50 % ( $t_{50}$ , h)	Vrijeme potrebno da se koncentracija djelatne tvari smanji na 90 % ( $t_{90}$ , h)
Bazična hidroliza 1 M NaOH, ST <sup>1</sup>	30 dana	Drugi	0,000016	662,5	66,3
Oksidativna razgradnja, 33 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ST	12 dana	Nulti	0,181	266,8	53,4

ST<sup>1</sup> – sobna temperatura

#### 4.8. Masena spektrometrija ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje

Analiza masenih spektara provedena je s ciljem identifikacije novonastalih produkata razgradnje ritlecitiniba (DP1–DP4). Fragmentacijski put ritlecitiniba određen je na temelju MS/MS spektara. Sve analize provedene su primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metode opisane u *poglavlju 3.3.1.*

Optimizacija detekcije ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje primjenom QQQ masenog detektora provedena je s ciljem određivanja optimalnih uvjeta fragmentacije koji omogućuju maksimalan intenzitet i stabilnost signala. U tom je kontekstu ispitan utjecaj energije kolizije, kapilarnog napona i napona fragmentatora na učinkovitost fragmentacije prekursorskog iona ritlecitiniba te nastanak produkt iona pogodnih za MRM analizu.

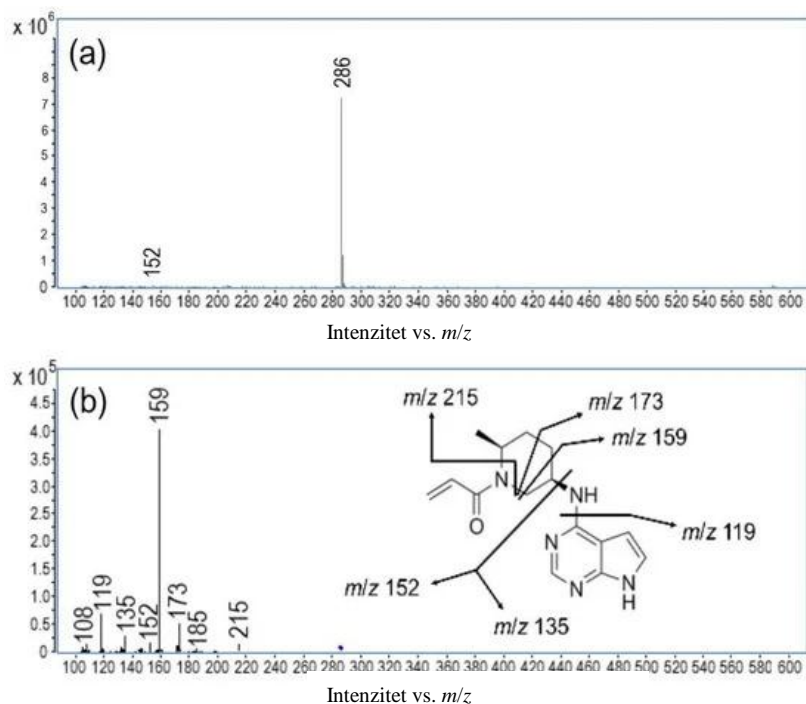
Energija kolizije postupno je mijenjana u rasponu 10–80 V kako bi se postigla učinkovita fragmentacija prekursor iona ritlecitiniba uz nastajanje dovoljno intenzivnih i stabilnih produkt iona. Tijekom optimizacije uočeni su trendovi slični onima kod optimizacije MS etrasimoda, pri čemu su niže vrijednosti energije kolizije rezultirale nedovoljnom fragmentacijom, a više vrijednosti smanjenjem intenziteta iona produkta uslijed prekomjerne fragmentacije. Najbolji odaziv ritlecitiniba postignut je pri energiji kolizije od 40 V i naponu fragmentatora od 135 V, uz kapilarni napon od 3500 V i ostale prethodno opisane uvjete rada sustava (*poglavlje 3.2.2.2.*).

Na početku, snimljen je maseni spektar uzorka ritlecitiniba u pozitivnom i negativnom načinu ionizacije te je viši intenzitet signala postignut je u pozitivnom načinu. Na taj su način identificirani preudomolekulski ion ritlecitiniba  $[M + H]^+$  na  $m/z$  286 kao i potencijalni produkt ioni, prikazani na **slici 13**. Dobiveni podaci poslužili su za uvid u obrasce fragmentacije te za preliminarnu identifikaciju najzastupljenijih iona.

Nakon toga, provedena su MS/MS snimanja kako bi se steklo temeljito razumijevanje fragmentacije ritlecitiniba. Predloženi fragmentacijski put ritlecitiniba prikazan je na **slici 13**. Ukupno je identificirano šest produkt iona.

Prvi pik, sa  $m/z$  215, dobiven je gubitkom prop-2-enamida. Daljnja fragmentacija piperidinskog prstena rezultirala je stvaranjem produkt iona sa  $m/z$  173. Gubitak metil grupe doveo je do stvaranja prominentnog produkt iona sa  $m/z$  159. Sljedeći produkt ioni, sa  $m/z$  152 i 135, opaženi su zbog fragmentacije oko središnjeg dušika. Produkt ion sa  $m/z$  119 nastao je zbog uklanjanja amino grupe iz produkt iona sa  $m/z$  135, stvarajući 7H-pirolo[2,3-d]pirimidin.

Pregledom znanstvene literature utvrđeno je da postoji samo jedan izvještaj o farmakokinetici, metabolizmu i mehanizmu eliminacije ritlecitiniba, uključujući masenospektrometrijske podatke (101). Naš predloženi obrazac fragmentacije ritlecitiniba podudara se s prethodno objavljenim, no zbog dodatne optimizacije parametara masene spektrometrije, naše istraživanje otkrilo je tri nova produkt iona.

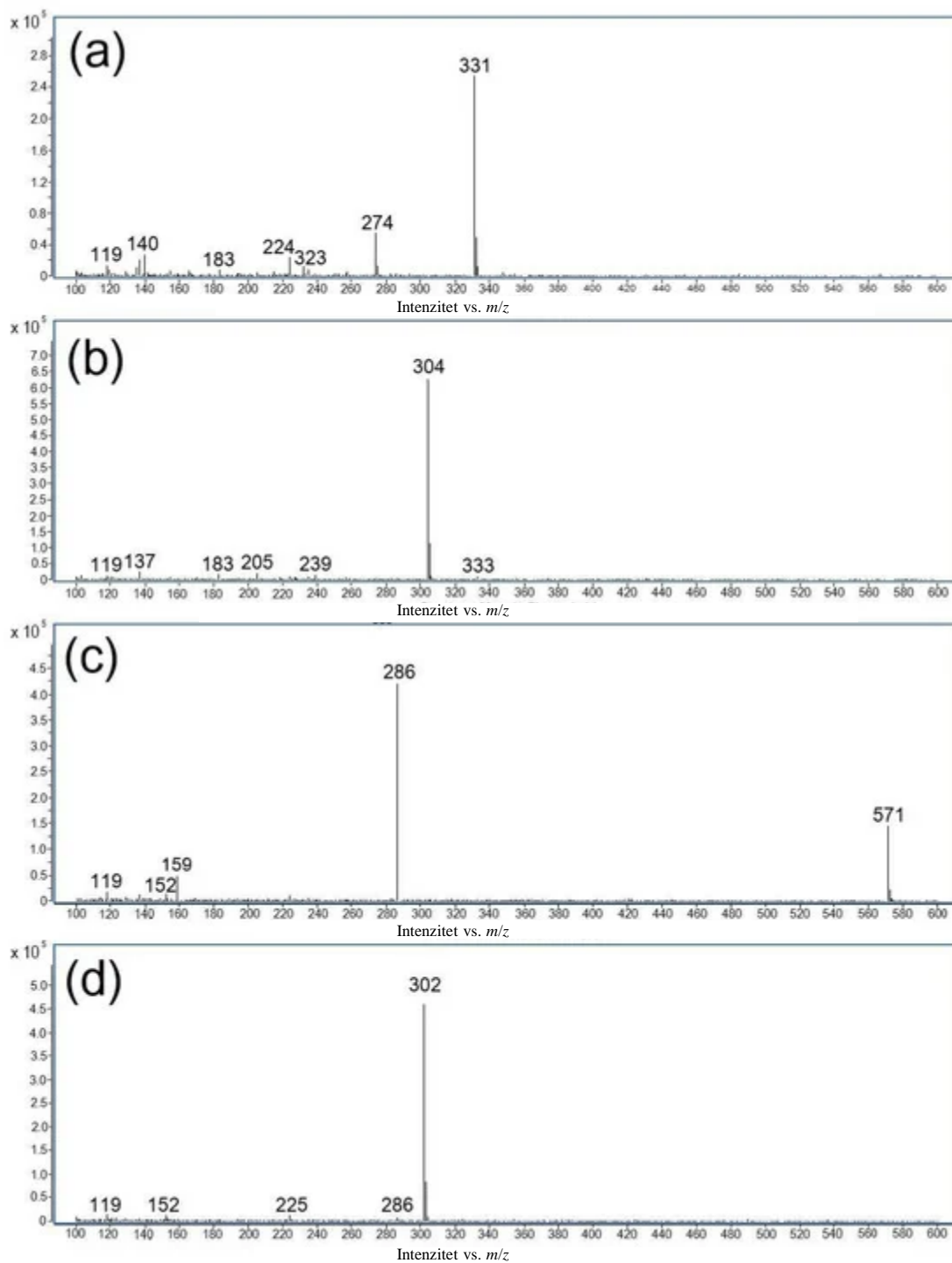


**Slika 13.** Maseni spektri ritlecitiniba:

(a) ESI-MS spektar, prekursor ion  $[M+H]^+$  na  $m/z$  286

(b) ESI-MS/MS spektar produkt iona prekursor iona  $[M+H]^+$  ( $m/z$  286), s energijom sudara od 20 V (predloženi obrazac fragmentacije).

Strukture produkata razgradnje predložene su na temelju obrasca masene fragmentacije ritlecitiniba. Identifikacija je dodatno potkrijepljena primjenom EPFL mrežnog alata za masenu spektrometriju, kemijskim znanjem te razmatranjem uvjeta nastanka onečišćenja. Maseni spektri svih četiriju produkata razgradnje (DP1–DP4) prikazani su na **slici 14**. Vrijeme zadržavanja, relativna vremena zadržavanja (RRT) te glavni pikovi sažeti su u **tablici 13**.



**Slika 14.** ESI-MS spektri u pozitivnom načinu rada dobiveni analizom produkata razgradnje:

- (a) Produkt razgradnje DP1 (bazična hidroliza),
- (b) Produkt razgradnje DP2 (bazična hidroliza),
- (c) Produkt razgradnje DP3 (bazična hidroliza/oksidativni uvjet stresa),
- (d) Produkt razgradnje DP4 (oksidativni uvjet stresa).

DP1 (pik na  $m/z$  331) i DP2 (pik na  $m/z$  304), nastali bazičnom hidrolizom ritlecitiniba, pokazali su RRT vrijednosti manje od 1. Analizom oba produkta razradnje dobiven je MS spektar s jednim glavnim pikom i nekoliko manjih produkt iona. U slučaju DP2, eksperimentalna  $m/z$  vrijednost glavnog pika bila je 304, što je za 18 Da više od pseudomolekulskog iona ritlecitiniba  $[M + H]^+$ . Pretpostavlja se da se ovaj polarni produkt stvara pod bazičnim uvjetima zbog 1,4 adicije hidroksilne skupine preko alken veze  $\alpha,\beta$ -nezasićenog karbonila prisutnog u akrilamidnoj skupini ritlecitiniba.

DP3 nastaje pod dvama uvjetima stresa, bazičnom hidrolizom i oksidativnim stresom. Glavni pik DP3 pronađen je na  $m/z$  571, kako je prikazano na **slici 14.** i u **tablici 13.** Zbog svoje hidrofobnosti, eluira nakon ritlecitiniba s RRT vrijednošću od 1,16. Također, uočena su tri produkt iona DP3 s  $m/z$  vrijednostima 286, 159, 152 i 119.

Struktura ritlecitiniba sadrži akrilamidnu skupinu, koja je sklona stvaranju dimera s C–C ili C–N povezanim lancima, pri čemu C–N povezani dimeri nastaju Michaelovom adicijom. Na temelju podataka iz MS spektra DP3 može se pretpostaviti da je DP3 dimer ritlecitiniba. Nedavni rad Chuma i suradnika (106) naglasio je važnost određivanja dimera ritlecitiniba, budući da ovo onečišćenje može utjecati na kristalizaciju lijeka.

Također, sintetiziran je i komercionalno dostupan dimer riltecitiniba kao referentna nečistoća, pri čemu njegova vrijednost  $m/z$  571 odgovara produktu razgradnje DP3 dobivenom u ovom istraživanju što dodatno podupire predloženu identifikaciju.

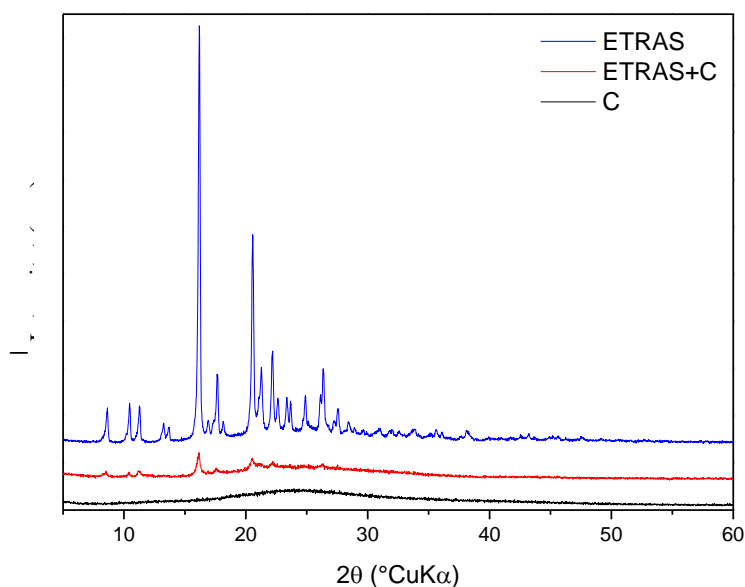
Drugi hidrofobniji produkt razgradnje nastao pri oksidativnim uvjetima stresa (DP4) uočen je pri najvišem relativnom vremenu zadržavanja (RRT = 1,27). U MS spektru, glavni pik DP4 na  $m/z$  302 u pozitivnom načinu rada, što ukazuje na molekulsku masu od 301 Da, odnosno 16 Da više od molekulske mase ritlecitiniba. Prema literaturi, vodikov peroksid može reagirati s tercijarnim aminima, koji su podložni oksidaciji prijenosom elektrona, stvarajući N-okside (107). Razlika od 16 Da odgovara prisutnosti kisika i može biti povezana s nastankom N-oksida u piperidinskom prstenu ritlecitiniba. Ostali pikovi dobiveni u MS spektru DP4 pokazali su tri karakteristična pika na  $m/z$  286, 152 i 119. Nastanak pika na  $m/z$  286 može se pripisati gubitku kisikovog atoma  $[M + H - O]^+$ . Ovaj obrazac fragmentacije već je opisan za N-oxid (110). Dva dodatna pika na  $m/z$  152 i 119 također su uočena u MS spektru ritlecitiniba.

#### 4.9. Ispitivanje kompatibilnosti etrasimoda i ritlecitiniba s pomoćnim tvarima

U ovom poglavlju prikazani su i raspravljani rezultati ispitivanja kompatibilnosti etrasimoda i ritlecitiniba s odabranim pomoćnim tvarima: kitozansom (C), hijaluronskom kiselinom (HK) i ksantan gumom (XG). Kompatibilnost je procijenjena primjenom rendgenske difrakcije (XRD), infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR), diferencijalne termalne analize i termogravimetrijske analize (DTA–TGA) te skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) uz EDS analizu. Dobiveni rezultati interpretirani su s ciljem utvrđivanja eventualnih fizikalnih ili kemijskih interakcija u čvrstom stanju, u skladu s regulatornim očekivanjima za razvoj farmaceutskih formulacija.

##### 4.9.1. XRD analiza

Difraktogram čistog etrasimoda (**slika 15**) pokazuje jasno izražene i oštre difrakcijske maksimume, što potvrđuje njegovu kristaličnu prirodu. Položaji i intenziteti difrakcijskih pikova u skladu su s literaturnim podacima o kristalnoj strukturi etrasimoda (111).

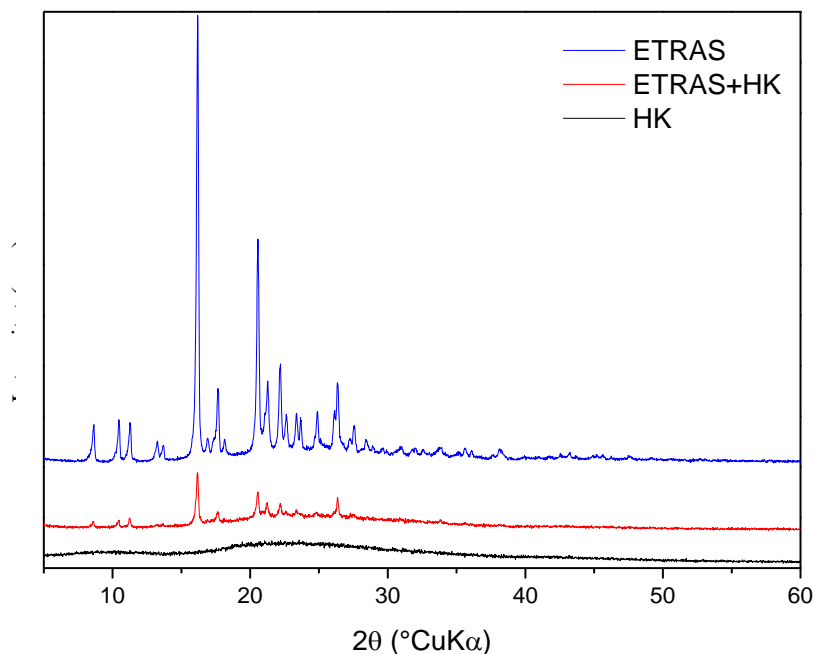


**Slika 15.** Difraktogram etrasimoda, kitozana te njihove smjese

Kitozan, s druge strane, pokazuje amorfnu ili gotovo amorfnu strukturu, karakteriziranu širokim difrakcijskim maksimumom (tzv. amorfni halo ili amorfni odziv), što je tipično za polimerne materijale s ograničenom dugodosežnom strukturnom uređenošću. U XRD uzorcima smjesa etrasimoda i kitozana vidljivi su isključivo najintenzivniji difrakcijski maksimumi etrasimoda pri 16,11° i 20,53° 2θ, dok slabiji pikovi nisu razlučivi zbog razrjeđenja djelatne tvari

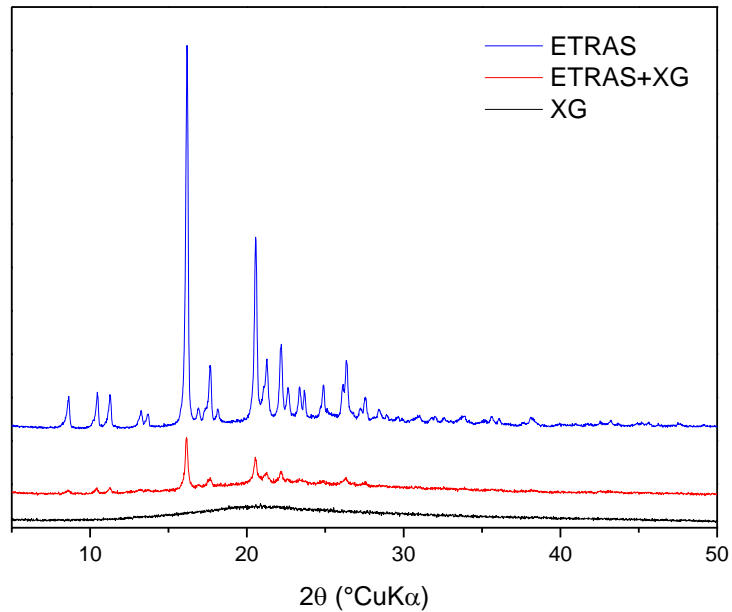
polimerom. Ne uočavaju se pomaci položaja pikova niti promjene njihova oblika, što upućuje na očuvanje kristalne rešetke etrasimoda te na izostanak kemijskih interakcija između etrasimoda i kitozana.

Difraktogram hijaluronske kiseline (**slika 16**) pokazuje dva široka maksimuma, što upućuje na slabu kristaliničnost, a ne na potpuno amorfnu strukturu. Takav uzorak karakterističan je za hidratizirane polisaharidne materijale. U smjesama etrasimoda i hijaluronske kiseline prvi maksimum hijaluronske kiseline pri  $10^\circ 2\theta$  nije razlučiv zbog razrjeđenja, dok su prisutni dominantni pikovi etrasimoda. Izostanak pomaka difrakcijskih maksimuma dodatno potvrđuje da se radi o fizikalnoj mješavini bez interakcija u kristalnoj rešetci.



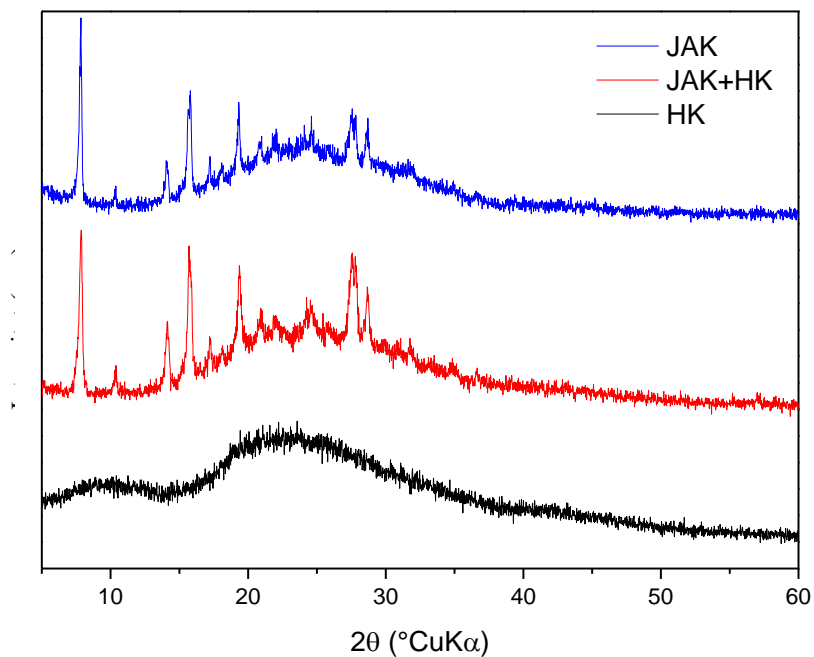
**Slika 16.** Difraktogram etrasimoda, hijaluronske kiseline te njihove smjese

Ksantan guma pokazuje potpuno amorfni difraktogram (**slika 17**). U smjesama s etrasimodom vidljivi su samo najintenzivniji pikovi etrasimoda, bez promjena njihova položaja, što ukazuje na dobru strukturnu kompatibilnost komponenti.

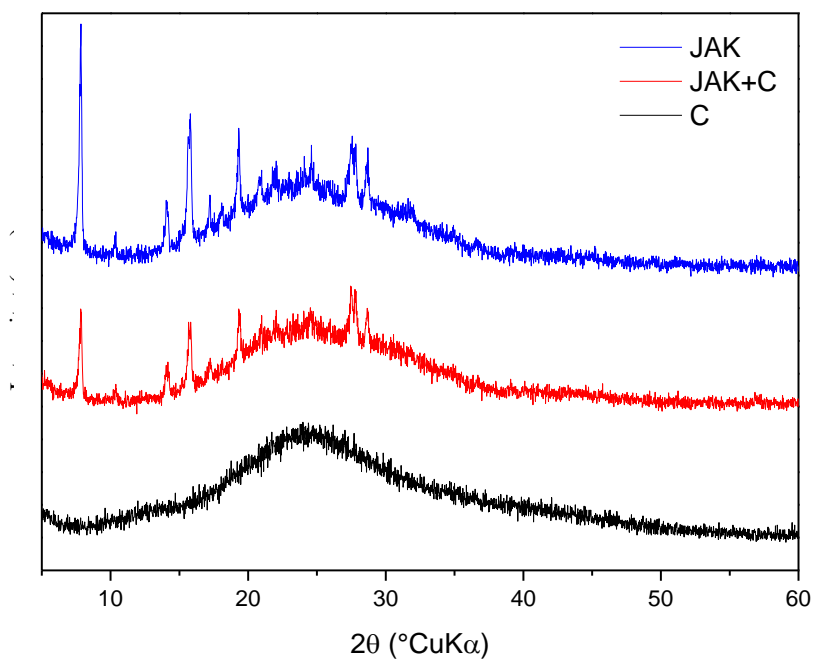


**Slika 17.** Difraktogram etrasimoda, ksantan gume te njihove smjese

Difraktogram ritlecitiniba (oznaka JAK u svim dalje priloženim rezultatima) pokazuje kristalne pikove superponirane nad amorfni halo, što upućuje na djelomično amorfnu prirodu uzorka (**slike 18 i 19**). U smjesama ritlecitiniba s kitozonom i ksantan gumom vidljivi su karakteristični pikovi ritlecitiniba, dok se slabiji maksimumi gube zbog razrjeđenja. Ne uočavaju se sustavni pomaci položaja pikova. U smjesama ritlecitiniba i hijaluronske kiseline uočavaju se promjene u relativnim intenzitetima pojedinih maksimuma, no s obzirom na nepromijenjene položaje pikova te moguć utjecaj pripreme uzorka i statistike mjerenja, ove promjene ne mogu se nedvosmisleno pripisati specifičnim interakcijama.



**Slika 18.** Difraktogram ritlecitiniba, hijaluronske kiseline i njihove smjese



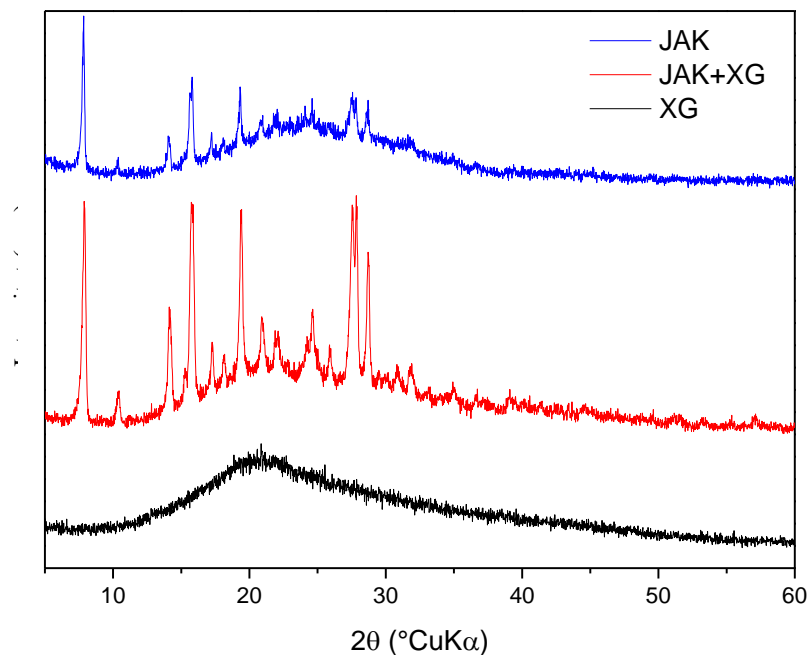
**Slika 19.** Difraktogram ritlecitiniba, kitozana i njihove smjese

Difraktogram ksantan gume (**slika 20**) karakteriziran je širokim, niskointenzivnim maksimumom u području približno 15–30° 2θ, što je tipično za amorfne polimerne materijale bez dugodosežne kristalne uređenosti. Izostanak oštih difrakcijskih maksimuma potvrđuje

potpuno amorfnu strukturu ksantan gume. Difraktogram ritlecitiniba pokazuje prisutnost izraženih difrakcijskih maksimuma superponiranih na široki amorfni halo, što upućuje na djelomično kristaličnu prirodu uzorka. Ovakav uzorak ukazuje na koegzistenciju kristalne i amorfne faze, pri čemu su kristalni domene vjerojatno male ili slabo uređene.

Difraktogram smjese predstavlja superpoziciju difraktograma pojedinih komponenti. U smjesi su jasno vidljivi karakteristični difrakcijski maksimumi ritlecitiniba, dok amorfni halo ksantan gume ostaje prisutan u pozadini. Položaji difrakcijskih maksimuma ritlecitiniba u smjesi ne pokazuju sustavne pomake u odnosu na čisti ritlecitinib, što upućuje na očuvanje kristalne strukture djelatne tvari.

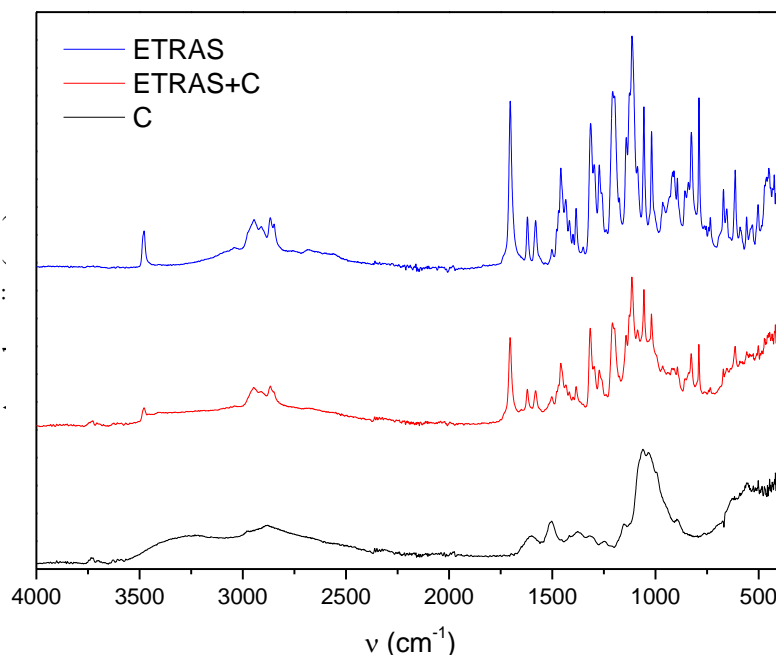
Uočne promjene u relativnim intenzitetima pojedinih maksimuma u smjesi mogu se pripisati razrjeđenju ritlecitiniba amorfnom polimernom matricom, mogućoj preferencijalnoj orijentaciji kristalita te eksperimentalnim uvjetima mjerenja, a ne strukturnim promjenama ili kemijskim interakcijama. Izostanak pomaka pikova i pojave novih difrakcijskih maksimuma ukazuje da između ritlecitiniba i ksantan gume ne dolazi do formiranja nove kristalne faze niti do interakcija koje bi utjecale na kristalnu rešetku djelatne tvari.



**Slika 20.** Difraktogram ritlecitiniba, ksantanske gume i njihove smjese

#### 4.9.2. FTIR analiza

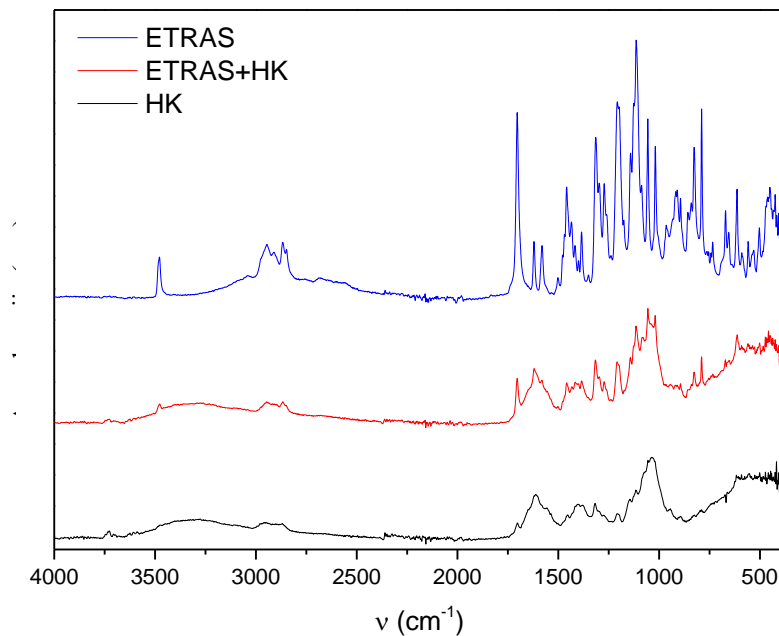
FTIR spektar etrasimoda (**slika 21**) obilježen je širokom apsorpcijskom vrpcom oko  $3350\text{ cm}^{-1}$ , koja potječe od preklapanja vibracija istezanja hidroksilnih i amino skupina. Vrpce u području oko  $2800\text{ cm}^{-1}$  pripisuju se C–H istezanju, dok se vrpce pri oko  $1650$  i  $1590\text{ cm}^{-1}$  povezuju s vibracijama savijanja N–H veza. Dodatne vrpce u području  $1375$ ,  $1150$  i  $1025\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju vibracijama C–O, C–N i C–O–C veza, u skladu s literaturom (112).



**Slika 21.** FTIR spektar etrasimoda, kitozana i njihove smjese

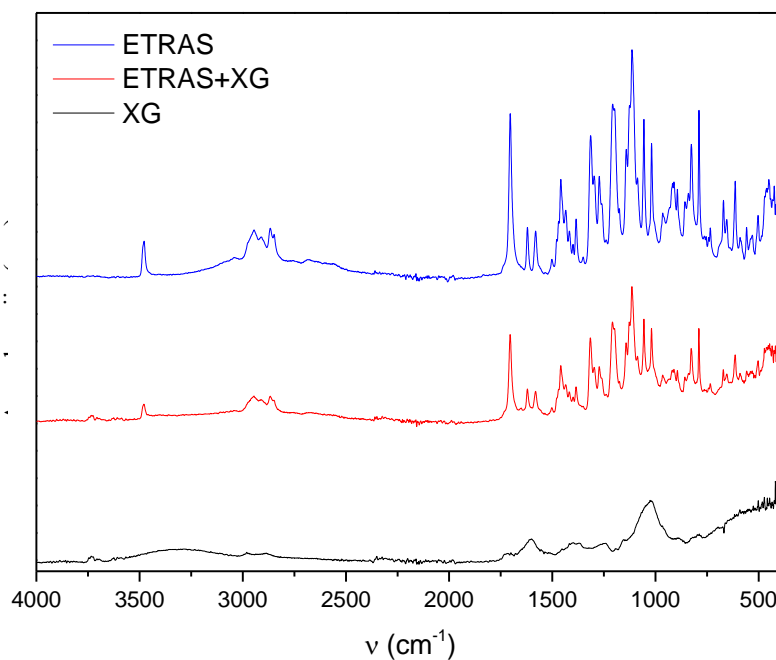
U FTIR spektrima smjesa etrasimoda s kitozanom ne uočavaju se nove apsorpcijske vrpce niti pomaci postojećih maksimuma (**slika 21**). Promjene se odnose isključivo na smanjenje intenziteta pojedinih vrpce uslijed razrjeđenja, što upućuje na izostanak kemijskih interakcija.

FTIR spektar hijaluronske kiseline pokazuje karakteristične vrpce istezanja –OH skupina oko  $3255\text{ cm}^{-1}$ , –CH<sub>2</sub> skupina oko  $2870\text{ cm}^{-1}$  te simetričnih i asimetričnih COO<sup>–</sup> vibracija pri oko  $1605$  i  $1375\text{ cm}^{-1}$  (**slika 22**). U smjesama s etrasimodom i JAK-om spektri su dominantno obilježeni vrpcoma HK, bez pojave novih vrpce ili pomaka, što ukazuje da su interakcije, ako postoje, ograničene na fizikalno miješanje.



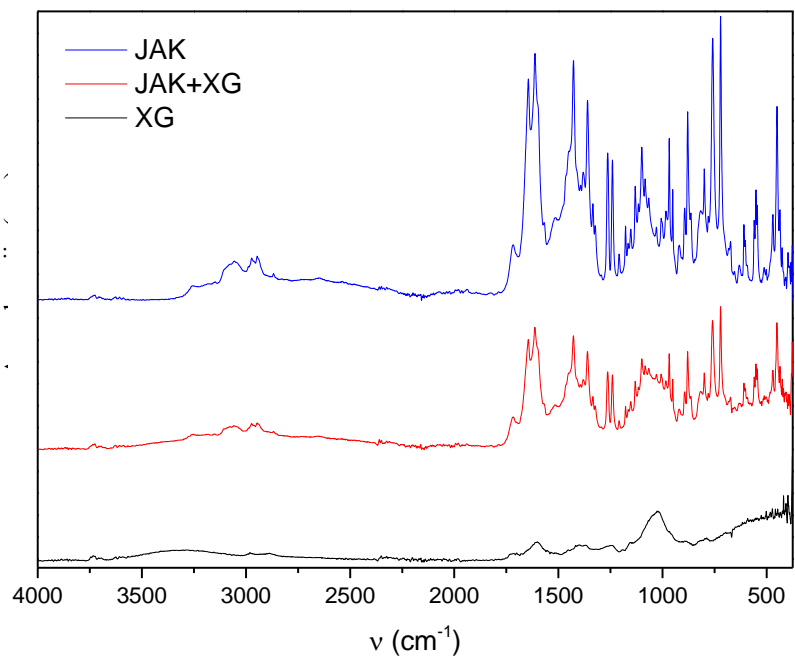
**Slika 22.** FTIR spektar etrasimoda, hijaluronske kiseline i njihove smjese

FTIR spektri ksantan gume (**slika 23**) pokazuju tipične polisaharidne apsorpcije povezane s –OH istezanjima na oko  $3300\text{ cm}^{-1}$ , –CH istezanja u metilnim i metilenskim skupinama između  $2500$  i  $2900\text{ cm}^{-1}$ , –C=O istezanje acetata na  $1650\text{ cm}^{-1}$ , i –COO skupina na  $600$  i  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Deformacijsko istezanje karbonil acetata daje vrpce između  $1050$  i  $1200\text{ cm}^{-1}$  a  $\beta$ -glikozidne veze na  $700\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ . U smjesama s djelatnim tvarima ne uočavaju se značajne promjene u položajima vrpce, već isključivo promjene intenziteta.



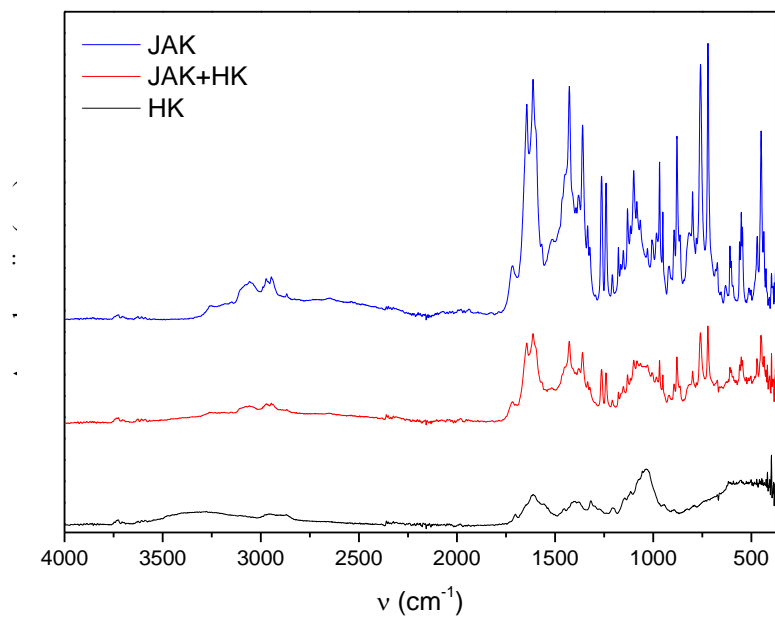
**Slika 23.** FTIR spektar etrasimoda, ksantan gume i njihove smjese

FTIR spektar ritlecitiniba (**slika 24**) pokazuje karakteristične apsorpcijske vrpce koje odgovaraju njegovoj molekularnoj strukturi. Široka vrpca u području  $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$  može se pripisati vibracijama istezanja N–H skupina, dok se vrpce u području  $2850\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  povezuju s istezanjem C–H veza alifatskih i aromatskih skupina. Izražena apsorpcijska vrpca u području oko  $1650\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja karbonilne skupine (C=O), dok se vrpce u području  $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  mogu povezati s vibracijama aromatskog prstena i C=N veza. Dodatne vrpce u području  $1200\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$  pripisuju se C–N i C–F vibracijama, što je u skladu s prisutnošću fluoriranih i heterocikličkih funkcionalnih skupina u molekuli ritlecitiniba.

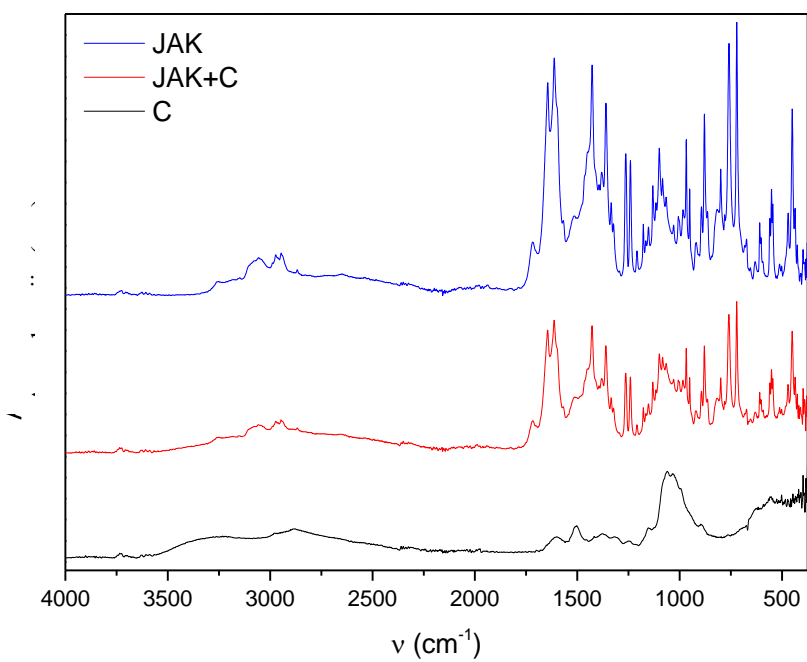


**Slika 24.** FTIR spektar ritlecitiniba, ksantan gume i njihove smjese

U FTIR spektrima smjesa ritlecitiniba s kitozanom, hijaluronskom kiselinom i ksantan gumom uočava se superpozicija karakterističnih vrpca pojedinih komponenti (**slike 25 i 26**). Položaji apsorpcijskih maksimuma ritlecitiniba u smjesama ne pokazuju sustavne pomake u odnosu na čisti lijek, niti se pojavljuju nove vrpce koje bi upućivale na nastanak novih kemijskih veza ili kompleksa. Uočene promjene odnose se prvenstveno na smanjenje intenziteta pojedinih vrpca ritlecitiniba, što je posljedica razrjeđenja djelatne tvari polimernom matricom i preklapanja s intenzivnim polisaharidnim vrcama u području 1000–3500  $\text{cm}^{-1}$ .



**Slika 25.** FTIR spektar ritlecitiniba, hijaluronske kiseline i njihove smjese

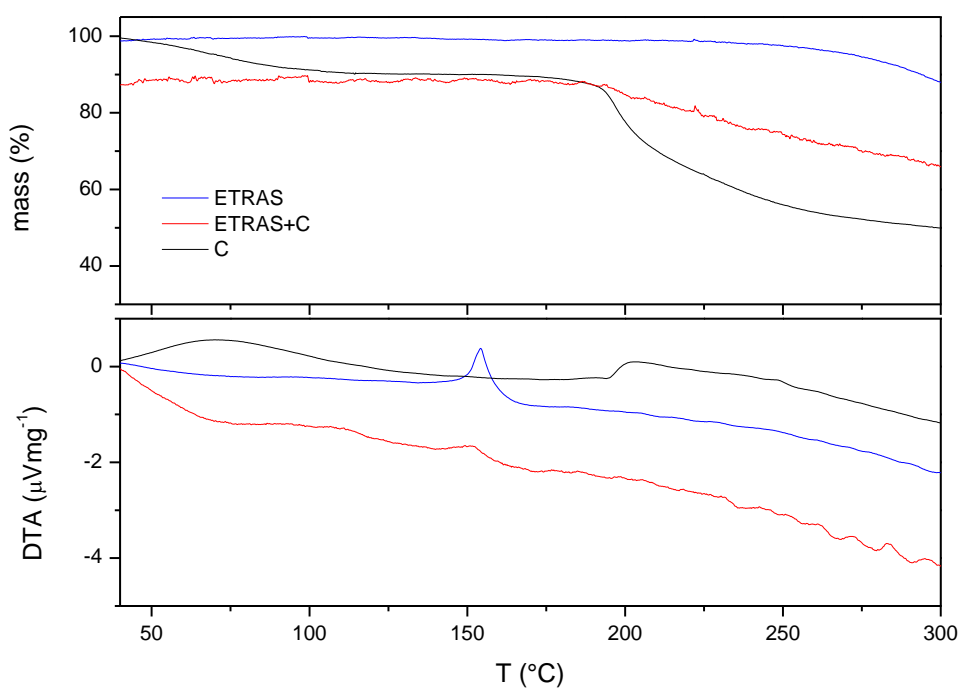


**Slika 26.** FTIR spektar ritlecitiniba, kitozana i njihove smjese

Izostanak pomaka karakterističnih vrpci (osobito C=O i N–H vibracija), kao i izostanak pojave novih apsorpcijskih maksimuma, upućuju na to da između ritlecitiniba i ispitivanih polimera ne dolazi do kemijskih interakcija u čvrstom stanju. Time FTIR rezultati potvrđuju kompatibilnost ritlecitiniba s kitozansom, hijaluronskom kiselinom i ksantan gumom te su u skladu s nalazima XRD i DTA–TGA analiza.

#### 4.9.3. DTA–TGA analiza

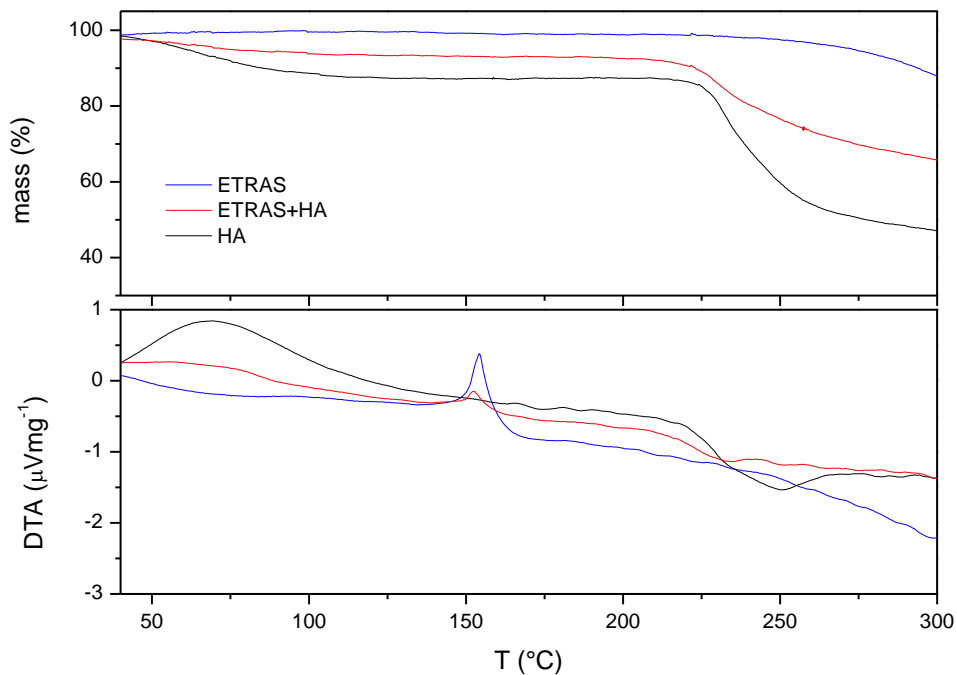
Etrasimod pokazuje endotermni pik pri oko 150 °C, koji nije praćen gubitkom mase, što upućuje na moguću faznu transformaciju. Termička razgradnja započinje iznad 200 °C. U smjesama s polimerima ne uočavaju se značajni pomaci položaja ovog pika niti početka razgradnje (**slika 27**), što ukazuje na izostanak stabilizacijskih ili destabilizacijskih interakcija.



**Slika 27.** DTA-TGA termogram etrasimoda, kitozana i njihove smjese

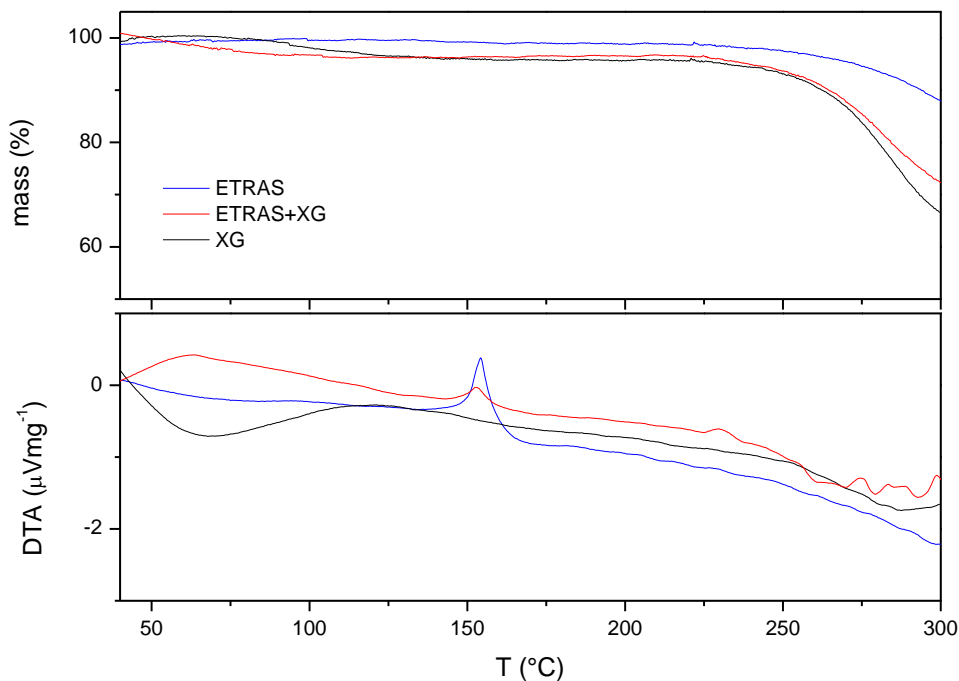
Kitozan pokazuje karakterističan gubitak mase ispod 100 °C (široki endotermni pik), povezan s desorpcijom adsorbirane vode, te daljnju termičku razgradnju pri višim temperaturama, egzotermni pik pri 200 °C koji odgovara razgradnji polimera, depolimerizaciji i razgradnji amino skupina. Značajan gubitak mase predstavlja razgradnju glikozidnih prstenova i amino skupina. U smjesama s etrasimodom početak ovih procesa ostaje gotovo nepromijenjen, a eventualne male razlike unutar su eksperimentalne pogreške.

Hijaluronska kiselina pokazuje početni endotermni proces vezan uz gubitak vode te egzotermni proces razgradnje iznad 210 °C. U smjesama se uočava blagi pomak maksimuma pika razgradnje prema nižim temperaturama, dok početak razgradnje ostaje gotovo nepromijenjen. Ovi rezultati upućuju na moguće slabe intermolekulske interakcije ili promjene u toplinskom prijenosu, ali bez značajnog utjecaja na ukupnu termičku stabilnost sustava (**slika 28**).



**Slika 28.** DTA-TGA termogram etrasimoda, hijaluronske kiseline i njihove smjese

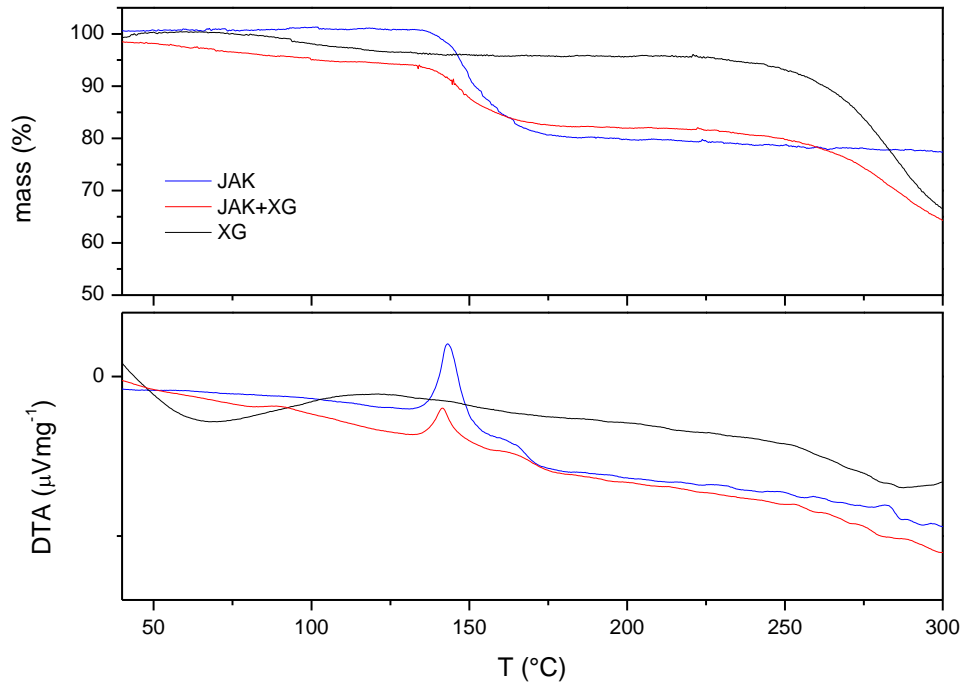
Ksantan guma (**slika 29**) pokazuje endotermni proces gubitka vode pri nižim temperaturama te složeni proces termičke razgradnje iznad 220 °C. U smjesi e etrasimodom ne uočavaju se konzistentni pomaci koji bi se mogli nedvosmisleno povezati s interakcijama u čvrstom stanju.



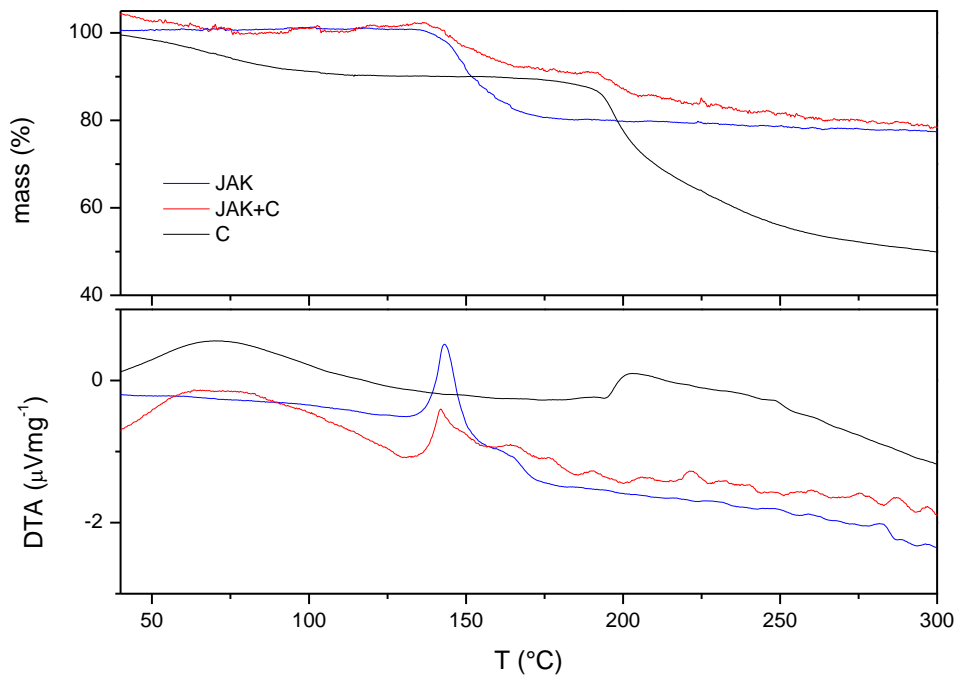
**Slika 29.** DTA-TGA termogram etrasimoda, ksantan gume i njihove smjese

DTA–TGA analiza ritlecitiniba pokazuje složeno termičko ponašanje, karakterizirano višestupanjskom razgradnjom (slika 30). U temperaturnom području ispod približno 150 °C uočava se termički događaj praćen početnim gubitkom mase, što upućuje na početak termičke nestabilnosti djelatne tvari. Ovakvo ponašanje sugerira da ritlecitinib nema jasno izražen temperaturni raspon topljenja, već da se razgradnja javlja prije ili u području očekivanog faznog prijelaza. Daljnjim zagrijavanjem uočavaju se dodatni stupnjevi gubitka mase, što ukazuje na višefazni proces termičke razgradnje molekule ritlecitiniba. Odsutnost stabilnog temperaturnog intervala bez promjena mase potvrđuje ograničenu toplinsku stabilnost djelatne tvari, što je važno razmotriti pri razvoju formulacija i odabiru tehnoloških procesa.

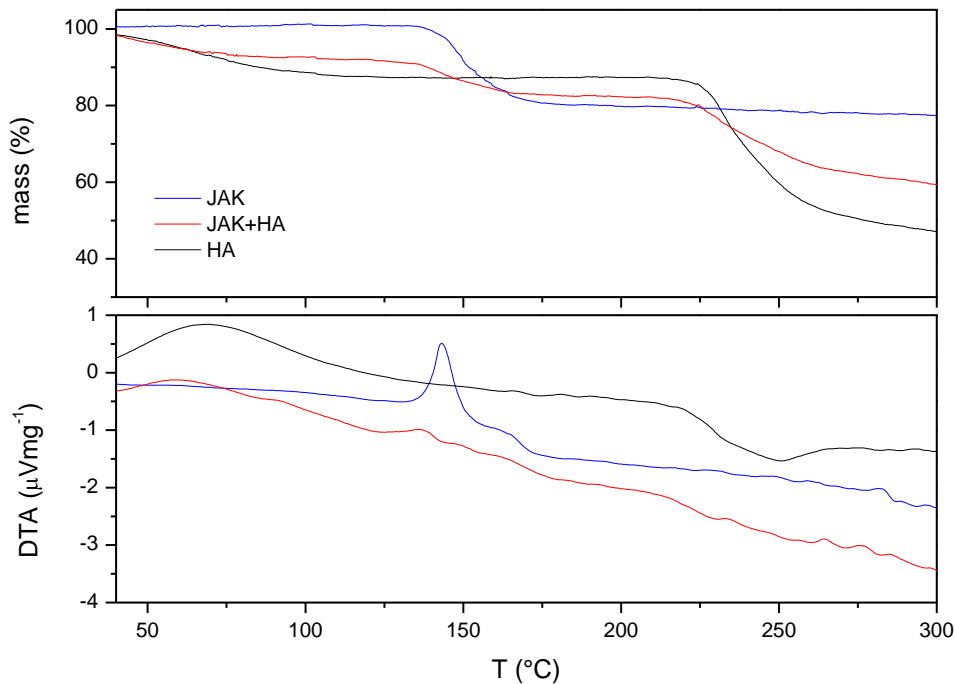
U smjesama ritlecitiniba s kitozanom, hijaluronskom kiselinom i ksantan gumom TG krivulje (slike 30–32) zadržavaju karakteristične stupnjeve razgradnje ritlecitiniba, dok se istodobno uočavaju termički procesi povezani s polimernim nosačima, poput gubitka adsorbirane vode pri nižim temperaturama i njihove vlastite razgradnje pri višim temperaturama. Oblik TG krivulja smjesa upućuje na aditivno ponašanje komponenti, bez pojave novih stupnjeva razgradnje koji bi ukazivali na kemijske interakcije.



**Slika 30.** DTA-TGA termogram ritlecitiniba, ksantan gume i njihove smjese



**Slika 31.** DTA-TGA termogram ritlecitiniba, kitozana i njihove smjese



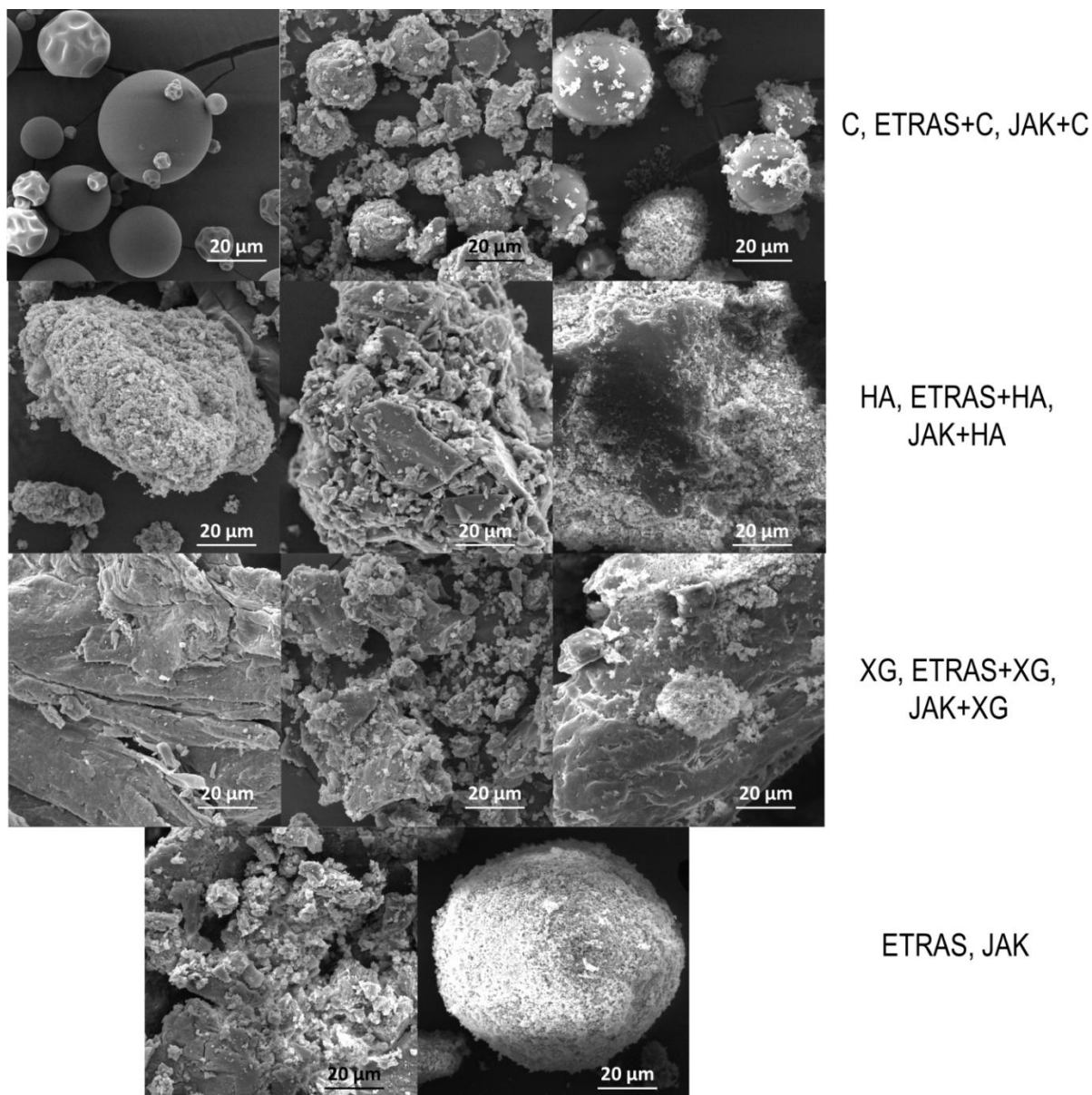
**Slika 32.** DTA-TGA termogram ritlecitiniba, ksantan gume i njihove smjese

Na DTA krivuljama smjesa uočavaju se manji pomaci pojedinih pikova ritlecitiniba prema nižim temperaturama u odnosu na čisti uzorak. Međutim, budući da ti pomaci nisu praćeni jasnim promjenama na TG krivuljama niti pojavom novih termičkih događaja, mogu se pripisati razrjeđenju djelatne tvari, promijenjenim uvjetima prijenosa topline u polimernoj matrici te instrumentalnim i eksperimentalnim čimbenicima, a ne stvarnim promjenama u mehanizmu razgradnje.

Izostanak značajnih promjena početka razgradnje ritlecitiniba u smjesama u odnosu na čisti uzorak ukazuje na to da prisutnost kitozana, hijaluronske kiseline i ksantan gume ne uzrokuje destabilizaciju djelatne tvari. Time DTA–TGA rezultati potvrđuju dobru termičku kompatibilnost ritlecitiniba s ispitivanim polimernim nosačima, u skladu s rezultatima XRD i FTIR analiza.

#### 4.9.4. SEM analiza

SEM mikrografije (**slika 33**) pokazuju da kitozan ima pretežito sferičnu morfologiju s česticama većim od 20  $\mu\text{m}$ , dok je etrasimod građen od finih submikrometarskih čestica koje aglomeriraju u veće nepravilne strukture. U smjesama se opaža taloženje čestica etrasimoda na površinu kitozanskih sfera, dok dio čestica ostaje slobodan, što upućuje na površinski kontakt bez dokaza o dubinskoj interakciji.



**Slika 33.** SEM mikrografije etrasimoda (ETRAS), ritlecitiniba (JAK), kitozana (C), ksantan gume (XG), hijaluronske kiseline (HK) te njihovih smjesa

Ritlecitinib se sastoji od submikrometarskih čestica koje tvore veće sferične aglomerate. U kombinaciji s kitozonom uočavaju se odvojene sfere obje komponente, uz ograničeno prijanjanje ritlecitiniba na površinu kitozana. Hijaluronska kiselina i ksantan guma tvore velike nepravilne polimerne aglomerate. U kombinacijama s etrasimodom i ritlecitinibom razlučivanje pojedinih faza je otežano, osobito u sustavima s hijaluronskom kiselinom, gdje je vjerojatno ostvaren bliski kontakt komponenti. Međutim, ni u jednom slučaju ne uočavaju se morfološki dokazi formiranja novih faza. Općenito, SEM analiza upućuje na to da su interakcije, ako

postoje, ograničene na površinski kontakt, bez jasnih pokazatelja snažnih međumolekulskih interakcija u čvrstom stanju.

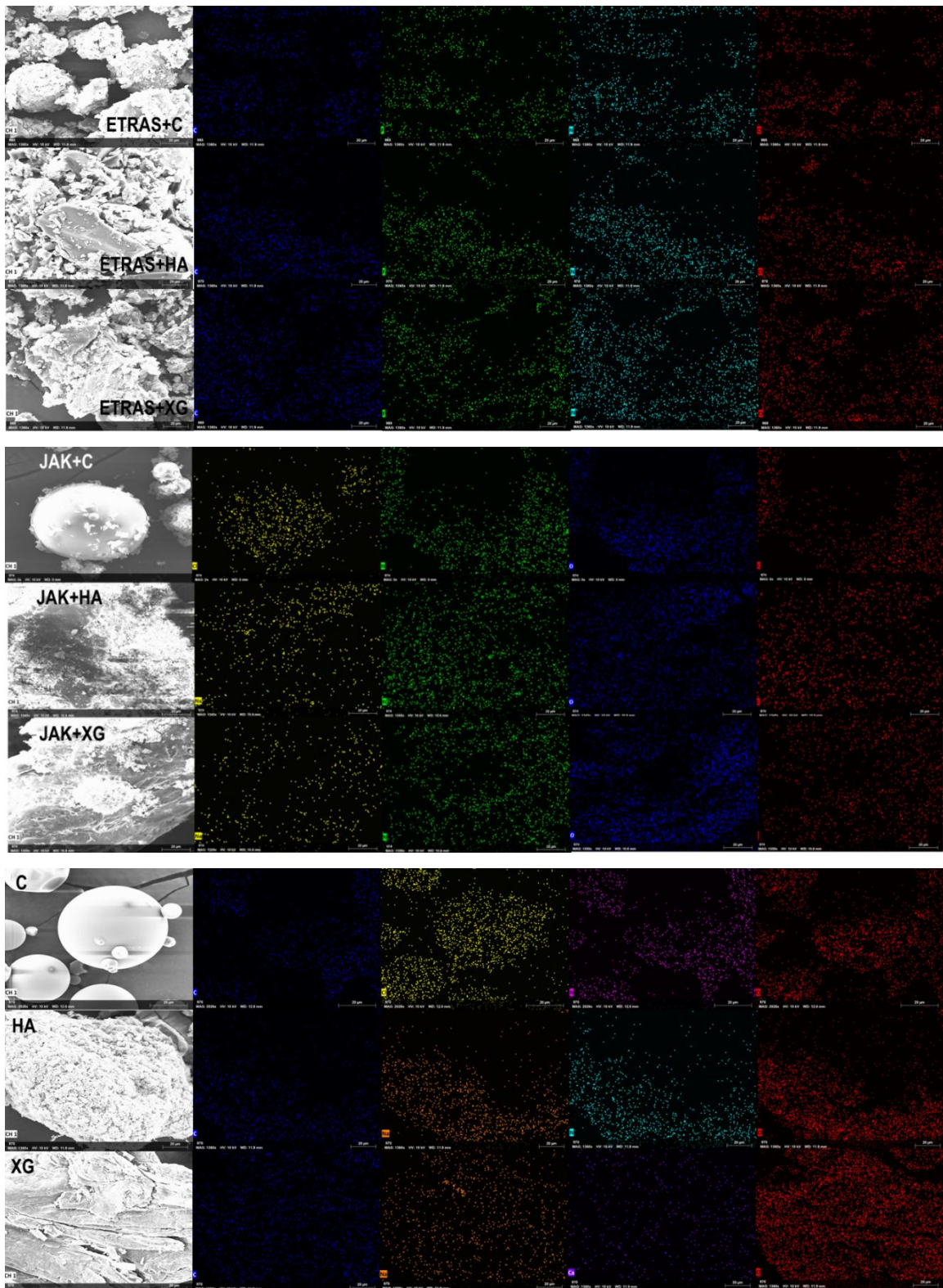
Sveobuhvatna analiza rezultata XRD, FTIR, DTA–TGA i SEM ispitivanja pokazuje da između etrasimoda i ritlecitiniba te ispitivanih pomoćnih tvari (kitozan, hijaluronska kiselina i ksantan guma) ne dolazi do značajnih kemijskih interakcija u čvrstom stanju. Uočene promjene u difraktogramima, spektroskopskim i termičkim krivuljama uglavnom su posljedica razrjeđenja, morfoloških razlika i eksperimentalne varijabilnosti. Dobiveni rezultati potvrđuju kompatibilnost ispitivanih komponenti, što je u skladu s regulatornim zahtjevima za preformulacijska ispitivanja i opravdava njihov daljnji razvoj u farmaceutskim formulacijama.

#### *4.9.5. EDS analiza*

EDS analiza, prikazana na **slici 34**, provedena je s ciljem utvrđivanja elementarnog sastava uzoraka te procjene prostorne raspodjele djelatnih tvari i polimernih nosača. Spektri čistih polimera (kitozan, hijaluronska kiselina i ksantan guma) pokazuju dominantnu prisutnost ugljika i kisika, što je u skladu s njihovom polisaharidnom strukturom. U slučaju kitozana dodatno se detektira dušik, koji potječe od amino skupina.

EDS spektari djelatnih tvari (etrasimod i ritlecitinib) također su obilježeni signalima ugljika, kisika i dušika, dok prisutnost fluora u spektrima ritlecitiniba predstavlja potencijalno razlikovni element u odnosu na polimerne nosače. Međutim, zbog relativno niskog sadržaja djelatne tvari u smjesama, kao i ograničene osjetljivosti EDS metode za lake elemente, kvantitativna interpretacija omjera elemenata nije pouzdana. U EDS analizama smjesa detektiraju se elementi karakteristični za obje komponente, što potvrđuje njihovu istodobnu prisutnost u analiziranim područjima. Međutim, raspodjela elemenata ne pokazuje jasne obrasce koji bi nedvosmisleno upućivali na formiranje nove faze ili na kemijsku interakciju između djelatne tvari i polimera. Dobiveni rezultati u skladu su s SEM opažanjima, koja ukazuju na pretežito fizikalni kontakt između komponenti. EDS analiza nije pokazala pojavu novih elemenata niti promjene elementarnog sastava koje bi upućivale na kemijsku reakciju između komponenti, što je u skladu s rezultatima strukturnih i termičkih analiza. Važno je naglasiti da EDS metoda ne omogućuje izravno razlikovanje fizikalne mješavine od sustava s intermolekulskim interakcijama, osobito kada su one slabe i ne uključuju promjene u elementarnom sastavu. Stoga se EDS rezultati u ovom radu koriste kao dopunska tehnika za

potvrdu prisutnosti komponenti i njihove morfološke povezanosti, dok se zaključci o kompatibilnosti temelje prvenstveno na XRD, FTIR i DTA–TGA analizama.



**Slika 34.** EDS spektri djelatnih tvari etrasimoda (ETRAS) i ritlecitiniba (JAK) te pomoćnih tvari kitozana (C), ksantan gume (XG) te hijaluronske kiseline (HK)

#### 4.9.6. Izotermalno ispitivanje razgradnje

Tijekom izotermalnog ispitivanja razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba primjenom HPLC tehnike nije uočen gubitak analita te analiza ne pokazuje nove ili povećane razgradne pikove u smjesama u odnosu na čiste djelatne tvari nakon izotermalnog ispitivanja i nakon 2 tjedna pohrane.

Kvantitativna analiza pokazala je da su svi analitički prinosi etrasimoda i ritlecitiniba u ispitivanim uzorcima iznosili više od 90%, što upućuje na dobru kemijsku stabilnost analita u primijenjenim kromatografskim i ispitivanim uvjetima. Dobiveni rezultati ukazuju na kompatibilnost etrasimoda i ritlecitiniba s kitozansom, hijaluronskom kiselinom i ksantan gumom što je u skladu sa rezultatima FTIR, DSC/DTA, TGA, XRD i SEM tehnika koje nisu ukazale na značajne kemijske interakcije ili promjene fizikalnog stanja.

#### 4.10. Razvoj i optimizacija bioanalitičke metode za etrasimod

##### 4.10.1. Optimizacija predobrade uzoraka plazme

Priprema i analiza bioloških uzoraka vrlo je izazovna budući da su analiti prisutni u tragovima, dok matrica sadrži brojne interferirajuće tvari koje ometaju analitičke postupke. Priprema uzoraka plazme ključan je korak u bioanalitičkim postupcima jer način pripreme uzorka izravno utječe na pouzdanost rezultata.

Plazma je složena biološka matrica bogata proteinima, lipidima i metabolitima, kao i brojnim endogenim tvarima koje mogu ometati mjerenja, osobito u analitičkim tehnikama poput HPLC-MS i biokemijskih analiza. Zbog toga je nužno ukloniti ili smanjiti interferencije, osigurati stabilnost analita te postići ponovljivu i učinkovitu pripremu uzoraka. Kvalitetno pripremljen uzorak omogućuje točnu i pouzdanu analizu, što je od posebno velike važnosti u bioanalitici.

U preliminarnim ispitivanjima optimirani su postupci pripreme uzoraka plazme primjenom različitih organskih otapala za taloženje proteina, uključujući etanol, acetonitril i metanol. Također, ispitani su različiti omjeri organskog otapala i plazme (2:1 i 3:1, v/v) kako bi se postiglo učinkovito taloženje proteina i zadovoljavajuća ekstrakcijska učinkovitost. Za

uklanjanje preostalih proteina i fosfolipida ispitani su Biotage filtri i Phree™ Phospholipid removal filtri.

Iz rezultata preliminarnih istraživanja zaključili smo da su najviše vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti postignute taloženjem proteina metanolom (99–103 %) u omjeru metanol:plazma (3:1, v/v) i primjenom Phree™ Phospholipid removal filtara (98–101 %). Na temelju toga, konačan postupak pripreme uzoraka za razvoj bionalitičke metode za etrasimod provodio se prema postupku opisanom u *poglavlju 3.2.7.3*.

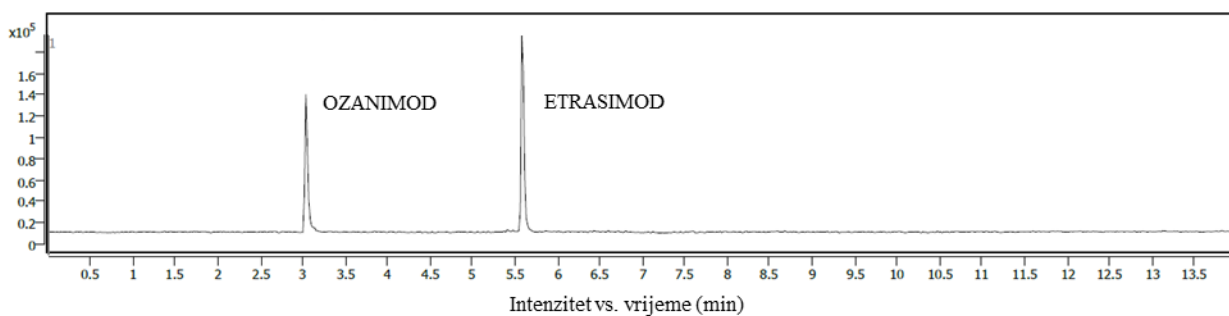
#### *4.10.2. Optimizacija uvjeta masene spektrometrije za etrasimod*

U razvoju bioanalitičke metode za određivanje etrasimoda u plazmi primijenjeni su parametri za QQQ koji su prethodno optimirani tijekom razvoja stabilitetno-indikativne HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metode za etrasimod (opisane u *poglavlju 3.2.1.*), odnosno tijekom masene karakterizacije etrasimoda i njegovih produkata razgradnje. Time je osigurana pouzdana i reproducibilna detekcija bez potrebe za dodatnom optimizacijom MS uvjeta.

Kako i kod masene spektroskopije etrasimoda i produkata razgradnje i ovdje je uočeno da niže vrijednosti energije kolizije rezultiraju nedovoljnom fragmentacijom, dok više vrijednosti dovode do prekomjerne fragmentacije i smanjenja intenziteta produkt iona. Najbolji odaziv etrasimoda postignut je pri energiji kolizije od 40 V i naponu fragmentora od 135 V, uz kapilarni napon od 3500 V.

Određivanje etrasimoda u uzorcima plazme provedeno je primjenom trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra. u pozitivnom ESI načinu rada. Praćeni su MRM prijelazi etrasimoda  $m/z$  458  $\rightarrow$  159 i ozanimoda  $m/z$  405  $\rightarrow$  146. Tijekom optimizacije masenospektrometrijskih uvjeta prilagođeni su parametri ionizacije i fragmentacije kako bi se postigla maksimalna osjetljivost i reproducibilnost metode.

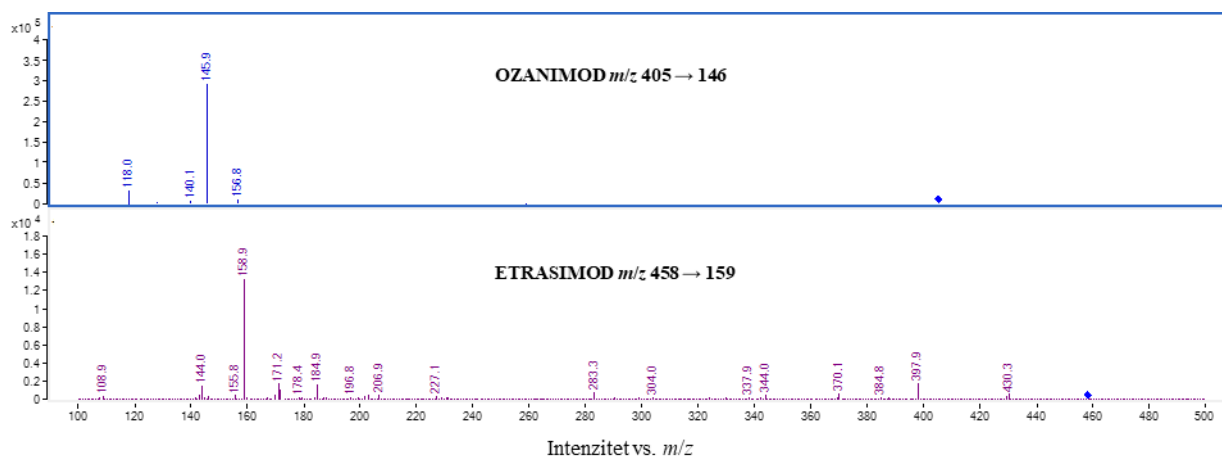
Na kromatogramu ukupnih iona (engl. *Total ion chromatogram*, TIC) (**slika 35**) uočena su dva dobro razdvojena pika. Prvi pik s vremenom zadržavanja  $t_R = 3,1$  min odnosi se na ozanimod, dok se drugi pik s vremenom zadržavanja  $t_R = 5,7$  min odnosi na etrasimod. Dobiveni kromatogram ukazuje na dobru razlučivost između dvaju analita ( $R_s = 24,1$ ) bez interferencija iz matrice plazme.



**Slika 35.** ESI-TIC kromatogram etrasimoda i ozanimoda

Na **slici 36** prikazani su ESI-MS/MS spektri koji daju uvid u fragmentacijsko ponašanje etrasimoda (prekursorskog iona  $m/z$  458) i ozanimoda (prekursorskog iona  $m/z$  405). U spektru su identificirani karakteristični produkt ioni ozanimoda pri  $m/z$  118, 140, 146 i 156,8 i etrasimoda pri  $m/z$  144, 159, 171,2 227 i 397,9, uz nekoliko slabije izraženih produkt iona. Navedeni produkt ioni su već opisani ranije vezano uz studiju prisilne razgradnje etrasimoda, što dodatno potvrđuje identitet analiziranog spoja i konzistentnost fragmentacijskog puta.

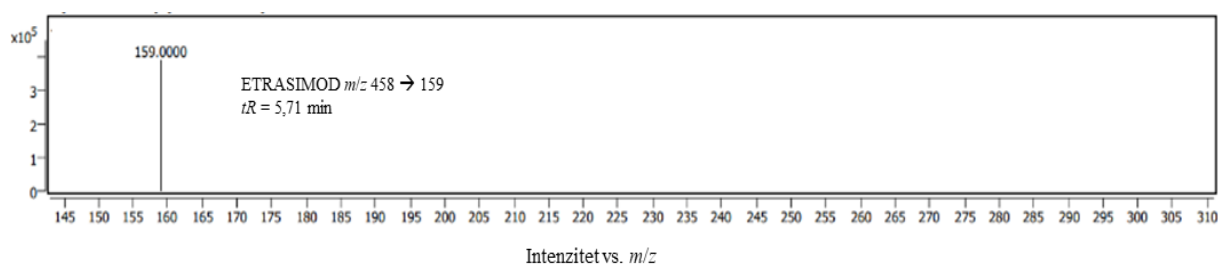
Za kvantifikaciju u plazmi odabrani su produkt ioni najvećeg intenziteta signala, odnosno za etrasimod odabran je prijelaz  $m/z$  458  $\rightarrow$  159 dok je za ozanimod odabran prijelaz  $m/z$  405  $\rightarrow$  146.



**Slika 36.** ESI-MS/MS spektri ozanimoda  $m/z$  405 i etrasimoda  $m/z$  458

Za selektivnu detekciju i kvantifikaciju etrasimoda odabran je ranije spomenuti MRM prijelaz  $m/z$  458  $\rightarrow$  159 (**slika 37**), pri čemu prekursor ion  $m/z$  458 odgovara protoniranom pseudomolekulskom ionu etrasimoda, dok produkt ion  $m/z$  159 predstavlja najintenzivniji i

najstabilniji produkt ion. Odabir ovog prijelaza omogućio je visoku osjetljivost i selektivnost metode u složenoj matrici plazme.



**Slika 37.** MS spektar etrasimoda s odabranim MRM prijelazom u svrhu kvantifikacije u plazmi

Primjena prethodno optimiranih QQQ parametara (CE 40 eV, napon fragmentora 135 V), uz pažljivo odabrane MRM prijelaze, omogućila je pouzdanu, selektivnu i osjetljivu kvantifikaciju etrasimoda u uzorcima ljudske plazme.

#### 4.1.1. Prikladnost sustava za bioanalitičku metodu za određivanje etrasimoda

Svrha ovog dijela istraživanja bila je razviti i optimirati bioanalitičku HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metodu za određivanje etrasimoda u uzorcima plazme. Kromatografski uvjeti primijenjeni u bioanalitičkoj metodi temeljili su se na prethodno razvijenoj i optimiranoj stabilitetno-indikativnoj metodi za etrasimod (*poglavlje 5.2.1.*), pri čemu su osnovni kromatografski parametri zadržani nepromijenjenima, dok su gradijent i ukupno vrijeme trajanja analize dodatno prilagođeni zahtjevima bioanalitičke metode.

Za kromatografsku separaciju korištena je Poroshell 120 SB-C18 kolona (3,0 × 100 mm, 2,7 μm), temeljena na Core-Shell tehnologiji, koja omogućuje visoku kromatografsku učinkovitost, uske i simetrične pikove. S obzirom na složenost matrice plazme i potrebu za odgovarajućim vremenom zadržavanja analita, primijenjen je gradijentni način elucije. U odnosu na prethodno razvijenu stabilitetno-indikativnu metodu za etrasimod, gradijentni način elucije u bioanalitičkoj metodi dodatno je optimiran kako bi se omogućila učinkovita elucija spojeva s kolone uz istodobno postizanje zadovoljavajuće separacije i kraćeg vremena trajanja analize. U bioanalitičkoj metodi elucija je provedena prema sljedećem protokolu: 0–4 min 30–90 % B, 4–5 min 90 % B te 5–13 min 90–30 % B. Bioanalitička metoda započinjala je pri većem udjelu

organske faze uz brži porast udjela acetonitrila, čime je ukupno vrijeme analize skraćeno s 18 na 13 minuta uz zadržavanje zadovoljavajuće kromatografske separacije i osjetljivosti metode.

Kromatografska analiza provedena je pri protoku mobilne faze od 0,8 mL/min i temperaturi kolone od  $40 \pm 0,1$  °C, uz volumen injektiranja od 5 µL. DAD detekcija provedena je pri valnoj duljini od 227 nm, dok je apsorbancija praćena u rasponu od 200 do 600 nm.

Primjenom optimiranih kromatografskih i masenospektrometrijskih uvjeta provedeno je ispitivanje prikladnosti sustava. Procijenjeni su parametri poput vremena zadržavanja, površine, čistoće i simetrije pika te kapaciteta za pikove. Eksperimentalno dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 16**, a svi ispitani parametri udovoljavaju prihvatljivim kriterijima u skladu s važećim ICH Q2(R2) (60) i USP smjernicama (106).

**Tablica 16.** Parametri prikladnosti sustava za novo razvijenu bioanalitičku metodu za određivanje etrasimoda u ljudskoj plazmi (koncentracija 250 ng/mL,  $n = 6$ ).<sup>a</sup>

Parametar	Simbol	Vrijednost	RSD (%)
Vrijeme zadržavanja (min)	$t_R$	5,75	0,16
Površina pika (mAU·s)	$A$	4,33	2,66
Čistoća pika	$P$	999,99	0,01
Simetrija pika	$A_s$	0,90	0,62
Kapacitet pika	$P_c$	284,22	/

<sup>a</sup> Kriteriji prihvatljivosti: čistoća pika – više od 999,0, Simetrija pika – između 0,8 i 1,8.  
RSD – relativno standardno odstupanje

#### 4.12. Validacija bioanalitičke metode za određivanje etrasimoda u ljudskoj plazmi

Bioanalitička metoda za etrasimod validirana je u skladu sa smjernicama ICH M10 (71). Validacijski postupak obuhvaćao je ispitivanje sljedećih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti, točnosti, utjecaja matrice, robusnosti, prijenosa, stabilnosti te integriteta razrjeđenja. Za optimizaciju pripreme uzoraka korišten je DAD detektor, dok je određivanje etrasimoda u uzorcima plazme provedeno primjenom masene spektrometrije gdje je praćen

karakteristični prijelaz etrasimoda  $m/z$  458  $\rightarrow$  159. Odabrani prijelaz omogućio je pouzdano dokazivanje i određivanje etrasimoda u složenoj biološkoj matrici ljudske plazme.

Linearnost metode definira se kao sposobnost analitičke metode da unutar određenog radnog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u ispitivanom uzorku. U ovom istraživanju, procjena linearnog odaziva detektora provedena je mjerenjem šest uzoraka plazme obogaćenih standardnom otopinom etrasimoda u koncentracijskom rasponu od 50 do 2000 ng/mL u triplikatu.

Kalibracijska krivulja dobivena MS detekcijom pokazala je linearnost u koncentracijskom rasponu od 50 do 2000 ng/mL uz koeficijent korelacije od 0,999. Dobiveni rezultati (**tablica 17**) potvrđuju zadovoljavajuću linearnost metode u ispitivanim koncentracijskim područjima.

Povratno izračunate koncentracije nalaze se unutar  $\pm 1,9$  % od nominalne koncentracije na svim ispitivanim koncentracijskim razinama što je unutar propisanog raspona do 15 % od nominalne koncentracije za svaki kalibracijski standard te unutar 20 % za LLOQ.

**Tablica 17.** Podaci kalibracije bioanalitičke metode za određivanje etrasimoda u plazmi

Parametar validacije	Vrijednost
<i>Linearnost</i>	
Raspon (ng/mL)	50–2 000
Jednadžba	$y = 116,04x - 7621,1$
Standardna pogreška nagiba	1,677
Standardna pogreška odsječka	1464,78
Koeficijent korelacije ( $r$ )	0,998
Regresijska suma kvadrata	$4,108 \times 10^{10}$
Rezidualna suma kvadrata	42929355
Ukupno suma kvadrata	$4,112 \times 10^{10}$
LLOQ (ng/mL)	50

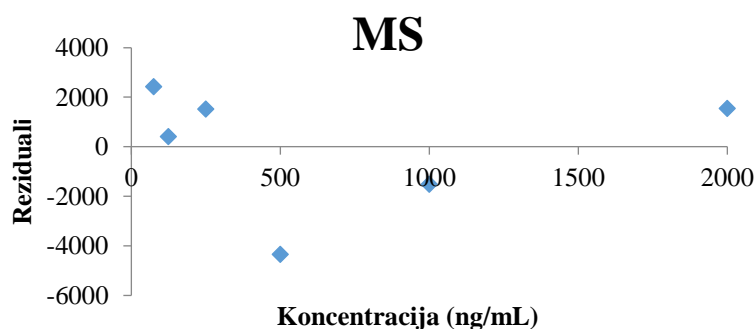
LLOQ – donja granica kvantifikacije

Jednadžba kalibracijskog pravca ( $y = 116,04x - 7621,1$ ) pokazuje proporcionalan porast površine pika s povećanjem koncentracije analita, dok niske vrijednosti standardne pogreške nagiba i odsječka potvrđuju dobru preciznost regresijskog modela. Mala razlika između ukupne i regresijske sume kvadrata, uz znatno nižu vrijednost rezidualne sume kvadrata, potvrđuje dobro slaganje eksperimentalnih podataka s linearnim regresijskim modelom.

Vrijednost LLOQ od 50 ng/mL pokazuje da metoda omogućuje pouzdano određivanje etrasimoda i pri niskim koncentracijama, što potvrđuje prikladnost metode za bioanalitičku primjenu u uzorcima plazme.

Dobiveni rezidualni primjenom MS detekcije raspoređeni su oko nulte vrijednosti (**slika 39**), no uočava se nešto veće raspršenje rezidualnih vrijednosti, osobito pri nižim koncentracijama. Takvo ponašanje očekivano je za MS detekciju zbog izraženijeg utjecaja matrice i veće osjetljivosti metode u području blizu donje granice određivanja. Unatoč tome, ne opaža se linearni trend niti sustavno odstupanje koje bi ukazivalo na neprikladnost linearnog modela. Reziduali pri višim koncentracijama pokazuju manja odstupanja, što potvrđuje stabilnost signala u gornjem dijelu kalibracijskog raspona.

Standardizirani reziduali su unutar raspona od  $-1,72$  do  $+0,96$  što upućuje na odsutnost značajnih odstupanja i potvrđuje homogenost varijance te prikladnost primijenjenog linearnog modela. Uz to, raspored reziduala oko nulte vrijednosti bez uočenog trenda ukazuje na odsutnost izražene sustavne pogreške u ispitivanom koncentracijskom rasponu.



**Slika 39.** Graf reziduala u funkciji nominalne koncentracije etrasimoda u plazmi

Preciznost i točnost metode ispitane su u skladu s ICH M10 (71) smjernicama analizom QC uzoraka na niskoj (50 ng/mL), srednjim (250 i 500 ng/mL) i visokoj koncentracijskoj razini (2000 ng/mL) u peteroplikatu tijekom tri ponavljanja.

RSD vrijednosti za ispitivanje preciznosti bile su manje od 7 %, dok su analitički prinosi za ispitivanje točnosti bili u rasponu od 97,2 do 102,5 % s RSD vrijednostima nižim od 2,85 % što pokazuje zadovoljavajuću točnost metode. Odstupanja izmjerenih koncentracija od nominalnih vrijednosti bila su unutar  $\pm 15$  % za sve QC razine, odnosno unutar  $\pm 20$  % na razini LLOQ, što je u skladu s prihvatljivim kriterijima ICH M10 smjernica.

Selektivnost metode ispitana je analizom slijepih uzoraka (uzorci plazme bez analita ili IS-a) te određivanjem čistoće pika. Kromatogrami slijepih uzoraka nisu pokazivali interferencije pri vremenu zadržavanja etrasimoda niti unutarnjeg standarda, dok je čistoća pika etrasimoda iznosila 999,62. Dobiveni rezultati ukazuju na to da ostale sastavnice plazme ne ometaju određivanje etrasimoda, čime je potvrđena dobra selektivnost razvijene metode.

Utjecaj matrice ispitan je usporedbom površina pikova etrasimoda u radnim otopinama standarda etrasimoda niske (50 ng/mL) i visoke (2000 ng/mL) koncentracije i uzorcima plazme obogaćenima standardnom otopinom etrasimoda u triplikatu. Na temelju rezultata izračunat je matriks efekta (MF) kao omjera signala analita u uzorcima pripremljenima u plazmi prije i nakon ekstrakcije, uz korekciju pomoću unutarnjih standarda. Matriks efekt iznosio je 85,41 % pri koncentraciji od 50 ng/mL te 97,14 % pri koncentraciji od 2000 ng/mL s RSD vrijednostima unutar 15 % za svaku koncentraciju. Dobivene vrijednosti ukazuju na umjeren do zanemariv utjecaj matrice, koji je učinkovito kompenziran primjenom unutarnjeg standarda, što dodatno potvrđuje prikladnost metode za analizu bioloških uzoraka.

Prijenos analita ispitan je analizom slijepog uzorka nakon analize uzorka plazme obogaćenom standardnom otopinom etrasimoda visoke koncentracije 2000 ng/mL. Površine pikova nastale prijenosom analita nisu prelazile 20 % površine pika LLOQ koncentracije čime je zadovoljen kriterij.

Integritet razrjeđivanja ispitan je kako bi se procijenila pouzdanost metode pri analizi uzoraka s koncentracijama iznad ULOQ. Pripremljen je kontrolni uzorak koncentracije 10 000 ng/ml te zatim razrijeđen na koncentracije 1000 i 2000 ng/mL matricom. Analizom razrijeđenih uzoraka dobiveni su analitički prinosi 105,64 % za koncentraciju od 2000 ng/mL te 110,05 % za koncentraciju od 1000 ng/mL. Dobivene vrijednosti bile su unutar 15 % od nominalnih

vrijednosti čime je potvrđen zadovoljavajući integritet razrjeđivanja i mogućnost pouzdane analize uzoraka s koncentracijama iznad ULOQ nakon razrjeđenja.

Stabilnost etrasimoda u ljudskoj plazmi ispitana je u skladu s ICH M10 (71) smjernicama pri različitim uvjetima analizom uzoraka plazme obogaćene standardnom otopinom etrasimoda koncentracije 250 ng/mL.

Kratkoročna stabilnost na sobnoj temperaturi tijekom 4 sata potvrđena je analitičkim prinosom od 95,46 %. Za dugoročnu stabilnost pri  $-20^{\circ}\text{C}$  tijekom dva mjeseca utvrđen je analitički prinos od 90,08 %. Stabilnost uzoraka u autosampleru potvrđena je analitičkim prinosom od 96,69 %, dok je kod uzoraka podvrgnutih višestrukim ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja analitički prinos iznosio 104,75 %. Dobiveni analitički prinosi u rasponu od 90,08 do 104,5 % čime je kriterij stabilnosti zadovoljen budući da odstupanja od nominalnih koncentracija ne prelaze 15 %.

Robusnost metode ispitana je namjernim varijacijama parametara metode. Promjenom protoka mobilne faze za  $\pm 0,05$  mL/min dobivene su RSD vrijednosti za površine pikova etrasimoda od 3,94 % pri protoku od 0,75 mL/min te 3,13 % pri protoku od 0,85 mL/min.

Promjenom temperature kolone za  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  dobivene su RSD vrijednosti za površine pikova etrasimoda od 2,46 % pri  $38^{\circ}\text{C}$  te 2,72 % pri  $42^{\circ}\text{C}$ .

Nadalje, promjenom početnog sastava vodene mobilne faze za  $-1\%$  te zatim organske dobivena je RSD vrijednost za površine pikova od 1,29 %, dok je povećanjem početnog sastava vodene mobilne faze te zatim organske za  $+1\%$  dobivena RSD vrijednost za površine pikova od 1,9 %. Navedeni rezultati potvrđuju da je razvijena metoda robusna te da male varijacije analitičkih uvjeta ne utječu značajno na njezinu pouzdanost.

#### 4.13. Razvoj i optimizacija bioanalitičke metode za ritlecitinib

##### 4.13.1. Optimizacija predorade uzoraka plazme

U okviru razvoja bioanalitičke metode za određivanje ritlecitiniba provedena je sustavna usporedba različitih tehnika pripreme uzoraka. Učinkovitost pojedinih postupaka procijenjena je izračunom ekstrakcijskih učinkovitosti. Dobiveni rezultati ukazuju na izražen utjecaj odabrane tehnike, ekstrakcijskih sredstava i sorbenata na ukupnu učinkovitost pripreme uzorka.

#### 4.13.1.1. Taloženje proteina

Ova tehnika temelji se na promjeni uvjeta u uzorku tako da se proteini denaturiraju i agregiraju, čime postaju odvojivi od tekuće faze koja sadrži analite od interesa. Taloženje proteina osobito je korisno kada je cilj brzo ukloniti većinu proteinske matrice i time pripremiti uzorak za analizu malih molekula.

Glavne prednosti tehnike su jednostavnost, brzina i mogućnost obrade velikog broja uzoraka. Ipak, postoje i ograničenja: određeni analiti mogu se izgubiti zbog vezanja na proteine ili promjena u topljivosti, a uzorci s hemolizom ili visokom lipemijom mogu pokazati veće varijacije i smanjenu čistoću. Zato je procjena ponovljivosti, kao i kontrola kvalitete uzoraka, važan dio primjene ove tehnike.

Priprema uzoraka plazme za analizu ritlecitiniba provedena je metodom taloženja proteina uporabom organskih otapala. Kao taložna sredstva korišteni su metanol, etanol i acetonitril s ciljem optimizacije učinkovitosti uklanjanja proteina iz matrice.

U Eppendorf epruvetu pipetirano je 100  $\mu\text{L}$  plazme, nakon čega je dodano 40  $\mu\text{L}$  ritlecitiniba. Zatim je dodano 260  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg organskog otapala, čime je postignut omjer organskog otapala i plazme 3:1. Ukupni volumen uzorka iznosio je 400  $\mu\text{L}$ .

Nakon dodatka organskog otapala, uzorci su intenzivno vorteksirani tijekom 30 sekundi kako bi se osiguralo potpuno miješanje i učinkovito taloženje proteina iz plazme. Uzorci su potom centrifugirani tijekom 5 minuta na 14 000 okr/min, nakon čega je dobiven bistri supernatant.

Supernatant je pažljivo odvojen i podvrgnut daljnjoj obradi prije instrumentalne analize, tj. uzorci su uparavani do suha uporabom uređaja Concentrator plus pri 60 °C, ponovno otopljeni u u 100  $\mu\text{L}$  smjese metanol:ultračista voda (50:50, v:v). Konačna koncentracija ritlecitiniba u plazmi iznosila je 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Alikvoti od 5  $\mu\text{L}$  injektirani u kromatografski sustav te analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u *poglavlju 3.2.2.*

Primjenom različitih otapala postignuti su značajno različiti ekstrakcijske učinkovitosti. Upotrebom etanola ostvarene su umjereno visoke učinkovitosti u rasponu od 85 do 88 %, dok je primjena acetonitrila rezultirala izrazito niskim ekstrakcijskim učinkovitostima u rasponu od

38 do 39 %. Nasuprot tome, taloženje proteina metanolom omogućilo je ekstrakcijsku učinkovitost u rasponu od 100 do 102 %, uz dobru ponovljivost i stabilan signal.

Dobiveni rezultati jasno ukazuju na povoljniju interakciju ritlecitiniba s metanolom, što se može povezati s njegovim fizikalno-kemijskim svojstvima, osobito lipofilnošću i dobrom topljivošću u polarnim organskim otapalima. Visoke ekstrakcijske učinkovitosti i mali broj koraka pripreme uzoraka rezultirali su minimalnim gubicima analita i utjecajima matrice, čime se taloženje proteina metanolom pokazalo kao prikladna tehnika za daljnju primjenu.

#### *4.13.1.2. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE)*

Kada je potrebna veća selektivnost ili viša razina pročišćavanja, koristi se ekstrakcija čvrstom fazom. SPE tehnika temelji se na prolasku uzorka kroz sorbent koji selektivno veže ili propušta analite. Ovisno o prirodi analita, mogu se odabrati različite vrste sorbenata poput nepolarnih, polarnih, ionskih izmjenjivača te sorbenti mješovitog načina rada.

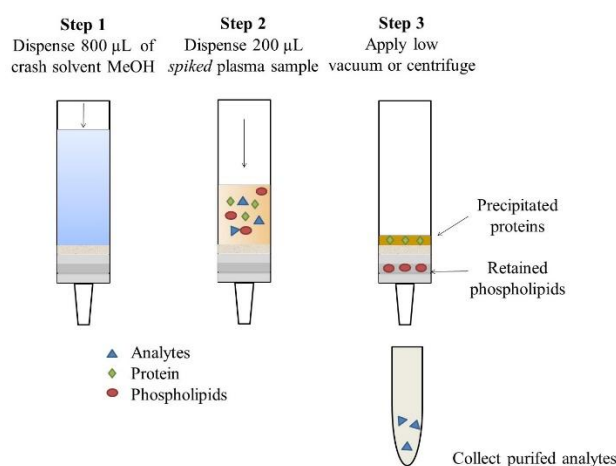
SPE tehnika je složenija i zahtijeva više optimizacije, pri čemu izbor sorbenta i radnih uvjeta značajno utječe na ekstrakcijski prinos. U ovom istraživanju korišteni su različiti SPE sorbenti za ekstrakciju ritlecitiniba iz uzoraka plazme obogaćenih standardnom otopinom ritlecitiniba. Na temelju kemijske prirode sorbenata i mehanizma ekstrakcije primijenjeni su različiti postupci ekstrakcije uz uporabu vakuumske manifolda.

Kao organska otapala korišteni su acetonitril, metanol i etanol. Sorbens je najprije kondicioniran s 1 mL odabranog organskog otapala (acetonitril, metanol i etanol), nakon čega je uslijedilo kondicioniranje s 1 mL ultračiste vode kako bi se sorbens doveo u odgovarajuće početno stanje. Na tako pripremljen sorbens nanoseno je 200 µL uzorka plazme obogaćenog standardnom otopinom ritlecitiniba iz kojeg su prethodno uklonjeni proteini. Nakon nanošenja uzorka, kolona je isprana s 1 mL ultračiste vode.

Dobiveni eluat je sakupljen i podvrgnut uparavanju do suha u uređaju Concentrator plus pri temperaturi od 60 °C. Elucija analita provedena je s 1 mL elucijskog otapala (acetonitril, metanol i etanol). Eluat je ponovno sakupljen i uparavan do suha u uređaju Concentrator plus pri temperaturi od 60 °C, pri čemu je za potpuno isparavanje bilo potrebno najmanje 3 sata. Za svaki ispitivani sorbens korišteno je ukupno šest SPE kolona, pri čemu su za svako organsko otapalo provedene analize u duplikatu.

Na kraju, uzorci su ponovno otopljeni u 100  $\mu\text{L}$  smjese metanol:ultračista voda (50/50, v:v). Alikvoti od 5  $\mu\text{L}$  injektirani u kromatografski sustav te analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u *poglavlju 3.2.2*.

Uobičajeni postupak za sorbente koji selektivno uklanjaju proteine iz plazme i fosfolipide (Isolute® PLD+ i Phree™ Phospholipid removal filtri) izostavlja prethodni korak uklanjanja proteina, budući da je on uključen u sam ekstrakcijski postupak (**slika 40**).



**Slika 40.** Postupak uklanjanja fosfolipida iz plazme korištenjem filtera Phree™ Phospholipid Removal (13)

Prvi korak kod provođenja SPE tehnike primjenom Phree™ Phospholipid removal filtra bio je nanošenje 800  $\mu\text{L}$  metanola za kondicioniranje kolone. Zatim je dodano 200  $\mu\text{L}$  uzorka plazme obogaćenog standardnom otopinom ritlecitiniba. Nakon nanošenja uzorka, epruvete su vorteksirane 30 sekundi i centrifugirane pri 11 000 okr/min tijekom 10 minuta. Prikupljeni supernatanti uparavani su do suha u uređaju Concentrator plus pri temperaturi od 60 °C. Na kraju, uzorci su ponovno otopljeni u 100  $\mu\text{L}$  smjese metanol:ultračista voda (50/50, v:v). Alikvoti od 5  $\mu\text{L}$  injektirani u kromatografski sustav te analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u *poglavlju 3.2.2*.

Ekstrakcijom čvrstom fazom i primjenom selektivnih filtera dobivene su različite ekstrakcijske učinkovitosti, ovisno o vrsti sorbenta. Primjenom Phree™ Phospholipid removal filtera, koji omogućuju istodobno uklanjanje proteina i fosfolipida, postignuti su vrlo visoke i ujednačene ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu od 98 do 100 %. Ovi rezultati potvrđuju da selektivno

uklanjanje interferencija ne uzrokuje gubitke ritlecitiniba, već doprinosi smanjenju utjecaja matrice i poboljšanju stabilnosti HPLC-DAD-QQQ-MS/MS signala.

Također, ekstrakcija čvrstom fazom provedena korištenjem Biotage sorbenta rezultirala je ekstrakcijskim učinkovitostima u rasponu od 80 do 90 %. Iako je postignuta dobra selektivnost, uočeni su gubici ritlecitiniba tijekom faza ispiranja i eluiranja, što je vjerojatno posljedica jače interakcije analita sa sorbentom i većeg broja koraka.

Primjenom Gilson ASPEC-C18 filtara ostvarene su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu od približno od 85 do 92 %. Ovi rezultati ukazuju na dobru učinkovitost C18 sorbenta u zadržavanju i eluiranju ritlecitiniba no i dalje nižu učinkovitost u odnosu na Phree™ Phospholipid removal filtere.

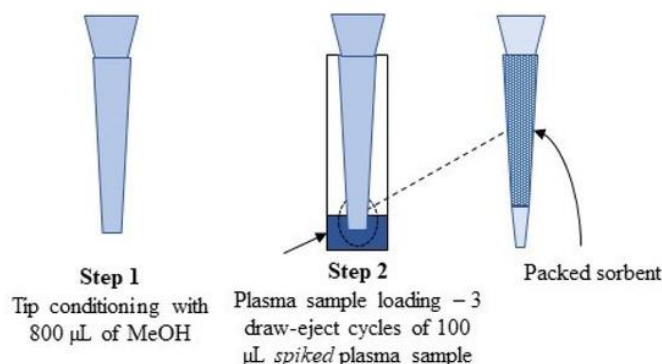
Dodatno, ekstrakcija čvrstom fazom provedena korištenjem ODS-C18 filtara rezultirala je ekstrakcijskim učinkovitostima u rasponu od 75 do 85 %. Niža učinkovitost u ovom slučaju može se pripisati jačim hidrofobnim interakcijama ritlecitiniba sa sorbentom te mogućem zadržavanju analita tijekom ispiranja, što je dovelo do povećanih gubitaka.

Korištenje Ion-Exchange PRS SPE filtara pokazalo je najniže i najvarijabilnije ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu od 45 do 52 %. Ovi rezultati upućuju na nepovoljnu interakciju ritlecitiniba s kationskim izmjenjivačem, što ograničava primjenjivost ove tehnike.

#### *4.13.1.3. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete (In-tip SPME)*

Mikroekstrakcija ritlecitiniba iz uzoraka plazme obogaćenih standardnom otopinom ritlecitiniba provedena je primjenom HybridSPE DPX tipseva. Prije provedbe ekstrakcije, proteini su uklonjeni postupkom taloženja proteina metanolom. Dobiveni supernatanti vorteksirani su 30 sekundi te centrifugirani 10 minuta pri 3 000 okr/min.

Postupak provedbe *in-tip* SPME prikazan je na **slici 41**. U prvom koraku, sorbent pakiran u nastavku za pipete kondicioniran je dvama ciklusa uvlačenja–izbacivanja 800 µL metanola. Zatim, uzorak plazme bez proteina provučen je trima ciklusima uvlačenja–izbacivanja kroz sorbent,. U završnom koraku, prikupljeni uzorci uparavani su do suha pri temperaturi od 60 °C, a zatim ponovno otopljeni u 100 µL smjese metanol/ultračista-voda (50:50, v/v). Alikvoti od 5 µL injektirani su u kromatografski sustav te analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u *poglavlju 3.2.2*.



**Slika 41.** In-tip SPME procedura (13)

Dobivene vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti bile su u rasponu od 75 do 90 %. Iako ova tehnika omogućuje miniaturizaciju postupka i smanjenu potrošnju otapala, položaj sorbensa u nastavku za pipete može doprinijeti povećanim gubicima analita, što se odrazilo na širi raspon dobivenih učinkovitosti.

#### 4.13.1.4. Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (dLLME)

dLLME tehnika temelji se na brzom ubrizgavanju smjese ekstrakcijskog otapala (koje se ne miješa s vodom) i disperzijskog otapala (koje se miješa s obje faze) u vodeni uzorak. Disperzijsko otapalo uzrokuje raspršivanje ekstrakcijskog otapala u sitne kapljice po cijelom uzorku, stvarajući mliječnu emulziju. Na ovaj način se postiže iznimno velika površina kontakta dviju faza čime se olakšava prijenos analita.

Postupak dLLME ispitan je korištenjem različitih kombinacija ekstrakcijskih i disperzijskih sredstava kako bi se procijenio njihov utjecaj na ekstrakcijsku učinkovitost ritlecitiniba. Kao ekstrakcijska sredstva korišteni su *n*-heksan, diklormetan i etil-acetat, dok su kao disperzijska sredstva primijenjeni acetonitril, metanol i etanol.

U Eppendorf epruvetu je dodano 100 µL ekstrakcijskog otapala, nakon čega je dodano 100 µL disperzijskog otapala. Smjesa je vorteksirana tijekom 2 minute radi stvaranja disperzije. U tako pripremljenu suspenziju dodano je 200 µL uzorka plazme obogaćenog standardnom otopinom ritlecitiniba, iz kojeg su prethodno uklonjeni proteini. Dobiveni uzorak vorteksiran je tijekom 20 minuta kako bi se omogućila učinkovita ekstrakcija analita.

Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 12 000 okr/min, čime je postignuto jasno razdvajanje faza. Organski sloj je pažljivo izdvojen i uparavan do suha u uređaju Concentrator plus pri temperaturi od 60 °C tijekom približno 3 sata. Suhi ostatak ponovno je otopljen u 100 µL smjese metanol:ultračista voda (1:1, v/v) te je tako pripremljen uzorak korišten za daljnju kromatografsku analizu. Uzorci su analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u *poglavlju 3.2.2.*

Dobivene su različite ekstrakcijske učinkovitosti ovisno o odabiru otapala. Primjenom *n*-heksana kao ekstrakcijskog sredstva u kombinaciji s disperzijskim sredstvom: acetonitrilom ostvarene su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 44–54 %, metanolom u rasponu 45–56 % te etanolom u rasponu 44–51 %.

Primjenom diklormetana kao ekstrakcijskog sredstva u kombinaciji s disperzijskim sredstvom: acetonitrilom ostvarene su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 12–57 %, metanolom u rasponu 43–47 % te etanolom niže učinkovitosti oko 30 %.

Najveće vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti kod dLLME postupka postignute su primjenom etil-acetata kao ekstrakcijskog sredstva u kombinaciji s disperzijskim sredstvom: acetonitrilom dobivene ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 49–54 %, metanolom oko 50 % te etanolom u rasponu 43–50 %.

Ovi rezultati ukazuju da etil-acetat, zbog svoje umjerene polarnosti, omogućuje učinkovitiju ekstrakciju ritlecitiniba u usporedbi s nepolarnim *n*-heksanom i izrazito polarnim diklormetanom.

#### *4.13.1.5. Ultrazvukom potpomognuta mikroekstrakcija tekuće-tekuće (UA-LLME)*

UA-LLME tehnika provedena je prema postupku sličnom za dLLME, uz primjenu ultrazvuka kao sredstva za poboljšanje ekstrakcije.

U Eppendorf epruvetu je dodano 100 µL ekstrakcijskog otapala (*n*-heksan, diklormetan ili etil-acetat), nakon čega je dodano 100 µL disperzijskog otapala (metanol, etanol ili acetonitril). Smjesa je vorteksirana tijekom 2 minute, a zatim je u nju dodano 200 µL uzorka plazme obogaćenog standardnom otopinom ritlecitiniba iz kojeg su prethodno uklonjeni proteini.

Dobiveni uzorci su potom inkubirani u ultrazvučnoj kupelji pri temperaturi od 40 °C tijekom 30 minuta radi poboljšanja prijenosa analita u organsku fazu. Naime, ultrazvuk stvara

kavitaciju, odnosno formiranje i imploziju sitnih mjehurića u tekućini. Te implozije generiraju udarne valove koji razbijaju granicu između dviju nemiscibilnih faza, čime se značajno povećava kontaktna površina.

Nakon toga, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 12 000 okr/min. Organski sloj je pažljivo izdvojen i uparavan do suha u uređaju Concentrator plus pri 60 °C tijekom približno 3 sata. Suhi ostatak ponovno je otopljen u 100 µL smjese metanol:ultračista voda (1:1, v/v) te je tako pripremljen uzorak korišten za daljnju kromatografsku analizu. Uzorci su analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u *poglavlju 3.2.2*.

UA-LLME tehnika pokazala je ovisnost o kombinaciji otapala, uz značajne razlike u ponovljivosti i ekstrakcijskim učinkovitostima. Primjenom *n*-heksana kao ekstrakcijskog sredstva u kombinaciji s disperzijskim otapalom: acetonitrilom postignute su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 3–60 %, metanolom u rasponu 18–64 % te etanolom EtOH u rasponu 0–28 %.

Primjenom diklormetana kao ekstrakcijskog sredstva u kombinaciji s disperzijskim otapalom: acetonitrilom dobivene su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 0–48 %, metanolom u rasponu 14–49 % te etanolom bez detektiranog signala.

Najveće vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti dobivene su korištenjem etil-acetata kao ekstrakcijskog sredstva u kombinaciji s disperzijskim sredstvom: acetonitrilom dobivene su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 52–56 %, metanolom u rasponu 50–53 % te etanolom do 53 %.

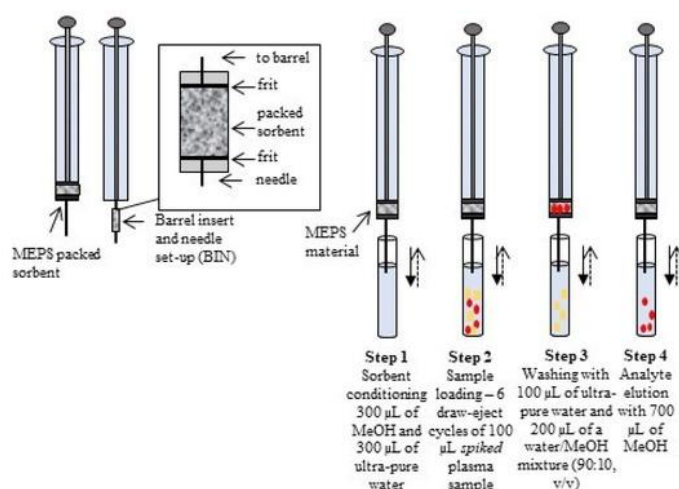
Rezultati dLLME i UA-LLME jasno pokazuju da izbor ekstrakcijskog i disperzijskog sredstva ima presudan utjecaj na ekstrakcijsku učinkovitost ritlecitiniba. Iako su određene kombinacije, osobito one s etil-acetatom pokazale zadovoljavajuće vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti, obje tehnike karakterizira velika varijabilnost te osjetljivost na eksperimentalne uvjete.

U usporedbi s jednostavnijim tehnikama pripreme uzoraka, poput taloženja proteina metanolom i primjene Phree™ Phospholipid removal filtera, dLLME i UA-LLME pokazale su niže i manje ponovljive ekstrakcijske učinkovitosti, što ograničava njihovu primjenjivost u rutinskoj bioanalitičkoj analizi ritlecitiniba.

#### 4.13.1.6. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s pakiranim sorbentom (MEPS)

MEPS tehnika provedena je uporabom ručne automatizirane analitičke igle volumena 100  $\mu\text{L}$  s uklonjivom iglom, opremljene sklopom uložka i igle (engl. *Barrel insert and needle*, BIN) koji sadrži hidrofobne sorbente C8, C18, umreženi kopolimer polistiren-divinilbenzen (HDVB) te kopolimer polistiren-divinilbenzen (SDVB) (slika 42).

Prvi korak uključuje kondicioniranje sorbenta primjenom četiri ciklusa uvlačenja–izbacivanja 300  $\mu\text{L}$  metanola, nakon čega su provedena četiri ciklusa uvlačenja–izbacivanja 300  $\mu\text{L}$  ultračiste vode.



Slika 42. MEPS procedura (13)

Nakon kondicioniranja, 100  $\mu\text{L}$  uzorka plazme obogaćenog standardnom otopinom riltecitiniba provučeno je u četiri do šest ciklusa uvlačenja–izbacivanja kroz sorbent kako bi se omogućila učinkovita adsorpcija analita.

Nakon toga, sorbent je ispran s 100  $\mu\text{L}$  ultračiste vode te dodatno s 200  $\mu\text{L}$  smjese metanol:ultračista voda (90:10, v/v). Eluacija analita provedena je s 700  $\mu\text{L}$  metanola.

Dobiveni eluat uparavan je do suha pri temperaturi od 60  $^{\circ}\text{C}$ , ponovno otopljen u 100  $\mu\text{L}$  ultračiste vode, a 5  $\mu\text{L}$  tako pripremljenog uzorka injektirano je u kromatografski sustav. Uzorci su analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u poglavlju 3.2.2.

U ovom istraživanju ekstrakcija je ponavljana više puta korištenjem istog HDVB i SDVB sorbenta. Kako bi se spriječio prijenos ostataka analita između uzastopnih analiza, sorbent je

nakon svake analize ispran s deset ciklusa uvlačenja–izbacivanja 300 µL metanola, nakon čega je provedeno deset ciklusa uvlačenja–izbacivanja 100 µL ultračiste vode.

Vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti dobivene primjenom MEPS tehnike s HDVB i SDVB sorbentima bile su u rasponu 9–11 %. Ograničeni kapacitet sorbenta i moguća adsorpcija ritlecitiniba objašnjavaju uočene gubitke, unatoč prednostima metode u pogledu malih volumena uzorka.

#### *4.13.1.7. Ekstrakcija čvrsto-tekuće (SLE)*

Ekstrakcija potpomognuta sorbentom, provedena je korištenjem NOVUM SLE 3cc Tube - Phenomenex SLE sorbenata. Za provedbu ekstrakcije pomiješana je plazma s 0,5 M amonijevim hidroksidom u omjeru 1:1. Zatim je 600 µL otopine preneseno na filter i ostavljeno na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta kako bi se sorbens navlažio. Elucija ritlecitiniba provedena je s 2×900 µL etil-acetata. Uzorci su analizirani prethodno razvijenom stabilitetno-indikativnom metodom za ritlecitinib opisanom u *poglavlju 3.2.2*. Dobivene su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 24–56 %. Iako metoda omogućuje dobro razdvajanje faza, rezultati ukazuju na nepotpunu ekstrakciju ritlecitiniba iz matrice plazme.

#### *4.13.1.8. Disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (dSPME)*

dSPME predstavlja suvremenu tehniku za ekstrakciju i ukoncentriravanje analita iz vodenih uzoraka. Metoda se temelji na dispergiranju finih čestica čvrste faze, najčešće polimernih sorbenata, izravno u uzorku, čime se omogućuje učinkovita adsorpcija analita. Za razliku od klasične ekstrakcije čvrstom fazom, u kojoj je sorbent smješten u koloni, kod dSPME sorbent je homogeno raspodijeljen u cijelom volumenu uzorka, što rezultira povećanom kontaktnom površinom.

Metodu karakterizira smanjena potrošnja organskih otapala, kraće vrijeme analize te visoka učinkovitost, osobito pri određivanju spojeva poput boja i farmaceutskih tvari. Sam postupak uključivao je slijedeće:

Priprema sorbensa: Izvagano je 0,503 g sorbensa (ISOELUTE® C18(EC), promjer pora 62 Å, veličina čestica 52 µm). U sorbens je dodano 1 mL smjese ultračista voda:izopropanol (4:1, v:v). Zatim je tako pripremljen uzorak vorteksiran 1 minutu te centrifugan pri sobnoj temperaturi pri 12 000 okr/min tijekom 5 minuta.

Supernatant se uklonio te je dodano u sorbens 1 mL smjese ultračista voda:izopropanol (1:4, v/v). Ponovno, tako pripremljen uzorak vorteksiran je 1 minutu te centrifugan pri sobnoj temperature pri 12 000 okr/min tijekom 5 minuta.

Nadalje, u sorbens je dodano 1 mL smjese metanol:acetonitril (1:1, v/v). Tako pripremljen uzorak vorteksiran je 1 minutu te centrifugiran pri sobnoj temperature pri 12 000 okr/min tijekom 5 minuta. Uklonjen je supernatant. Postupak sa smjesom metanol:acetonitril ponavljen je 3 puta.

Na kraju, uklonjen je supernatant i uzorak još jednom centrifugiran pri sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta kako bi se u potpunosti odvojio sorbens od otapala. Sorbens je ostavljen nepokriven na sobnoj temperaturi da ishlapi suvišak otapala. Nakon 24 sata sorbens je u potpunosti bio suh i praškast.

Ekstrakcija ritlecitiniba: Za provedbu ekstrakcije analita pripremljena je suspenzija sorbensa u vodi koncentracije 10 mg/mL. U tu svrhu izvagano je 8 mg prethodno pripremljenog sorbensa, koji je suspendiran u 800 µL ultračiste vode. Dobivena suspenzija vorteksirana je tijekom 2 minute kako bi se osigurala homogena disperzija sorbensa.

U tako pripremljenu suspenziju dodano je 200 µL uzorka plazme obogaćenog standardnom otopinom ritlecitiniba iz kojeg su prethodno uklonjeni proteini. Smjesa je vorteksirana 2 minute, nakon čega je pohranjena na temperaturi od 4 °C tijekom 2 sata radi omogućavanja adsorpcije analita na sorbens.

Nakon hlađenja, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 12 000 okr/min. Supernatant je pažljivo uklonjen i sačuvan radi eventualne provjere gubitaka analita. U preostali talog sorbensa dodano je 1 mL ekstrakcijskog sredstva. Kao ekstrakcijska sredstva korišteni su: metanol, etanol, acetonitril te smjesa metanol:acetonitril (1:1, v/v).

Uzorci su ponovno pohranjeni na temperaturi od 4 °C tijekom 2 sata, a zatim centrifugirani pri 12 000 okr/min tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatant je sakupljen i uparavan do suha u uređaju Concentrator plus pri 60 °C približno 3 sata. Suhi ostatak ponovno je otopljen u smjesi metanol/ultračista voda (1:1, v/v). Zbog nezadovoljavajućeg analitičkog prinosa ritlecitiniba u navedenom postupku, ekstrakcijski protokol je dodatno optimiziran skraćivanjem postupka i objedinjavanjem faze adsorpcije i elucije.

U optimiziranom protokolu, 200 µL uzorka plazme obogaćenog standardnom otopinom ritlecitiniba (s prethodno uklonjenim proteinima) dodano je u 800 µL suspendiranog sorbensa

pripremljenog u različitim ekstrakcijskim medijima (ultračista voda, acetonitril, metanol, etanol i smjesa metanol:acetonitril (1:1, v/v).

Tako pripremljen uzorak se vorteksira 2 minute te pohrani na temperaturi od 4 °C tijekom 2 sata. Nakon toga, uzorak je centrifugiran pri 12 000 okr/min tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatant je uklonjen i uparavan do suha u uređaju Concentrator plus pri 60 °C tijekom 3 sata. Suhi ostatak ponovno je otopljen u 100 µL smjese metanol/ultračista voda (1:1, v/v). Tako pripremljeni uzorci korišteni su za daljnju kromatografsku analizu. Dobivene su ekstrakcijske učinkovitosti u rasponu 67,22–89,62 %.

Preliminarnim istraživanjima i na temelju dobivenih rezultata zaključili smo da su najviše vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti postignute taloženjem proteina metanolom (100–102 %) i primjenom Phree™ Phospholipid removal filtara (98–100 %). Na temelju toga, konačan postupak pripreme uzoraka za razvoj bionalitičke metode za ritlecitinib provodio se na sljedeći način:

Uzorci plazme obogaćeni standardnom otopinom ritlecitiniba pripremljeni su dodatkom radnih otopina standarda u slijepe uzorke plazme. Uklanjanje fosfolipida i proteina iz uzoraka plazme provedeno je primjenom Phree™ Phospholipid removal filtara uz prethodno taloženje proteina metanolom.

U Eppendorf epruvetu je dodano 300 µL plazme, 120 µL odgovarajuće radne standardne otopine ritlecitiniba i 120 µL standardne otopine tofacitiniba (koncentracije 100 µg/mL).

Taloženje proteina provedeno je dodatkom 660 µL metanola, čime je postignut omjer plazme i organskog otapala 1:3 te ukupni volumen uzorka od 1200 µL. Zatim, uzorci su intenzivno vortexirani 30 sekundi i centrifugirani tijekom 5 minuta na 14 000 okr/min.

Nakon taloženja proteina, 1000 µL dobivene otopine preneseno je na Phree™ Phospholipid removal filter. Uzorci su centrifugirani pri 14 000 okr/min tijekom 10 minuta čime su učinkovito uklonjeni fosfolipidi i preostali proteini. Dobiveni eluati uparavani su do suha u uređaju Concentrator plus pri temperaturi od 60 °C. Suhi ostatak ponovno je otopljen u 1 mL smjese ultračiste vode i metanola (50:50, v/v).

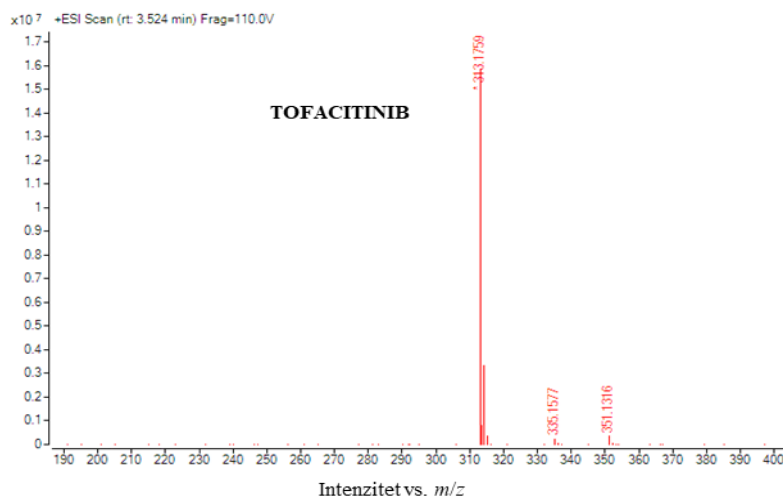
#### *4.13.2. Optimizacija uvjeta masene spektrometrije za ritlecitinib*

U razvoju bioanalitičke metode za određivanje etrasimoda u plazmi primijenjeni su parametri za QQQ koji su prethodno optimirani tijekom razvoja stabilitetno-indikativne HPLC-DAD-

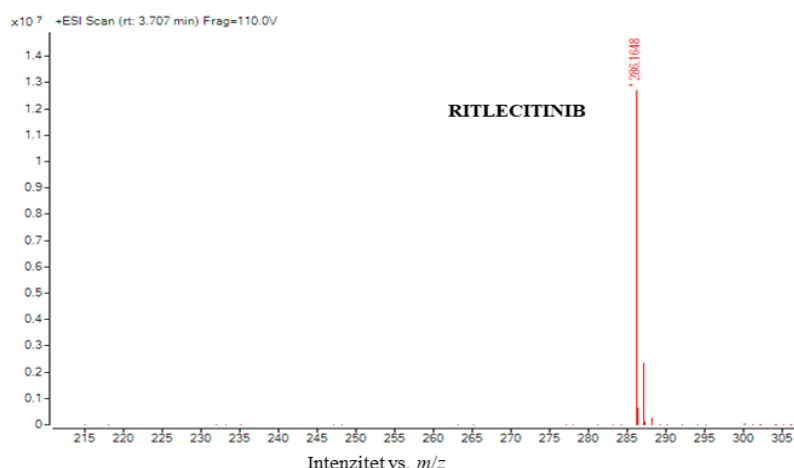
QQQ-MS/MS metode za ritlecitinib (opisane u *poglavlju 3.2.2.*), odnosno tijekom masene karakterizacije ritlecitiniba i njegovih produkata razgradnje. Time je osigurana pouzdana i reproducibilna detekcija bez potrebe za dodatnom optimizacijom MS uvjeta.

Kako i kod masene spektroskopije ritlecitiniba i produkata razgradnje i ovdje je uočeno da niže vrijednosti energije kolizije rezultiraju nedovoljnom fragmentacijom, dok više vrijednosti dovode do prekomjerne fragmentacije i smanjenja intenziteta produkt iona. Najbolji odaziv etrasimoda postignut je pri energiji kolizije od 40 V i naponu fragmentora od 135 V, uz kapilarni napon od 3500 V.

Određivanje ritlecitiniba u uzorcima plazme provedeno je primjenom trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra. u pozitivnom ESI načinu rada, u prisutnosti internog standarda tofacitiniba. Praćeni su MRM prijelazi ritlecitiniba  $m/z$  286  $\rightarrow$  152 i tofacitiniba  $m/z$  313  $\rightarrow$  149. Tijekom optimizacije masenospektrometrijskih uvjeta prilagođeni su parametri ionizacije i fragmentacije kako bi se postigla maksimalna osjetljivost i reproducibilnost metode. U masenim spektrima zabilježen je dominantan protonirani ion ritlecitiniba pri  $m/z$  286 ( $[M+H]^+$ ), dok je ion pri  $m/z$  313 pripisan protoniranom ionu tofacitiniba ( $[M+H]^+$ ). Detektirani  $m/z$  signali u skladu su s teorijskim molekulskim masama navedenih spojeva te s literaturnim podacima (**slike 43 i 44**).

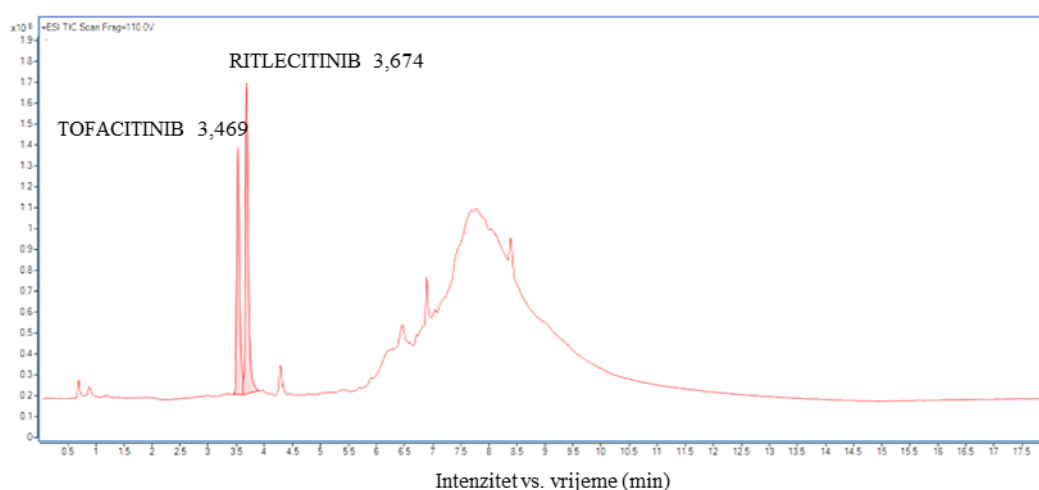


**Slika 43.** MS spektar tofacitiniba  $m/z = 313$



**Slika 44.** MS spektar ritlecitiniba  $m/z = 286$

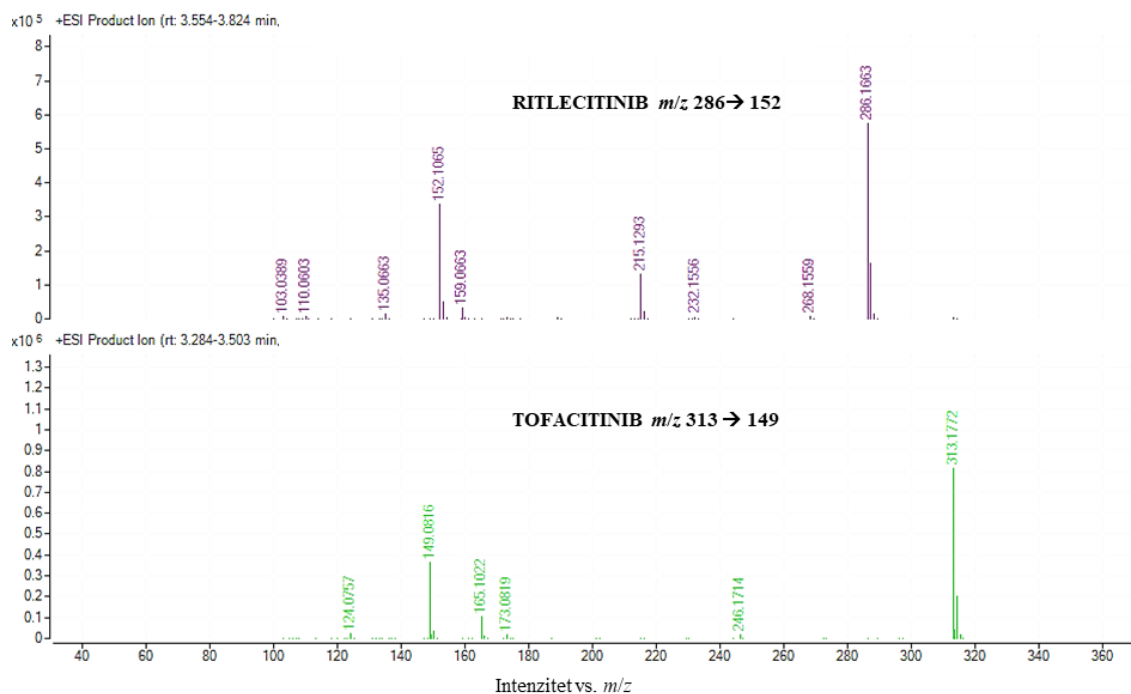
Na ESI-TIC kromatogramu uočena su dva dobro razdvojena pika. Ritlecitinib eluira pri vremenu zadržavanja  $t_R = 3,58$  min, a tofacitinib pri vremenu zadržavanja  $t_R = 3,31$  min (**slika 45**).



**Slika 45.** TIC kromatogram uzorka plazme obogaćenog standardnim otopinama ritlecitiniba i tofacitiniba

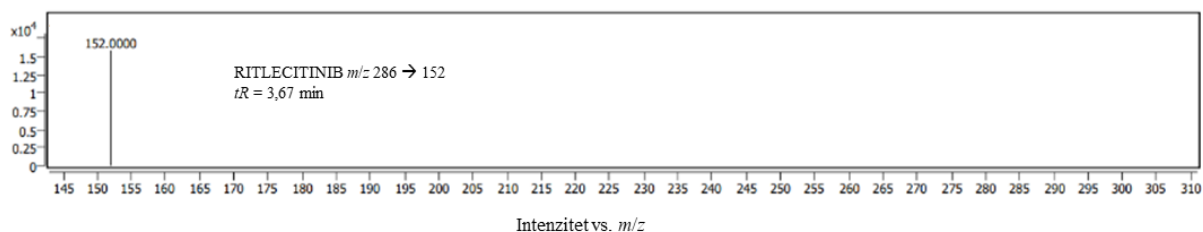
Na **slici 46** prikazani su EIC produkt ion kromatogrami koji daju uvid u fragmentacijsko ponašanje ritlecitiniba (prekursor ion  $m/z$  286) i tofacitiniba (prekursor ion  $m/z$  313). U spektru su identificirani karakteristični fragmentni ioni tofacitiniba pri  $m/z$  124, 149, 165, 173 i 246 i ritlecitiniba pri  $m/z$  152, 215, 232, uz nekoliko slabije izraženih fragmenata. Navedeni fragmenti su već opisani ranije vezano uz studiju prisilne razgradnje ritlecitiniba, što dodatno potvrđuje identitet analiziranog spoja i konzistentnost fragmentacijskog puta. Za kvantifikaciju

u plazmi odabrani su fragmenti najvećeg intenziteta signala, odnosno za ritlecitinib odabran je prijelaz  $m/z$  286  $\rightarrow$  152 dok je za tofacitinib odabran prijelaz  $m/z$  313  $\rightarrow$  149.



**Slika 46.** ESI-MS/MS spektri ritlecitiniba pri  $m/z$  286 i tofacitiniba  $m/z$  313

Za selektivnu detekciju i kvantifikaciju ritlecitiniba odabran je ranije spomenuti MRM prijelaz  $m/z$  286  $\rightarrow$  152 (**slika 47**), pri čemu prekursor ion  $m/z$  286 odgovara protoniranom molekulskom ionu ritlecitiniba, dok produkt ion  $m/z$  152 predstavlja najintenzivniji i najstabilniji fragment dobiven tijekom produkt ion. Odabir ovog prijelaza omogućio je visoku osjetljivost i selektivnost metode u složenoj matrici plazme.



**Slika 47.** MS spektar ritlecitiniba s odabranim MRM prijelazom u svrhu kvantifikacije u plazmi

Kao interni standard korišten je tofacitinib, za koji je praćen MRM prijelaz  $m/z$  313  $\rightarrow$  149. Odabir internog standarda sličnih fizikalno-kemijskih svojstava dodatno je doprinio točnosti i preciznosti kvantifikacije, kompenzirajući moguće varijacije tijekom pripreme uzoraka i instrumentalne analize.

Primjena prethodno optimiranih QQQ parametara (CE 40 eV, napon fragmentora 135 V), uz pažljivo odabrane MRM prijelaze, omogućila je pouzdanu, selektivnu i osjetljivu kvantifikaciju ritlecitiniba u uzorcima ljudske plazme.

#### 4.14. Prikladnost sustava za bioanalitičku metodu za određivanje ritlecitiniba u ljudskoj plazmi

Cilj ovog dijela istraživanja bila je razviti i optimirati bioanalitičku HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metodu za određivanje ritlecitiniba u uzorcima ljudske plazme. Kromatografski uvjeti primijenjeni u bioanalitičkoj metodi temeljili su se na prethodno razvijenoj i optimiranoj stabilitetno-indikativnoj metodi za ritlecitinib (*poglavlje 3.2.2.*), pri čemu su osnovni kromatografski parametri zadržani nepromijenjenima, dok su gradijent i ukupno vrijeme trajanja analize dodatno prilagođeni zahtjevima bioanalitičke metode.

Optimalna separacija ritlecitiniba postignuta je uporabom Kinetex EVO C18 analitičke kolone (3,0  $\times$  100 mm, 2,6  $\mu$ m) koja omogućuje visoku kromatografsku učinkovitost te uske i simetrične pikove. Mobilna faza sastojala se od ultračiste vode kao mobilne faze A i acetonitrila kao mobilne faze B, pri čemu su obje faze bile zakiseljene mravljom kiselinom (0,1 %). S obzirom na složenost biološke matrice i potrebu za odgovarajućim vremenom zadržavanja analita, primijenjen je gradijentni način elucije.

U odnosu na prethodno razvijenu stabilitetno-indikativnu metodu za ritlecitinib, gradijentni način elucije u bioanalitičkoj metodi dodatno je optimiran kako bi se omogućila učinkovita elucija spojeva s kolone uz istodobno postizanje zadovoljavajuće separacije i kraćeg vremena trajanja analize. Elucija je provedena prema sljedećem protokolu: 0–4 min 0–25 % B, 4–7 min 25–100 % B, 7–7,10 min 100 % B te 7,10–12 min 100–0 % B. Prilagodbom gradijentnog programa omogućeno je skraćenje ukupnog vremena analize uz zadržavanje zadovoljavajuće kromatografske separacije i osjetljivosti metode. Kromatografska analiza provedena je pri protoku mobilne faze od 0,55 mL/min i temperaturi kolone od 40,0  $\pm$  0,1 °C, uz volumen injektiranja od 5  $\mu$ L. Tijekom analize apsorbancija analita praćena je u spektralnom rasponu od

200 do 400 nm, dok je DAD detekcija provedena priv valnoj duljini od 280 nm uz širinu proreza od 4 nm.

Primjenom optimiranih kromatografskih uvjeta provedeno je ispitivanje prikladnosti sustava kako bi se potvrdila ponovljivost, stabilnost i pouzdanost kromatografskog sustava tijekom analize uzoraka ljudske plazme obogaćenih standardnom otopinom ritlecitiniba. Procijenjeni su parametri poput vremena zadržavanja, površine, čistoće i simetrije pika te kapaciteta za pikove. Eksperimentalno dobiveni rezultati prikazani su u tablici 18, a svi ispitani parametri udovoljavali su s važećim ICH Q2(R2) (60) i USP smjericama (106).

**Tablica 18.** Parametri prikladnosti sustava za novo razvijenu bioanalitičku metodu za određivanje ritlecitiniba u ljudskoj plazmi (koncentracija 250 ng/mL,  $n = 6$ ).<sup>a</sup>

Parametar	Simbol	Vrijednost	RSD (%)
Vrijeme zadržavanja (min)	$t_R$	3,51	0,25
Površina pika (mAU·s)	$A$	30452	1,29
Čistoća pika	$P$	999,99	0,01
Simetrija	$A_s$	1,1	0,26
Kapacitet pika	$P_c$	301,85	/

<sup>a</sup> Kriteriji prihvatljivosti: čistoća pika – više od 999,0, Simetrija pika – između 0,8 i 1,8.  
RSD – relativno standardno odstupanje

#### 4.15. Validacija bioanalitičke metode za određivanje ritlecitiniba u ljudskoj plazmi

Bioanalitička metoda za ritlecitinib validirana je u skladu sa smjericama ICH M10 (71). Validacijski postupak obuhvaćao je ispitivanje sljedećih parametara: selektivnosti, linearnosti, preciznosti, točnosti, utjecaja matrice, robusnosti, prijenosa, stabilnosti te integriteta razrjeđenja. Za optimizaciju pripreme uzoraka korišten je DAD detektor, dok je određivanje ritlecitiniba u uzorcima plazme provedeno primjenom masene spektrometrije gdje je praćen karakteristični prijelaz ritlecitiniba  $m/z$  286  $\rightarrow$  152. Odabrani prijelaz omogućio je pouzdano dokazivanje i određivanje ritlecitiniba u složenoj biološkoj matrici ljudske plazme.

Linearnost metode definira se kao sposobnost analitičke metode da unutar određenog radnog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji djelatne tvari u ispitivanom

uzorku. U ovom istraživanju, procjena linearnog odaziva detektora provedena je mjerenjem šest uzoraka plazme obogaćenih standardnom otopinom ritlecitiniba u koncentracijskom rasponu od 75 do 2000 ng/mL u triplikatu (**tablica 19**).

Kalibracijska krivulja dobivena MS detekcijom pokazala je linearnost u širem koncentracijskom rasponu od 75 do 2000 ng/mL, uz koeficijent korelacije od 0,99. Dobiveni rezultati potvrđuju zadovoljavajuću linearnost metode u ispitivanim koncentracijskim područjima.

Povratno izračunate koncentracije nalaze se unutar  $\pm 2,9$  % od nominalne koncentracije na svim ispitivanim koncentracijskim razinama što je unutar propisanog raspona do 15% od nominalne koncentracije za svaki kalibracijski standard te unutar 20 % za LLOQ.

**Tablica 19.** Podaci kalibracije bioanalitičke metode za određivanje ritlecitiniba u plazmi

Parametar validacije	Vrijednost
<i>Linearnost</i>	
Raspon (ng/mL)	75–2 000
Jednadžba	$y = 71,265 - 12003$
Standardna pogreška nagiba	3,405
Standardna pogreška odsječka	3515,236
Koeficijent korelacije ( $r$ )	0,993
Regresijska suma kvadrata	$1,14 \times 10^{10}$
Rezidualna suma kvadrata	80881405
Ukupno suma kvadrata	$1,14 \times 10^{10}$
LLOQ (ng/mL)	75

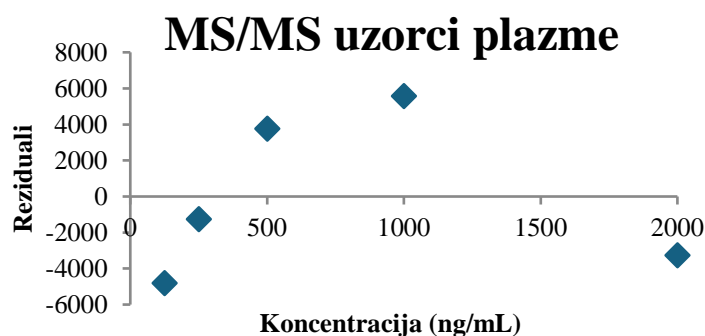
LLOQ – donja granica kvantifikacije

Dobivene vrijednosti regresijske analize potvrđuju dobru linearnost bioanalitičke metode u koncentracijskom rasponu od 75 do 2 000 ng/mL, što potvrđuje visoka vrijednost koeficijenta korelacije ( $r = 0,993$ ). Niska standardna pogreška nagiba i odječka ukazuju na dobru preciznost kalibracijskog modela. Visoka vrijednost regresijske sume kvadrata u odnosu na rezidualnu sumu kvadrata pokazuje da regresijski model objašnjava najveći dio varijabilnosti

eksperimentalnih podataka, odnosno da postoji dobra povezanost između koncentracije ritlecitiniba i odziva instrumenta. Istodobno, relativno niska rezidualna suma kvadrata ukazuje na mala odstupanja eksperimentalnih vrijednosti od regresijskog pravca, što potvrđuje dobru točnost i prikladnost linearnog modela za kvantitativnu analizu.

Vrijednost LLOQ od 75 ng/mL potvrđuje zadovoljavajuću osjetljivost metode za kvantitativno određivanje ritlecitiniba u plazmi pri niskim koncentracijama.

Analiza reziduala za MS/MS uzorke plazme (**slika 48**), ne ukazuje na prisutnost izražene sustavne pogreške u ispitivanom koncentracijskom rasponu. Reziduali su raspoređeni oko nulte vrijednosti bez uočenog trenda, dok se standardizirani reziduali u cijelosti nalaze unutar raspona od  $-1,07$  do  $+1,24$ , što potvrđuje homogenost varijance i ispunjenost pretpostavki linearnog regresijskog modela.



**Slika 48.** Graf reziduala u funkciji nominalne koncentracije ritlecitiniba u plazmi

Preciznost i točnost metode ispitane su u skladu s ICH M10 smjericama (71) analizom QC uzoraka na niskoj (75 ng/mL), srednjim (250 i 500 ng/mL) i visokoj koncentracijskoj razini (2 000 ng/mL) u peteroplikatu tijekom tri ponavljanja.

RSD vrijednosti za ispitivanje preciznosti bile su manje od 6,35 %, dok su analitički prinosi za ispitivanje točnosti bili u rasponu od 86,49 do 91,35 % s RSD vrijednostima nižim od 4,63 % što pokazuje zadovoljavajuću točnost i preciznost metode. Odstupanja izmjerenih koncentracija od nominalnih vrijednosti bila su unutar  $\pm 15$  % za sve QC razine, odnosno unutar  $\pm 20$  % na razini LLOQ, što je u skladu s prihvatljivim kriterijima ICH M10 smjernica.

Selektivnost metode ispitana je analizom slijepim uzorcima (uzorci matrice obrađeni bez dodavanja analita ili IS-a) te određivanjem čistoće pika. Kromatogrami slijepih uzoraka plazme nisu pokazivali interferencije pri vremenu zadržavanja ritlecitiniba niti unutarnjeg standarda,

dok je čistoća pika ritlecitiniba iznosila 999,78. Dobiveni rezultati ukazuju na to da ostale sastavnice plazme ne ometaju određivanje ritlecitiniba, čime je potvrđena dobra selektivnost razvijene metode.

Utjecaj matrice ispitan je usporedbom površina pikova ritlecitiniba u radnim otopinama standarda ritlecitiniba niske (50 ng/mL) i visoke (2000 ng/mL) koncentracije i uzorcima plazme obogaćenima standardnom otopinom ritlecitiniba u triplikatu.

Na temelju rezultata izračunat je matriks efekta (MF) kao omjera signala analita u uzorcima pripremljenima u plazmi prije i nakon ekstrakcije, uz korekciju pomoću unutarnjeg standarda. Pri koncentraciji od 75 ng/mL izračunati utjecaj matrice iznosio je 90,09 %, što upućuje na blagu ionsku supresiju uzrokovanu prisutnošću endogenih komponenti plazme, poput fosfolipida, koje mogu kompetitivno smanjiti učinkovitost ionizacije analita. Suprotno tome, pri koncentraciji od 2 000 ng/mL utjecaj matrice iznosio je 112,95 %, što ukazuje na blago ionsko pojačanje, odnosno povećanu učinkovitost ionizacije u prisutnosti matrice.

Promjena utjecaja matrice s porastom koncentracije pokazuje da utjecaj matrice nije konstantan, što je tipično za HPLC-MS/MS analizu bioloških uzoraka. Unatoč tome, zabilježena odstupanja od idealne vrijednosti od 100 % ostaju unutar prihvatljivih granica ( $\pm 15$  %), što ukazuje da utjecaj matrice ne utječe značajno na pouzdanost i preciznost kvantifikacije ritlecitiniba u plazmi.

Prijenos analita ispitan je analizom slijepog uzorka nakon analize uzorka plazme obogaćenom standardnom otopinom ritlecitiniba visoke koncentracije 2000 ng/mL. Površine pikova nastale prijenosom analita nisu prelazile 20 % površine pika LLOQ koncentracije čime je zadovoljen kriterij.

Integritet razrjeđenja ispitan je kako bi se procijenila pouzdanost metode pri analizi uzoraka s koncentracijama ULOQ. U tu svrhu pripremljen je uzorak plazme obogaćen standardnom otopinom ritlecitiniba koncentracije 10 000 ng/mL, koji je zatim razrjeđivan matricom na koncentracije 1000 i 2000 ng/mL. Analizom razrijeđenih uzoraka dobivene su RSD vrijednosti od 5,11 % za koncentraciju od 2 000 ng/mL te 6,11 % za koncentraciju od 1 000 ng/mL. Dobivene vrijednosti bile su unutar prihvatljivih granica propisanih važećim smjernicama, čime je potvrđen zadovoljavajući integritet razrjeđenja i mogućnost pouzdane analize uzoraka s koncentracijama iznad ULOQ nakon razrjeđenja.

Stabilnost ritlecitiniba u ljudskoj plazmi ispitana je u skladu s ICH M10 smjernicama u različitim uvjetima analizom uzoraka plazme obogaćene standardnom otopinom ritlecitiniba koncentracije 250 ng/mL.

Kratkoročna stabilnost na sobnoj temperaturi tijekom 4 sata potvrđena je analitičkim prinosom od 97,21 %. Za dugoročnu stabilnost pri  $-20^{\circ}\text{C}$  tijekom dva mjeseca utvrđen je analitički prinos od 91,08 %. Stabilnost uzoraka u autosampleru potvrđena je analitičkim prinosom od 98,11 %, dok je kod uzoraka podvrgnutih višestrukim ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja analitički prinos iznosio 99,65 %. Dobiveni analitički povrati u rasponu od 91,08 do 99,65 % čime je kriterij stabilnosti zadovoljen budući da odstupanja od nominalnih koncentracija vrijednosti ne prelaze  $\pm 15\%$ .

Robusnost metode ispitana je namjernim malim promjenama kromatografskih uvjeta. Promjena protoka mobilne faze za  $\pm 0,05$  mL/min rezultirala je RSD vrijednostima za površine pikova od 3,49 % pri protoku od 0,50 mL/min te 0,24 % pri protoku od 0,60 mL/min.

Promjenama temperature kolone dobivene su RSD vrijednosti za površine pikova od 6,20 % pri  $38^{\circ}\text{C}$  te 6,14% pri  $42^{\circ}\text{C}$ .

Nadalje, promjenom početnog sastava vodene mobilne faze za  $-1\%$  te zatim organske rezultirala je RSD vrijednošću za površine pikova od 2,01 % dok je povećanjem sastava vodene mobilne faze za  $+1\%$  te zatim organske dobivena RSD vrijednost za površine pikova od 1,9 %. Navedeni rezultati potvrđuju da je razvijena metoda robusna te da male varijacije analitičkih uvjeta ne utječu značajno na njezinu pouzdanost.

#### 4.16. Veživanje etrasimoda i ritlecitiniba na humani serumski protein

Veživanje etrasimoda i ritlecitiniba na humani serumski protein iz plazme ispitano je primjenom afinitetne kromatografije na biomimetičkoj HSA koloni s imobiliziranim humanim serumskim albuminom. Prije analize ispitivanih analita provedena je verifikacija kolone standardnim spojem varfarinom, koji se u literaturi koristi kao referentni ligand s dobro poznatim afinitetom prema HSA.

Rezultati verifikacije HSA kolone varfarinom prikazani su u **tablici 20**. Vremena zadržavanja izomera varfarina pokazala su dobru ponovljivost pri čemu su dobivene niske vrijednosti standardne devijacije i relativnog standardnog odstupanja ( $\text{RSD} < 2\%$ ). Niske RSD vrijednosti ukazuju na stabilnost sustava i ponovljivost interakcije varfarina s imobiliziranim HSA, čime

je potvrđena ispravnost i pouzdanost kolone za daljnja ispitivanja vezivanja lijekova na plazmatske proteine.

**Tablica 20.** Verifikacija HSA kolone varfarinom

Uzorak varfarina	Vrijeme zadržavanja (min) A	Vrijeme zadržavanja (min) B
1	5,145	5,562
2	5,158	5,570
3	5,131	5,805
4	5,156	5,544
5	5,159	5,578
6	5,158	5,576
Standardna devijacija	0,011	0,098
Srednja vrijednost	5,151	5,606
RSD	0,217	1,754

RSD – relativno standardno odstupanje

Na temelju kalibracijskih krivulja izračunat je stupanj vezivanja etrasimoda i ritlecitiniba na proteine plazme, a rezultati su prikazani u **tablici 20**. Etrasimod je pokazao izrazito visoko vezivanje na HSA, s prosječnom vrijednošću od 98,65 %, što upućuje na to da se u sistemskoj cirkulaciji nalazi gotovo u potpunosti vezan za plazmatske proteine. Visoko vezivanje etrasimoda u skladu je s njegovim lipofilnim karakterom i strukturnim značajkama koje pogoduju snažnim hidrofobnim interakcijama s albuminom.

Ritlecitinib je pokazao umjereno visoko vezivanje na HSA, s prosječnom vrijednošću od 81,37 %. U usporedbi s etrasimodom, niži stupanj vezivanja ritlecitiniba može se pripisati razlikama u kemijskoj strukturi i polarosti molekule, što rezultira slabijim interakcijama s hidrofobnim veznim mjestima albumina. Dobiveni rezultati ukazuju na veći udio slobodne frakcije ritlecitiniba u plazmi, što može imati značajne implikacije na njegovu farmakokinetiku i farmakodinamiku.

Radi usporedbe, u **tablici 21**, uključeni su i podaci za tofacitinib i ozanimod. Tofacitinib pokazuje relativno niži stupanj vezivanja na plazmatske proteine (83,40 %), dok ozanimod, slično etrasimodu, pokazuje vrlo visoko vezivanje (95,79 %). Ovi rezultati dodatno potvrđuju da spojevi iz iste ili slične terapijske skupine mogu pokazivati značajne razlike u vezivanju na HSA, što može utjecati na njihovu raspodjelu, eliminaciju i potencijalne interakcije s drugim lijekovima.

Visoko vezivanje etrasimoda na proteine plazme sugerira ograničenu slobodnu frakciju lijeka u sistemskej cirkulaciji, što može rezultirati duljim poluvijekom eliminacije i potencijalno većom osjetljivošću na kompetitivne interakcije s drugim lijekovima koji se vežu na ista vezna mjesta HSA. S druge strane, umjerenije vezivanje ritlecitiniba može omogućiti bržu raspoloživost slobodne frakcije, ali i veću varijabilnost koncentracija u plazmi.

Primjena afinitetne kromatografije s HSA kolonom pokazala se kao brza, reproducibilna i pouzdana metoda za procjenu vezivanja lijekova na proteine plazme te predstavlja vrijedan alat u ranim fazama farmakokinetičke karakterizacije novih terapijskih spojeva.

**Tablica 21.** Rezultati vezivanja na proteine plazme

Analit	HSA kolona			
	Vrijeme zadržavanja (min)	RSD <sup>a</sup> (%)	Standardna devijacija	Vezivanje (%)
Etrasimod	9,194	0,812	0,075	98,647
Ritlecitinib	2,017	0,329	0,007	81,366
Tofacitinib				83,399
Ozanimod				95,790

<sup>a</sup>  $n = 3$ , RSD – relativno standardno odstupanje

#### 4.17. Usporedna zelena procjena prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba

U skladu s načelima zelene analitičke kemije, studije prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba podvrgnute su sveobuhvatnoj procjeni ekološke održivosti primjenom više komplementarnih zelenih metričkih alata. Cilj takvog pristupa bio je sustavno sagledati utjecaj razvijenih analitičkih postupaka na okoliš, uz istodobno očuvanje analitičke pouzdanosti,

selektivnosti i informacijske vrijednosti dobivenih rezultata. Općenito, rezultati obje studije potvrđuju da je u području prisilne razgradnje teško postići idealne zelene uvjete, ponajprije zbog regulatorno propisanih stresnih uvjeta, nužne primjene organskih otapala te uporabe energetski zahtjevnih HPLC-MS/MS tehnika. Unatoč tim ograničenjima, razvijene metodologije pokazale su visoku razinu usklađenosti s načelima zelene analitičke kemije, pri čemu su slabosti jasno identificirane i argumentirane.

#### *Procjena potrošnje energije i AMGS analiza*

Analytical Method Greenness Score (AMGS) korišten je u obje studije prisilne razgradnje kao integrirani alat koji objedinjuje utjecaj instrumentacije, otapala te čimbenika okoliša i sigurnosti.

Dobiveni AMGS rezultat za prisilnu razgradnju etrasimoda iznosio je 629, dok je za ritlecitinib bio viši i iznosio 711,85. U oba slučaja, potrošnja potrošnja energije instrumenata predstavljala je najveći doprinos ukupnom rezultatu, s izraženijim udjelom u studiji ritlecitiniba (više od 60 % ukupne ocjene). Visoka potrošnja energije povezana je s primjenom HPLC-MS/MS tehnike. Ipak, korištenje masene spektrometrije u obje studije opravdana je dobivanjem ključnih informacija o strukturnoj karakterizaciji etrasimoda i ritlecitiniba te njihovih produkata razgradnje, pri čemu su u slučaju etrasimoda ti podaci po prvi put objavljeni u literaturi. Stoga, energetski se nedostatak metode može smatrati prihvatljivim kompromisom u kontekstu znanstvene vrijednosti rezultata.

#### *Analytical Eco-Scale (AES)*

Procjena ekološke prihvatljivosti pomoću AES alata pokazala je da obje metode pripadaju skupini izvrsnih zelenih analitičkih postupaka. Metoda prisilne razgradnje etrasimoda ostvarila je ukupni rezultat od 79, dok je metoda razvijena za ritlecitinib postigla višu ocjenu od 84. Najveći broj negativnih bodova u obje studije dodijeljen je zbog uporabe kemijskih stresora te stvaranja otpada.

#### *Piktogramski alati (MoGAPI i ComplexGAPI)*

Primjena piktogramskih alata omogućila je vizualnu identifikaciju ekološki najkritičnijih faza analitičkog postupka. U studiji etrasimoda, ComplexGAPI piktogram (prikazan u **tablica 22**) pokazao je prevladavanje zelenih polja, uz određeni broj žutih i crvenih polja povezanih s uporabom organskih otapala, modifikatora mobilne faze i velikim brojem analiza tijekom

razvoja i validacije metode. Heksagonalno polje ComplexGAPI alata dodatno je naglasilo utjecaj predanalitičkih procesa, osobito pripreme uzoraka prisilne razgradnje.

MoGAPI rezultat prisilne razgradnje etrasimoda iznosi 76 i ukazuje na to da je primijenjena analitička metoda dobro uravnotežena i prikladna za ispitivanje stabilnosti. Većina ocijenjenih kriterija nalazi se u zelenom i žutom području, što znači da metoda pokazuje zadovoljavajuću selektivnost, pouzdanost i robusnost u detekciji i razdvajanju produkata razgradnje. Ipak, prisutnost niže ocijenjenih elemenata, vidljivih kroz središnje crveno područje, upućuje na ekološko opterećenje, tj. potrošnju otapala ili zahtjevnosću provođenja uvjeta stresa. U cjelini, metoda se može smatrati prikladnom za provođenje studije prisilne razgradnje etrasimoda, ali postoji prostor za dodatnu optimizaciju kako bi se poboljšao ukupni MoGAPI rezultat.

U studiji prisilne razgradnje ritlecitiniba, MoGAPI piktogram ukazao je na uravnotežen raspored zelenih i žutih zona, uz ograničen broj crvenih polja koja se odnose na primjenu visokih temperatura i kemijskih stresora.

ComplexGAPI analiza za ritlecitinib dodatno je proširila ovu procjenu uključivanjem utjecaja predanalitičkih procesa. Piktogram je pokazao šest zelenih područja, dva žuta područja i jedno crveno područje unutar heksagonalne mreže. Crveno područje povezano je s provođenjem termičkih uvjeta stresa, dok su žuta područja pripisana uporabi kiselina, baza i oksidansa. Iako su količine korištenih stresora bile male, njihova primjena predstavlja neizbježan izvor ekološkog opterećenja u studijama prisilne razgradnje.

ComplexGAPI analiza potvrdila je da su predanalitički procesi glavni izvor ekološkog opterećenja, iako su korištene relativno male količine reagensa. Prema MoGAPI piktogramu, studija prisilne razgradnje ritlecitiniba pokazala je šest zelenih, šest žutih i dvije crvene zone. Žute zone (polja 10, 11, 14 i 15) povezane su s uporabom organskih otapala i mravlje kiseline kao modifikatora mobilne faze, što dovodi do stvaranja kemijskog otpada. Crvene zone (polja 4 i 7) pripisane su pripremi uzoraka prisilne razgradnje, posebice korištenju stresora i visokih temperatura. Treba naglasiti da su razvoj i validacija metode, kao i procjena kinetike razgradnje ritlecitiniba, zahtijevali veliki broj analiza uzoraka.

Uporaba stresnih uvjeta u studijama prisilne razgradnje je neizbježna, stoga smo tijekom razvoja metode prioritet stavili na minimizaciju veličine uzorka i vremena trajanja analize kao i na smanjenje otpada.

### *AGREE – ukupna zelena procjena metode*

Primjena AGREE alata rezultirala je identičnom ukupnom ocjenom od 0,71 za obje metode. Ova vrijednost ukazuje na visoku razinu usklađenosti s načelima zelene analitičke kemije, uz određena ograničenja. U oba slučaja, većina kriterija ocijenjena je zelenim nijansama, dok su najniže ocjene povezane s uporabom opasnih kemikalija za provođenje studija prisilne razgradnje, stvaranjem analitičkog otpada te nemogućnošću izravnog uzorkovanja.

### *AGREEprep – priprema uzoraka*

AGREEprep alat jasno je ukazao da je priprema uzoraka ekološki najzahtjevniji korak u obje studije prisilne razgradnje. Studija prisilne razgradnje etrasimoda ostvarila je ukupni rezultat 0,64, dok je za ritlecitinib dobiven nešto niži rezultat 0,58. Sigurnost analitičara, automatizacija postupka i uporaba potencijalno opasnih reagensa označeni kao glavne točke za buduće poboljšanje. U usporedbi sa zelenom procjenom ukupnog postupka prisilne razgradnje dobivenom AGREE pristupom, AGREEprep pristup pokazao je nižu ekološku prihvatljivost pripreme uzoraka.

### *Procjena praktičnosti (BAGI)*



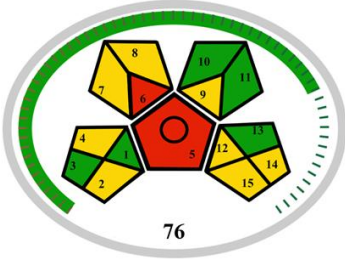
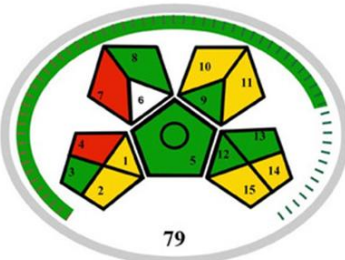


Posljednjih godina promovira se i koncept bijele analitičke kemije kao proširenje i nadopuna zelenoj analitičkoj kemiji. Ovaj pristup kombinira ekološke, analitičke i praktične aspekte analitičke metode. Kako bi se dobio sveobuhvatniji pristup održivosti predložene metode, primijenjen je BAGI izračun za studije prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba.

Dobiven je visok rezultat od 77,5 za etrasimod, odnosno 80 za ritlecitinib. Ovi rezultati potvrđuju da, unatoč određenim ekološkim ograničenjima, razvijene metode imaju visoku praktičnu vrijednost i primjenjivost u istraživačkom i rutinskom analitičkom radu te spadaju u "plavu" kategoriju (iznad 60), što ukazuje na dobru usklađenost s principima zelene analitičke kemije. Najveće prednosti predloženih metoda uključuju jednostavnu pripremu uzorka, malu količinu uzorka te korištenje široko dostupnih reagensa (kriteriji 1, 5, 7, 8 i 10 označeni su tamnoplavom bojom). Poluautomatizirani uređaji korišteni su za pripremu uzoraka, zbog čega su kriteriji 4 i 9 označeni plavom bojom što ukazuje na zadovoljavajuću usklađenost s većinom načela bijele analitičke kemije. S druge strane, ograničeni kapacitet analize uzoraka po satu, mogućnost istovremene analize više analita te zahtjevi za instrumentacijom uzrokovali su da kriteriji 2, 3 i 6 budu označeni svijetloplavom bojom. Nijedan aspekt metode nije označen bijelom bojom, što bi ukazivalo na potpunu neusklađenost s načelima bijele analitičke kemije.

Usporedbom s ritlecitinibom, etrasimod ima: duže trajanje analize, veći broj MS/MS analiza te složeniju interpretaciju rezultata što je rezultiralo nešto nižim rezultatom.

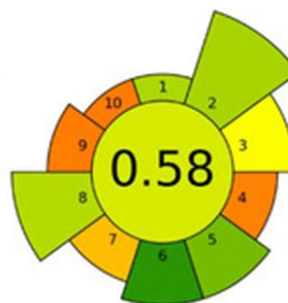
Usporedna analiza, prikazana u **tablici 21**, pokazuje da su studije prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba ekološki usporedive te pokazuju sličan ukupni zeleni profil. Glavne slabosti obje metodologije proizlaze iz same prirode prisilne razgradnje i regulatornih zahtjeva, dok su prednosti vidljive u optimizaciji volumena uzorka, skraćivanju vremena analize i visokoj selektivnosti HPLC-MS/MS metoda. Dobiveni rezultati potvrđuju da se, uz sustavnu primjenu više zelenih metričkih alata, čak i složene analitičke metode mogu razviti u skladu s načelima održive analitičke kemije.

**Tablica 22.** Usporedba rezultata zelene procjene studija prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba

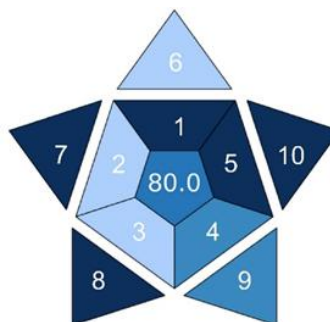
Zeleni metrički alat	Etrasimod	Ritlecitinib
AGREE		
MoGAPI		
ComplexGAPI		

---

AGREEprep



BAGI



Analytical Eco-Scale

79

84

AMGS

629

711,85

---

#### 4.18. Usporedna zelena procjena novorazvijenih bioanalitičkih metoda za etrasimod i ritlecitinib

U skladu s načelima zelene analitičke kemije, novorazvijene bioanalitičke metode za određivanje etrasimoda i ritlecitiniba u plazmi podvrgnute su usporednoj procjeni ekološke prihvatljivosti primjenom više komplementarnih zelenih metričkih alata.

Cilj ove procjene bio je sagledati ukupni okolišni utjecaj razvijenih metoda, uzimajući u obzir specifičnosti bioanalitičkih postupaka, osobito složenost biološke matrice, nužnost pripreme uzorka te primjenu energetski zahtjevne HPLC-MS instrumentacije.

Obje metode temelje se primjeni tehnike HPLC-DAD-QQQ-MS/MS uz gradijentni način eluacije i sličan sastav mobilne faze (A: ultra čista voda s 0,1 % mravlje kiseline; B: acetonitril s 0,1 % mravlje kiseline). Priprema uzoraka u oba slučaja uključuje taloženje proteina metanolom, uklanjanje zaostalih fosfolipida primjenom Phree™ Phospholipid removal filtara

te uparavanje uzoraka do suha, što predstavlja značajan, ali neizbježan izvor ekološkog opterećenja u bioanalitičkim ispitivanjima plazme.

Razlika između dviju metoda prvenstveno se očituje u vremenu trajanja analize i protoku mobilne faze. Analiza etrasimoda traje 13 minuta pri protoku od 0,8 mL/min, dok analiza ritlecitiniba traje 18 minuta pri nižem protoku od 0,55 mL/min. Unatoč tim razlikama, ukupna potrošnja mobilne faze po analizi u oba slučaja iznosi približno 10 mL, što rezultira sličnim količinama generiranog kemijskog otpada.

#### *Analytical Eco-scale (AES)*

Procjena ekološke prihvatljivosti primjenom AES alata pokazala je identičan rezultat za obje metode (71 bod), čime se one svrstavaju u kategoriju prihvatljivo zelenih analitičkih postupaka. Najveći broj kaznenih bodova dodijeljen je zbog uporabe organskih otapala (acetonitril i metanol), stvaranja opasnog organskog otpada te visoke potrošnje energije povezane s HPLC-MS instrumentacijom. Dobiveni rezultat u skladu je s literaturnim podacima, prema kojima se većina HPLC-MS bioanalitičkih metoda nalazi u rasponu od 65 do 75 bodova.

#### *Procjena potrošnje energije i AMGS analiza*

AMGS analiza dodatno je naglasila dominantan utjecaj instrumentacije i pripreme uzoraka na ukupni okolišni otisak metoda. Metoda razvijena za ritlecitinib pokazala je viši AMGS rezultat (1104,67) u odnosu na etrasimod (799,60), što se može pripisati duljem vremenu analize i većem ukupnom energetsom opterećenju. Vizualni piktogramski alati korišteni u procjeni bioanalitičkih metoda omogućili su detaljniji uvid u ekološki najkritičnije faze analitičkog postupka te jasnu identifikaciju kompromisa između analitičke učinkovitosti i održivosti. Budući da su obje metode razvijene za određivanje analita u složenoj biološkoj matrici (plazmi), očekivano je da predanalitički koraci i priprema uzoraka imaju značajan utjecaj na ukupni zeleni profil metode.

#### *AGREE piktogram*

AGREE piktogrami za bioanalitičke metode etrasimoda i ritlecitiniba, **prikazani u tablici 23**, pokazuju isti raspored boja i ukupni rezultat (0,72). Prevladavanje zelenih i svijetlozelenih nijansi upućuje na dobru usklađenost s većinom načela zelene analitičke kemije. Posebno povoljno ocijenjeni kriteriji uključuju izostanak derivatizacije, visoku selektivnost metode zahvaljujući HPLC-MS detekciji te relativno malu količinu uzorka potrebnu za analizu.

S druge strane, žuta i narančasta polja vidljiva su u segmentima koji se odnose na pripremu uzoraka, potrošnju energije i generiranje otpada. Ovi elementi povezani su s nužnom primjenom organskih otapala (metanol i acetonitril), složenom obradom biološke matrice te korištenjem energetski zahtjevnih HPLC-MS instrumentacije. Važno je naglasiti da su navedena ograničenja zajednička većini bioanalitičkih HPLC-MS metoda te se stoga ne mogu u potpunosti izbjeći.

#### *MoGAPI analiza*

MoGAPI piktogrami (**tablica 22**) za obje bioanalitičke metode dodatno potvrđuju uravnotežen zeleni profil postupaka. Većina kriterija nalazi se u zelenom i žutom području, što ukazuje na dobru analitičku izvedbu uz umjeren ekološki utjecaj. Zelena polja dominantno su povezana s analitičkim dijelom metode, uključujući selektivnost, pouzdanost, odsutnost derivatizacije i prikladnost metode za rutinsku primjenu.

Žuta polja u MoGAPI piktogramu odnose se ponajprije na uporabu organskih otapala u pripremi uzorka i mobilnoj fazi, kao i na stvaranje kemijskog otpada. U središnjem dijelu piktograma nema izraženih crvenih zona, što ukazuje na to da metoda ne sadrži izrazito ekološki nepovoljne elemente, poput ekstremno toksičnih reagensa ili izrazito energetski intenzivnih dodatnih postupaka. Ovakav raspored polja potvrđuje da su razvijene bioanalitičke metode dobro optimizirane unutar realnih ograničenja bioanalitičkih ispitivanja.

#### *GAPI i ComplexGAPI piktogrami*

Primjena GAPI i ComplexGAPI alata omogućila je detaljniju analizu pojedinih faza postupka, s posebnim naglaskom na predanalitičke procese. GAPI piktogrami za obje metode pokazuju sličan raspored boja, pri čemu su analitički koraci uglavnom označeni zelenim i žutim poljima, dok su predanalitički koraci češće povezani s žutim poljima.

ComplexGAPI piktogram dodatno naglašava da su priprema uzoraka i obrada biološke matrice ključni izvori ekološkog opterećenja. Heksagonalni dio piktograma pokazuje prisutnost žutih i povremeno crvenih polja, koja su izravno povezana s taloženjem proteina metanolom, uklanjanjem fosfolipida pomoću Phree™ Phospholipid removal filtera te uparavanjem uzoraka do suha. Ovi koraci zahtijevaju uporabu organskih otapala, dodatnu opremu i energiju, ali su neophodni kako bi se osigurala pouzdana kvantifikacija analita u plazmi i smanjio utjecaj matrice u MS detekciji.

Unatoč tome, većina polja u ComplexGAPI piktogramu ostaje zelena ili žuta, što ukazuje na dobru optimizaciju predanalitičkih postupaka, osobito u pogledu volumena uzorka, ograničene količine korištenih reagensa i izostanka višestrukih ekstrakcijskih koraka.

#### *AGREEprip – priprema uzoraka*

AGREEprip piktogram jasno identificira pripremu uzoraka kao ekološki najzahtjevniju fazu bioanalitičkih metoda za oba analita. Najniže ocjene odnose se na korištenje organskih otapala, sigurnost analitičara te ograničenu automatizaciju postupka.

Istodobno, pozitivno su ocijenjeni mala količina uzorka i umjerena potrošnja energije po analizi. Važno je naglasiti da su isti AGREEprip rezultati (0,56) dobiveni za studije prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba, što je posljedica primjene identičnog protokola pripreme uzoraka. Time se može potvrditi da razlike u zelenom profilu dviju metoda ne proizlaze iz pripreme uzoraka, već prvenstveno iz razlika u vremenu trajanja analize i energetske opterećenju instrumentacije.

#### *BAGI – procjena praktičnosti bioanalitičkih metoda*

Kako bi se zelena procjena bioanalitičkih metoda proširila i na aspekte primjenjivosti i funkcionalnosti u rutinskom analitičkom radu, proveden je i BAGI izračun. BAGI piktogrami za bioanalitičke metode etrasimoda i ritlecitiniba pokazuju vrlo sličan raspored boja, s prevladavanjem tamnoplavih i plavih polja, što ukazuje na visoku razinu praktične primjenjivosti obje metode. Najpovoljnije ocijenjeni kriteriji odnose se na jednostavnost i ponovljivost pripreme uzoraka, uporabu široko dostupnih reagensa, dobru selektivnost i osjetljivost metode te mogućnost pouzdane kvantifikacije analita u složenoj biološkoj matrici. Ovi elementi potvrđuju da su obje metode prikladne za rutinsku bioanalitičku primjenu, uključujući farmakokinetička ispitivanja.

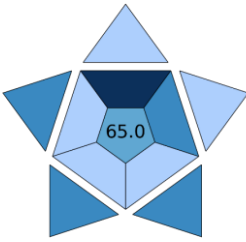
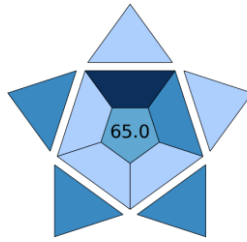


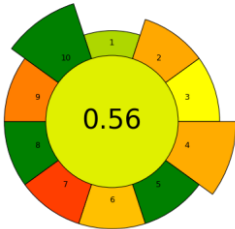
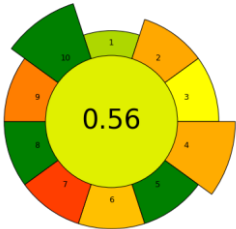
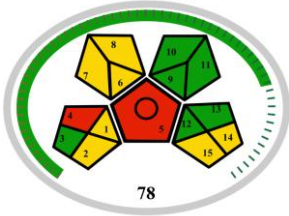
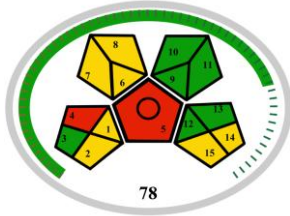


Plava polja u BAGI piktogramu povezana su s djelomičnom automatizacijom pripreme uzoraka i instrumentacijom. Iako je priprema uzoraka u velikoj mjeri manualna, korištenje standardiziranih komercijalnih filtara za uklanjanje fosfolipida doprinosi boljoj ponovljivosti i smanjenju varijabilnosti, što je pozitivno ocijenjeno s aspekta praktičnosti i robusnosti metode.

Svijetloplava polja u BAGI piktogramu odnose se na ograničenu propusnost analize uzoraka po satu te visoke zahtjeve za instrumentacijom (HPLC-MS). Ovi aspekti predstavljaju očekivana ograničenja bioanalitičkih HPLC-MS metoda, osobito kada je naglasak na visokoj selektivnosti i niskim granicama dokazivanja. Važno je istaknuti da u BAGI piktogramu nije

prisutno nijedno bijelo polje, što bi upućivalo na potpunu neusklađenost s kriterijima praktične primjenjivosti. To potvrđuje da, unatoč određenim ekološkim i tehničkim ograničenjima, razvijene bioanalitičke metode imaju visoku uporabnu vrijednost i dobru ravnotežu između održivosti, analitičke kvalitete i praktične izvedivosti.

U usporedbi dviju metoda, bioanalitička metoda za etrasimod pokazuje blagu prednost u pogledu propusnosti zbog kraćeg vremena analize (13 min), dok metoda za ritlecitinib, iako dulja (18 min), ostvaruje sličan BAGI profil zahvaljujući nižem protoku mobilne faze i dobroj optimizaciji kromatografskih uvjeta. Ove razlike ne utječu značajno na ukupnu BAGI ocjenu, što dodatno potvrđuje da su obje metode podjednako prikladne za rutinsku bioanalitičku primjenu. Sveukupno, usporedna zelena procjena, prikazana u **tablici 23**, pokazuje da su bioanalitičke metode za etrasimod i ritlecitinib ekološki vrlo usporedive te imaju sličan ukupni zeleni profil. Predanalitički koraci, osobito obrada plazme, predstavljaju glavni izvor ekološkog opterećenja, dok je analitički dio metode relativno dobro optimiziran. Unatoč neizbježnim ograničenjima povezanim s bioanalitičkom HPLC-MS analizom, razvijene metode postižu dobru ravnotežu između analitičke učinkovitosti i održivosti te su u velikoj mjeri usklađene s načelima zelene analitičke kemije.

**Tablica 23.** Usporedba rezultata zelene procjene bioanalitičkih metoda za etrasimod i ritlecitinib

Zeleni metrički alat	Etrasimod	Ritlecitinib
BAGI		
ComplexGAPI		
AGREEprep		
MoGAPI		
AGREE		

---

Analytical Eco-Scale	71	71
AMGS	799,60	1104,67

---

#### 4.19. Usporedba zelene procjene prisilne razgradnje i bioanalitičkih metoda

Usporedba rezultata zelene procjene pokazuje da bioanalitičke metode za etrasimod i ritlecitinib ostvaruju niže BAGI i AMGS rezultate u odnosu na metode prisilne razgradnje, što je izravna posljedica složenije pripreme uzoraka i rada s biološkom matricom. U studijama prisilne razgradnje dominantni izvori ekološkog opterećenja povezani su s primjenom kemijskih stresora i povišenih temperatura, dok su u bioanalitičkim metodama ključni ograničavajući čimbenici složenija priprema uzoraka, uporaba organskih otapala i energetski zahtjevna HPLC-MS instrumentacija.

Unatoč tim razlikama, obje skupine metoda pokazuju dobru usklađenost s načelima zelene analitičke kemije i sličan ukupni zeleni profil. Rezultati potvrđuju da se, uz optimizaciju eksperimentalnih uvjeta, metode prisilne razgradnje i bioanalitičke analize mogu provoditi na održiv način, uz očuvanje analitičke pouzdanosti i relevantnosti dobivenih podataka.

## 5. ZAKLJUČAK

Ova doktorska disertacija pruža cjelovit i sustavno utemeljen analitički pristup proučavanju stabilnosti, razgradnje, kompatibilnosti i bioanalitičkog određivanja etrasimoda i ritlecitiniba, dviju farmaceutski djelatnih tvari s različitim kemijskim i fizikalnim svojstvima, u ljudskoj plazmi. Razvoj i primjena stabilitetno-indikativnih i bioanalitičkih metoda temeljili su se na HPLC-DAD-QQQ-MS/MS tehnici, pri čemu je poseban naglasak stavljen na pouzdanost validacije, masenu karakterizaciju produkata razgradnje, optimizaciju pripreme uzoraka te procjenu ekološke i praktične prihvatljivosti razvijenih metoda.

Studije prisilne razgradnje provedene su u skladu s ICH Q1A(R2) i Q1B smjernicama (58,59), primjenom kiselih, bazičnih, oksidativnih, termičkih i fotolitičkih uvjeta stresa, uz ciljanu razgradnju od približno 10–20 %. Etrasimod je pokazao izraženu osjetljivost na kiselu, oksidativnu i fotolitičku razgradnju, dok je bio stabilan u bazičnim i termičkim uvjetima. Tijekom ovih ispitivanja identificirano je ukupno osam novih produkata razgradnje etrasimoda (DP1–DP8), koji prethodno nisu bili opisani u literaturi. Sedam od osam produkata nastalo je pod fotolitičkim stresom, pri čemu su pojedini produkti, poput DP1, DP3 i DP5, nastali isključivo izlaganjem dnevnom svjetlu. Kinetička analiza pokazala je da razgradnja etrasimoda slijedi kinetiku prvog reda, s najvišom konstantom brzine razgradnje u kiselim uvjetima ( $k_1 = 0,022 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Razvijena stabilitetno-indikativna metoda omogućila je potpuno razdvajanje etrasimoda i svih njegovih produkata razgradnje, uz čistoću pika veću od 999 i rezoluciju između susjednih pikova veću od 1,5 u svim stresnim uzorcima.

Ritlecitinib je pri kiselim, termičkim i fotolitičkim uvjetima pokazao je visoku stabilnost, s gubitkom manjim od 1 %, dok je bio osjetljiv na bazičnu i oksidativnu razgradnju. Bazična hidroliza dovela je do približno 12,6 % razgradnje unutar 72 sata, uz nastanak tri produkta razgradnje, dok je oksidativni stres rezultirao 9,5 % razgradnje unutar 48 sati i nastankom dodatnog produkta razgradnje. Nastali produkti razgradnje strukturno su okarakterizirani primjenom HPLC-DAD-QQQ-MS/MS- metode koja je pokazala visoku selektivnost, s čistoćom pika većom od 999,1 i razlučivošću između ritlecitiniba i produkata razgradnje većom od 6,5. Kinetička analiza pokazala je da razgradnja ritlecitiniba ovisi o primijenjenom stresnom uvjetu; bazična razgradnja slijedila je kinetiku drugog reda s konstantom brzine  $k_2 = 0,000016 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , dok je oksidativna razgradnja bila opisiva kinetikom nultog reda s konstantom brzine  $k_0 = 0,181 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Masena spektrometrija imala je ključnu ulogu u ovom radu, omogućujući detaljnu strukturnu karakterizaciju djelatnih tvari i njihovih produkata razgradnje. Fragmentacijski obrasci etrasimoda i ritlecitiniba, dobiveni MS/MS eksperimentima, omogućili su pouzdanu potvrdu struktura i razjašnjenje dominantnih putova razgradnje. Posebno je značajno da su za etrasimod po prvi put predloženi fragmentacijski mehanizmi za svih osam produkata razgradnje, čime je značajno prošireno postojeće znanje o njegovoj kemijskoj stabilnosti. U slučaju ritlecitiniba, predloženi obrasci fragmentacije u skladu su s ograničenim literaturnim podacima, ali su dodatno identificirani novi fragmenti zahvaljujući optimizaciji MS parametara.

Razvijene stabilitetno-indikativne metode za etrasimod i ritlecitinib uspješno su validirane, pri čemu su pokazale visoku linearnost ( $r > 0,998$ ), zadovoljavajuću preciznost ( $RSD < 2\%$ ) te točnost (analitički prinosi u rasponu od 99,9 % do 102,0 %) na svim ispitivanim koncentracijskim razinama. Bioanalitičke HPLC-DAD-QQQ-MS/MS metode za određivanje etrasimoda i ritlecitiniba u plazmi validirane su u skladu s ICH M10 smjernicama te su pokazale zadovoljavajuću linearnost ( $r > 0,99$ ), točnost i preciznost gdje su odstupanja izmjerenih koncentracija od nominalnih vrijednosti bila su unutar  $\pm 15\%$  za sve QC razine, odnosno unutar  $\pm 20\%$  na razini LLOQ. Optimizirani predanalitički postupak, koji je uključivao taloženje proteina metanolom, uklanjanje fosfolipida Phree™ Phospholipid removal filtrima i uparavanje uzoraka do suha, omogućio je učinkovito smanjenje utjecaja matrice i postizanje ponovljivih rezultata, uz postizanje visokih vrijednosti ekstrakcijskih učinkovitosti.

Studije kompatibilnosti etrasimoda i ritlecitiniba s odabranim pomoćnim tvarima (kitozan, hijaluronska kiselina i ksantan guma) pokazale su da ne dolazi do značajnih kemijskih interakcija u čvrstom stanju. Rezultati XRD, FTIR, DTA-TGA i SEM-EDS analiza upućuju na očuvanje kristalne strukture djelatnih tvari te odsutnost novih faza ili kemijskih promjena, što potvrđuje njihovu kompatibilnost s ispitanim pomoćnim tvarima i daje važnu eksperimentalnu osnovu za daljnji razvoj farmaceutskih formulacija.

Zelena analitička procjena razvijenih metoda provedena je primjenom više komplementarnih metričkih alata, čime je omogućeno objektivno sagledavanje njihove ekološke prihvatljivosti i praktične primjenjivosti. Metode prisilne razgradnje etrasimoda i ritlecitiniba pokazale su visoku razinu ekološke prihvatljivosti, s AES vrijednostima od 79 i 84, što ih svrstava u skupinu izvrsnih zelenih analitičkih postupaka. Bioanalitičke metode, iako zahtjevnije zbog rada s

biološkom matricom i višestupanjskih predanalitičkih koraka, ostvarile su AES rezultat od 71 boda za oba analita, čime su klasificirane kao prihvatljivo zelene HPLC-MS metode.

AGREE vrijednosti u rasponu od 0,71 do 0,72 potvrđuju dobru usklađenost razvijenih metoda s načelima zelene analitičke kemije, dok AMGS rezultati (629–711,85 za prisilnu razgradnju i 799,60–1104,67 za bioanalitičke metode) jasno ukazuju na dominantan utjecaj potrošnje energije instrumentacije i složenosti predanalitičkih postupaka na ukupno okolišno opterećenje. Piktogramski alati MoGAPI, GAPI, ComplexGAPI i AGREEprep dodatno su potvrdili da priprema uzoraka predstavlja ekološki najzahtjevniju fazu bioanalitičkih metoda.

Primjenom BAGI alata potvrđena je visoka praktična primjenjivost stabilitetno-indikativnih metoda (77,5–80 bodova) te prihvatljiva praktičnost bioanalitičkih metoda (65 bodova). Sveukupno, rezultati zelene analitičke procjene pokazuju da razvijene metode postižu uravnotežen odnos između analitičke pouzdanosti, regulatorne prihvatljivosti i ekološke održivosti.

## 6. LITERATURA

1. Blackwell J, Saxena S, Jayasooriya N, Bottle A, Petersen I, Hotopf M, et al. Prevalence and duration of gastrointestinal symptoms before diagnosis of inflammatory bowel disease and predictors of timely specialist review: a population-based study. *J Crohns Colitis*. 2021;15:203–211.
2. Sandborn WJ, Vermeire S, Peyrin-Biroulet L, Dubinsky MC, Panes J, Yarur A, et al. Etrasimod as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis (ELEVATE): two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 studies. *Lancet*. 2023;401(10383):1159–1171.
3. Spencer EA, Agrawal M, Jess T. Prognostication in inflammatory bowel disease. *Front Med*. 2022;9:1025375.
4. Lucaciu L, Seicean R, Seicean A. Small molecule drugs in the treatment of inflammatory bowel diseases: which one, when and why? A systematic review. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020;32:669–677.
5. Ben Ghezala I, Charkaoui M, Michiels C, Bardou M, Luu M. Small molecule drugs in inflammatory bowel diseases. *Pharmaceuticals*. 2021;14:637.
6. Pérez-Jeldres T, Tyler CJ, Boyer JD, Karuppuchamy T, Yarur A, Giles DA, et al. Targeting cytokine signalling and lymphocyte traffic via small molecules in inflammatory bowel disease: JAK inhibitors and S1PR agonists. *Front Pharmacol*. 2019;10:212.
7. Dal Buono A, Gabbiadini R, Alfarone L, Solitano V, Repici A, Vetrano S, et al. Sphingosine 1-phosphate modulation in inflammatory bowel diseases: keeping lymphocytes out of the intestine. *Biomedicines*. 2022;10:1735.
8. Bencardino S, D'Amico F, Faggiani I, Bernardi F, Allocca M, Furfaro F, et al. Efficacy and safety of S1P1 receptor modulator drugs for patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *J Clin Med*. 2023;12:5014.
9. Wang J, Goren I, Yang B, Lin S, Li J, Elias M, et al. The sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor axis – a unique therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022;55:277–291.
10. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:720–727.
11. Jairath V, Feagan BG. Global burden of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2020;5:2–3.

12. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017;390(10080):1756–1770.
13. Kovačić J, Jeličić ML, Amidžić Klarić D, Mornar A. Green solid-phase (micro)extraction of andrographolides from human plasma samples followed by UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS analysis. *Separations*. 2023;10:69.
14. D’Haens GR, van Deventer SJ. 25 years of anti-TNF treatment for inflammatory bowel disease: lessons from the past and a look to the future. *Gut*. 2021;70:1396–1405.
15. Peyrin-Biroulet L, Van Assche G, Sturm A, Gisbert JP, Gaya DR, Bokemeyer B, et al. Treatment satisfaction, preferences and perception gaps between patients and physicians in the ulcerative colitis CARES study. *Dig Liver Dis*. 2016;48:601–607.
16. Cai Z, Wang S, Li J. Treatment of inflammatory bowel disease: a comprehensive review. *Front Med*. 2021;8:765474.
17. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140:1785–1794.
18. Ben-Horin S, Kopylov U, Chowers Y. Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014;13:24–30.
19. Jefremow A, Neurath MF. Novel small molecules in IBD: current state and future perspectives. *Cells*. 2023;12:1730.
20. Argollo M, Furfaro F, Gilardi D, Roda G, Allocca M, Peyrin-Biroulet L, et al. Modulation of sphingosine-1-phosphate in ulcerative colitis. *Expert Opin Biol Ther*. 2020;20:413–420.
21. Darmadi D, Ariestine DA, Ahmad H, Sitepu YIF. Efficacy and safety of sphingosine-1-phosphate receptor modulators in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterol Hepatol From Bed to Bench*. 2025;18(2):120–131.
22. Coyle PK, Freedman MS, Cohen BA, Cree BA, Markowitz CE. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis treatment: a practical review. *Ann Clin Transl Neurol*. 2024;11(4):842–855.
23. Choi D, Stewart AP, Bhat S. Ozanimod: a first-in-class sphingosine 1-phosphate receptor modulator for the treatment of ulcerative colitis. *Ann Pharmacother*. 2022;56:592–599.
24. Shirley M. Etrasimod: first approval. *Drugs*. 2024;84:247–254.
25. López-Sanromán A, Gisbert JP, McNicholl AG. Etrasimod: review of efficacy and therapeutic prospects. *Gastroenterol Hepatol (Engl Ed)*. 2025;48(2):198–210.

26. Martínez-Molina C, González-Suárez B. Etrasimod: modulating sphingosine-1-phosphate receptors to treat ulcerative colitis. *J Clin Med*. 2025;14(11):3890.
27. European Medicines Agency (EMA). Velsipity (etrasimod): summary of product characteristics. Amsterdam: EMA; 2024. Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/velsipity-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/velsipity-epar-product-information_hr.pdf). (Pristupljeno: 30.11.2025.)
28. MedlinePlus. Etrasimod drug information. U.S. National Library of Medicine. 2024. Dostupno na: <https://medlineplus.gov/druginfo>. Pristupljeno 13.11.2025.
29. Yarur AJ, Reinisch W, Chang S, Gecse KB, Green J, Abbatemarco AM, Wu J, Goetsch M, Lazin K, Pradeep G, Sands BE. Efficacy of Etrasimod in Ulcerative Colitis: Analysis of ELEVATE UC 52 and ELEVATE UC 12 by Baseline Endoscopic Severity. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2026;24(1):210-220.
30. Kotsiliti E. FDA approvals in gastroenterology and hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024;21:219.
31. Scott FL, Clemons B, Brooks J, Brahmachary E, Powell R, Dedman H, et al. Ozanimod (RPC1063) is a potent sphingosine-1-phosphate receptor-1 and -5 agonist with autoimmune disease-modifying activity. *Br J Pharmacol*. 2016;173:1778–1792.
32. Chun J, Hartung HP. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol*. 2010;33:91–101.
33. Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2024 update. *Pharmacol Res*. 2024;200:107059.
34. Taylor PC, Choy E, Baraliakos X, Szekanecz Z, Xavier RM, Isaacs JD, et al. Differential properties of Janus kinase inhibitors in the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2024;63:298–308.
35. Gadina M. JAK inhibitors: is specificity at all relevant? *Semin Arthritis Rheum*. 2024;64(Suppl):152327.36.
36. The Lancet Rheumatology. JAK inhibitors—Friend or Foe? *Lancet Rheumatol*. 2024, 6, e129.
37. Herrera-deGuise C, Serra-Ruiz X, Lastiri E, Borrueal N. JAK inhibitors: a new dawn for oral therapies in inflammatory bowel diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1089099.
38. Tanaka Y, Luo Y, O'Shea JJ, Nakayamada S. Janus kinase-targeting therapies in rheumatology: a mechanisms-based approach. *Nat Rev Rheumatol*. 2022;18:133–145.

39. Kim JW, Kim SY. The era of Janus kinase inhibitors for inflammatory bowel disease treatment. *Int J Mol Sci.* 2021;22:11322.
40. Blair HA. Ritlecitinib: first approval. *Drugs.* 2023;83:1315–1321.
41. Zelesky T, Baertschi SW, Foti C, Allain LR, Hostyn S, Franca JR, et al. Pharmaceutical forced degradation (stress testing) endpoints: a scientific rationale and industry perspective. *J Pharm Sci.* 2023;112:2948–2964.
42. European Medicines Agency (EMA). Litfulo (ritlecitinib): summary of product characteristics. Amsterdam: EMA; 2024. Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/litfulo-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/litfulo-epar-product-information_hr.pdf). (Prostupljeno 01.12.2025.)
43. Yan T, et al. Comparative efficacy and safety of JAK inhibitors in the treatment of moderate-to-severe alopecia areata: a systematic review and network meta-analysis. *Front Pharmacol.* 2024;15:1372810.
44. Ramírez-Marín HA, Tosti A. Evaluating the therapeutic potential of ritlecitinib for the treatment of alopecia areata. *Drug Des Devel Ther.* 2022;16:363–374.
45. Sandborn WJ. Efficacy and safety of ritlecitinib and brepocitinib in ulcerative colitis: a phase 2b study. *Gastroenterology.* 2023;164(4):845–857.
46. Wojciechowski J, Mukherjee A, Banfield C, Nicholas T. Model-informed assessment of probability of phase 3 success for ritlecitinib in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Clin Pharmacol Ther.* 2024;116(3):724–735.
47. ClinicalTrials.gov. Studies NCT05576876, NCT02958865 Dostupno na: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02958865>. (Pristupljeno 01.12.2025.)
48. EU Clinical Trials Register. EudraCT No. 2021-003702-42 Dostupno na: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=2021-003702-42>. (Pristupljeno 01.12.2025.)
49. Vermeire S, Allegretti JR, Kim HJ, Long MD, Leszczyszyn J, Schreiber S, et al. Once-daily oral ritlecitinib or brepocitinib versus placebo in patients with moderate-to-severely active Crohn's disease (PIZZICATO): an international, randomised, phase 2a trial. *EClinicalMedicine.* 2026;10(93):103820.
50. King B, et al. Integrated safety analysis of ritlecitinib, an oral JAK3/TEC family kinase inhibitor, for the treatment of alopecia areata. *Am J Clin Dermatol.* 2024;25:299–314.
51. Sun Y, Zhang Y, Liu Y. Research progress of Janus kinase inhibitors in treatments of alopecia areata. *J Dermatolog Clin Res.* 2024;12(3):1167.

52. Pfizer Inc. Litfulo (ritlecitinib) prescribing information. 2023. Dostupno na: <https://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=19638>. Pristupljeno (01.12.2025.)
53. Lau E. Preformulation studies. In: Ahuja S, Scypinski S, editors. Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis. Amsterdam: Elsevier; 2011. str. 173–233.
54. Chaurasia G. A review on pharmaceutical preformulation studies in formulation and development of new drug molecules. J Pharm Sci. 2016;7:2313–2320.
55. Florence AT, Attwood D. Physicochemical Principles of Pharmacy. 6th ed. Elsevier; 2021.
56. Aulton ME, Taylor KMG. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 6th ed. Elsevier; 2023.
57. Thakur A, Tan Z, Kameyama T, El-Khateeb E, Nagpal S, Malone S, et al. Bioanalytical strategies in drug discovery and development. Drug Metab Rev. 2021;53:434–458.
58. International Council for Harmonisation. ICH Q1B: Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. Dostupno na: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf> (Pristupljeno 14.11.2025).
59. International Council for Harmonisation. ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products. Dostupno na: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf>. (Pristupljeno: 02.12.2025).
60. International Council for Harmonisation. ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures. Dostupno na: [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2\(R2\)\\_Guideline\\_2023\\_1130.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2(R2)_Guideline_2023_1130.pdf). (Pristupljeno: 02.12.2025).
61. U.S. Food and Drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015. Dostupno na: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf> (Pristupljeno: 14.11.2025).
62. World Health Organization. Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products. WHO Technical Report Series.2016. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/m/item/trs1010-annex10>. (Pristupljeno 03.12.2025.)
63. Patel P, Ahir K, Patel V, Manani L, Patel C. Drug-excipient compatibility studies: first step for dosage form development. J Pharm Innov. 2015;4:14–20.

64. Segall AI. Preformulation: the use of FTIR in compatibility studies. *J Innov Appl Pharm Sci.* 2019;4:1–6.
65. Marinić V, et al. Compatibility studies of hydrocortisone with excipients using thermogravimetric analysis supported by multivariate statistical analysis. *J Therm Anal Calorim.* 2016;127:543–553.
66. Jain S, Shah RP. Drug-excipient compatibility study through a novel vial-in-vial experimental setup. *AAPS PharmSciTech.* 2023;24:117.
67. Alburyhi H. Evaluation of drug-excipient compatibility using thermal and non-thermal methods. *World J Pharm Res.* 2024;13(19):1467–1474.
68. Abdel-Rehim M, Pedersen-Bjergaard S, Abdel-Rehim A, Lucena R, Moein MM, et al. Microextraction approaches for bioanalytical applications: an overview. *J Chromatogr A.* 2020;1616:460790.
69. Sevgen, S.; Kara, G.; Kir, A. Ş.; Şahin, A.; Boyaci, E. A critical review of bioanalytical and clinical applications of solid phase microextraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2025;252:116487.
70. Leszczyńska, D.; Hallmann, A.; Treder, N.; Bączek, T.; Roszkowska, A. Recent advances in the use of SPME for drug analysis in clinical, toxicological, and forensic medicine studies. *Talanta*, 2024;270:125613.
71. International Council for Harmonisation. ICH M10: Bioanalytical Method Validation. 2022. Dostupno na: [https://database.ich.org/sites/default/files/M10\\_Guideline\\_Step4\\_2022\\_0524.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf). (Pristupljeno: 03.12.2025.)
72. U.S. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation. 2018. Dostupno na: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. (Pristupljeno: 03.12.2025.)
73. European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation. 2018. Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf). (Pristupljeno: 03.12.2025.)
74. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. Green analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2008;27:497–511.
75. Pandey S, Pandey P, Tiwari G, Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods.* 2010;1(1):14–24.

76. Lucena R. Sample preparation miniaturization in bioanalysis. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403:2213–2223.
77. Mornar A, Nigović B, Amidžić Klarić D, Jeličić ML, Brusač E. Ekstrakcija čvrstom fazom – primjena u bioanalitici. *Farm Glas.* 2020;76:353–394.
78. Mornar A, Marinac-Anđić I, Amidžić Klarić D, Kovačić J. Mikroekstrakcija čvrstom fazom – inovativni pristup u bioanalitičkim istraživanjima. *Kem Ind.* 2022;71(9-10):639–652.
79. Kataoka H. Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques. *Anal Sci.* 2011;27:893–905.
80. Hashemi B, Zohrabi P, Shamsipur M. Recent developments and applications of sorbents for SPE and SPME. *Talanta.* 2018;187:337–347.
81. Armenta S, Esteve-Turrillas FA, Garrigues S, de la Guardia M. Smart materials for sample preparation in bioanalysis. *Sustain Chem Pharm.* 2021;21:100411.
82. Pawliszyn J. Theory of solid-phase microextraction. *J Chromatogr Sci.* 2000;38:270–278.
83. Locatelli M, Kabir A, Perrucci M, Ulusoy S, Ulusoy HI, Ali I, et al. An overview of the current progress in green analytical chemistry by evaluating recent studies using greenness assessment tools. *TrAC Trends Anal Chem.* 2023;168:117330.
84. Gałuszka A, Konieczka P, Migaszewski ZM, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends Anal Chem.* 2012;37:61–72.
85. Mohamed HM, Lamie NT. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of a developed RP-HPLC method. *J AOAC Int.* 2016;99:1260–1265.
86. Pena-Pereira FJ, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE—Analytical GREENness metric approach and software. *Anal Chem.* 2020;92:10076–10082.
87. Hicks MB, Farrell W, Aurigemma C, Lehmann L, Weisel L, Nadeau K, et al. Analytical method greenness score (AMGS). *Green Chem.* 2019;21:1816–1826.
88. Alalfi T, El-Zein H, et al. Analytical method greenness score (AMGS). *Microchem J.* 2022;179:107515.
89. Pena-Pereira FJ, Tobiszewski M, Wojnowski W, Psillakis E. AGREEprep tutorial. *Adv Sample Prep.* 2022;3:100025.
90. Wojnowski W, Tobiszewski M, Pena-Pereira FJ, Psillakis E. AGREEprep – a tool for evaluating the greenness of sample preparation. *Adv Sample Prep.* 2022;3:100025.
91. Tadikonda JR, Afreen A, Battula S. Green analytical chemistry: a comprehensive review. *J Drug Deliv Ther.* 2024;15(4).

92. Tobiszewski M, Marć M, Gałuszka A, Namieśnik J. Green chemistry metrics. *Molecules*. 2015;20:10928–10946.
93. Sajid M, Płotka-Wasyłka J. Green analytical chemistry metrics: a review. *Talanta*. 2022;238:123046.
94. Yin L, Yu L, Guo Y, Wang C, Ge Y, Zheng X, et al. Green analytical chemistry metrics. *J Pharm Anal*. 2024;14:101013.
95. Płotka-Wasyłka J. Green analytical procedure index (GAPI). *Talanta*. 2018.
96. Tobiszewski M. *Green Analytical Chemistry: Theory and Practice*. Elsevier; 2020.
97. Płotka-Wasyłka J, Wojnowski W. ComplexGAPI. *Green Chem*. 2021;23:8657–8665.
98. Mansour FR, Płotka-Wasyłka J, Locatelli M. Modified GAPI (MoGAPI). *Analytica*. 2024;5:451–457.
99. Manousi N, Wojnowski W, Płotka-Wasyłka J, Samanidou V. Blue applicability grade index (BAGI). *Green Chem*. 2023;25:7598–7604.
100. Nowak PM, Wietecha-Posłuszny R, Pawliszyn J. White analytical chemistry. *TrAC Trends Anal Chem*. 2021;138:116223.
101. Lee CA, Oh DA, Tang Y, Yi P, Bashir M, English S, Croft M, Blackburn A, Bloom S, Gilder K, Grundy JS. Disposition and mass balance of etrasimod in healthy subjects and in vitro determination of the enzymes responsible for its oxidative metabolism. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2023;12:553–571.
102. Wang F, Niu X, Liu N, Zhu Z, Lin Y, Ying L, Li H. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of etrasimod in healthy Chinese adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-escalation phase 1 study. *Front Pharmacol*. 2025;16:1523339.
103. Bauman JN, Doran AC, Gualtieri GM, Hee B, Strelevitz T, Cerny MA, Banfield C, Plotka A, Wang X, Purohit VS, Dowty ME. The pharmacokinetics, metabolism, and clearance mechanisms of ritlecitinib in humans. *Drug Metab Dispos*. 2024;52:1124–1136.
104. Kumar KP, Rao AA. LC-MS/MS method for ritlecitinib quantitation. *J Pharmacol Pharmacother*. 2025;16:302–310.
105. Brusač E, Jeličić ML, Amidžić Klarić D, Nigović B, Turk N, Klarić I, Mornar A. Pharmacokinetic profiling of thiopurines. *Molecules*. 2019;24:3469.
106. USP smjernice za provjeru prikladnosti sustava (System Suitability Test - SST) <621>, 2022. Dostupno na: <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/harmonization-november-2021-m99380.pdf> (Pristupljeno 10.12.2025.)

107. Crotti S, Giordano G, Brun P, Peruzzo L, Manetto G, Traldi P. Tandem mass spectrometry in the differentiation and recognition of isomers. *Mass Spectrom Rev.* 2023;42:1244–1260.
108. Bhangare D, Tembhrne S, Gedam P, Shende S. Strategies for degradation kinetic study in pharmaceutical analysis. *J Anal Sci Technol.* 2022;13:7.
109. Chum CK, Gladwell IR, Marziano I, Salvalaglio M. Process impurities in crystallization of ritlecitinib tosylate. *Org Process Res Dev.* 2024;28:3437–3752.
110. Gabrič A, Hodnik Ž, Pajk S. Oxidation of drugs during development. *Pharmaceutics.* 2022;14:325.
111. Doddaga S, Peddakonda R. Chloroquine-N-oxide degradation product. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;81–82:118–125.
112. Kaduk J, Dosen A, Blanton T. Crystal structure of etrasimod. *Powder Diffr.* 2025;40(2):134–139.
113. Cassimjee H, Kumar P, Ubanako P, Choonara YE. Genipin-crosslinked proteosaccharide scaffolds. *Pharmaceutics.* 2022;14:441.

## 7. PRILOZI (radovi)

1. Kovačić J, Jeličić ML, Amidžić Klarić D, Mornar A. Green solid-phase (micro)extraction of andrographolides from human plasma samples followed by UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS analysis. *Separations*. 2023;10:69.
2. Kovačić J, Turk N, Amidžić Klarić D, Krznarić Ž, Mornar A. Development and validation of stability-indicating method of etrasimod by HPLC/DAD/MS/MS technique with greenness profiling. *Heliyon*. 2024;13:e34066.
3. Kovačić J, Amidžić Klarić D, Turk N, Krznarić Ž, Riordan E, Mornar A. The stability-indicating ultra high-performance liquid chromatography with diode array detector and tandem mass spectrometry method applied for the forced degradation study of ritlecitinib: An appraisal of green and blue metrics. *Pharmaceuticals*. 2025;1(18):124.

## Article

# Green Solid-Phase (Micro)Extraction of Andrographolides' from Human Plasma Samples Followed by UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS Analysis

Jelena Kovačić , Mario-Livio Jeličić , Daniela Amidžić Klarić  and Ana Mornar \* 

Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

\* Correspondence: amornar@pharma.hr; Tel.: +385-1-4818-288

**Abstract:** Since inflammatory bowel disease is a progressive disease, optimal treatment early in the disease course is paramount. Still, the use of conventional drugs is accompanied by side effects. The herbal therapies for gastrointestinal disorders are traditionally widespread in Asia, while in Western countries have been adopted in recent years. *Andrographis paniculata* is a herbaceous plant used in anti-inflammatory treatment. To improve its clinical application, an analytical method with the potential to define a relationship between dose and plasma concentration of active ingredients is prerequisite. Considering the increasing demand for eco-friendly bioanalytical methods, our research aimed to implement new sample preparation technique microextraction by packed sorbent for extraction of marker compounds of *A. paniculata* from plasma. This green procedure using polymeric sorbent based on the poly (styrene-divinylbenzene) allowed miniaturization of sample volume (100 µL), decrease in consumption of solvents, and high recovery (92–98%). A highly selective and sensitive reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography method has been developed and validated. The newest greenness assessment software AGREE calculator was used for evaluation of the method's environmental performance. It suggests that our method conforms to the eco-friendly conditions (score 0.8). The sample preparation was identified as weak point of the bioanalytical methods which highlights the importance of microextraction.

**Keywords:** andrographolides; bioanalysis; sample preparation; MEPS; green analytical chemistry



**Citation:** Kovačić, J.; Jeličić, M.-L.; Amidžić Klarić, D.; Mornar, A. Green Solid-Phase (Micro)Extraction of Andrographolides' from Human Plasma Samples Followed by UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS Analysis. *Separations* **2023**, *10*, 69. <https://doi.org/10.3390/separations10020069>

Academic Editors:  
Victoria Samanidou and  
Kenichiro Todoroki

Received: 30 November 2022  
Revised: 13 January 2023  
Accepted: 16 January 2023  
Published: 18 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

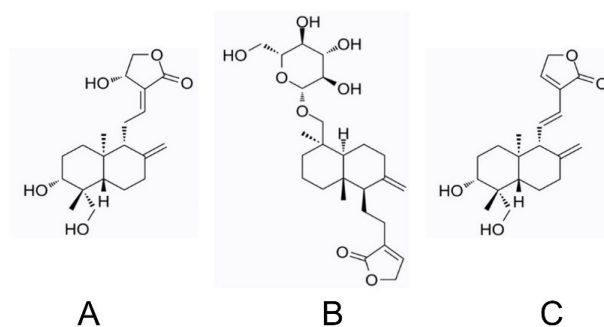
## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), encompassing Crohn's disease and ulcerative colitis, is a chronic, life-long, and relapsing disease of the gastrointestinal tract. Although its incidence is increasing globally, the precise etiology is currently unclear. The most popular hypothesis of IBD pathogenesis is that complex interactions between genetics, environmental factors, and the host immune system lead to aberrant immune responses and consequently chronic intestinal inflammation. According to epidemiological investigations, its prevalence has continually increased over the past 50 years with the highest incidence being reported in North America, the United Kingdom, and Northern Europe. However, in recent years incidence and prevalence may have stabilized in these high-incidence areas while the number of patients with IBD is rising in developing countries. This epidemiological shift likely relates to the westernization of lifestyle, changes in diet, and improved hygiene as part of socioeconomic development in those countries. Currently nearly 7 million people are estimated to be living with IBD worldwide [1–4].

Since IBD is a chronic and progressive disease, optimal treatment early in the disease course to prevent complications is of greatest importance [5]. The use of alternative and complementary medicine for gastrointestinal disorders, particularly in the form of herbal therapies, is traditionally widespread in many Asian countries including China and India. In Western countries, such as the United States, Australia, Canada, and members of the

European Union, the use of herbal medicine among patients with IBD has been adopted in recent years. It is mostly related to dissatisfaction with the results from conventional medicine, patients' belief that their physicians have not properly identified the problem, the preference of consumers for herbal therapies, and a greater interest in alternative medicines. It is estimated that up to half of all patients with IBD use herbal medicine at some point in their disease course [6]. In addition to all these above-mentioned factors, the improvements in the quality, efficacy, and safety of herbal medicines with the development of science and technology have projected these products into the greater limelight [7–9].

*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (*A. paniculata*), creat or green chiretta, is an herbaceous plant, which is commonly known as the “King of Bitters” in Acanthaceae family. *Andrographis* has been widely used in Asian countries such as China, India, and Sri Lanka, where its extracts are used as anti-inflammatory remedies. The phytochemical analyses reveal that the main known components are diterpene lactones, principally andrographolide (AND) and its derivatives neoandrographolide (NAND) and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (DAND) (Figure 1). Although the target of andrographolides' direct mechanism of action in the treatment of IBD has not been fully elucidated, recent research has shown that it can exert anti-inflammatory effects via multiple pathways and multiple targets [10].



**Figure 1.** Chemical structures of andrographolide—AND (A), neoandrographolide—NAND (B), and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide—DAND (C).

*A. paniculata* extract, at either 1200 [11] or 1800 mg [12] daily, has been shown effective in treating IBD. Although andrographolide and its derivatives have fast intestinal absorption, their bioavailability is restricted due to their high lipophilicity and low water solubility [13]. Additionally, several studies have shown the binding of andrographolides to plasma proteins human serum albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein protein, favoring their pharmacokinetics [13,14]. Furthermore, andrographolides can be released via p-glycoprotein, while biliary excretion has been shown to be a minor contributor to their low bioavailability. To improve the clinical application of this natural therapeutic solution for IBD patients two main approaches are prerequisites. Several studies have explored new delivery systems for andrographolides, which are applied to increase their dissolution or dispersibility and, accordingly, enhance their oral bioavailability. On the other hand, advanced analytical techniques have the potential to define a relationship between dose and plasma concentration, and between concentration and therapeutic effects of biologically active ingredients of *A. paniculata* extract.

Through technological advancements in the last decade, the liquid chromatography (LC) has become the go-to technique for high throughput analysis of endobiotic and xenobiotics in biological samples [15]. However, this advanced technique needs to be supported by efficient sample preparation techniques [16]. Recently, a few papers have reported methods to quantitatively determine andrographolides in animal and human samples, in which the most sensitive assays were obtained using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (LC/MS/MS) [17–25]. The development of bioanalytical sample preparation procedures has become challenging over the last decade because of the need to constantly accomplish superior sensitivity, higher accuracy, and speed of analysis in com-

plex biological samples. A closer look at the above-mentioned methods, however, reveals that most of the methods [17–22] used the protein precipitation procedure that does not require very extensive method development and can be implemented as a simple generic method to prepare samples from discovery pharmacokinetic studies. Still, it has relatively poor sample clean-up which can lead to compromised sensitivity of the method due to suppressing or enhancing ion production in the ionization source of the mass spectrometer. Labor-intensive liquid–liquid extraction was also used in the targeted sample preparation of andrographolides [23]. The advantages of the procedure such as simple operation, cost-effectiveness, quick processing, and no necessity for any appliance are shadowed by the exercise of harmful solvents and the lack of amenability to automatization and thus limited throughput. Only two methods used advanced sample preparation procedures. Chen and co-workers [24] used online solid phase extraction to achieve superior extraction efficiency of andrographolides and high sensitivity of the method although an affordable diode-array detector (DAD) was used. Moreover, this column-switching technique enabled greater automatization potential and reduced sample manipulation and the risk of its contamination. Notwithstanding these superiorities, online solid phase extraction has also several drawbacks, including the use of expensive instruments and limitations in the portability of the equipment. Furthermore, several factors should be considered in the optimization of extraction conditions. A high flow rate can be advantageous for the analyte's enrichment factors because it can cause a shortened contact time between the analyte and the recognition site on the extraction sorbent. The high pressure of the chromatographic system is expected when the additional column is attached so the commonly used strategy is to lower the mobile phase flow rate. These concerns may influence the analysis's time. Zhao and co-workers [25] applied the cloud point extraction of andrographolides from human plasma. It is based on surfactant solutions that become cloudy and separate into two isotropic phases. It has several merits over other sample preparation procedures as it does not require the utilization of organic solvents; still matrix effects should be evaluated when combined with LC-MS.

One of the growing trends in the bioanalytical community is the implementation of green chemistry and the emphasis on the ecological impact of clinical laboratories. To that end, one of the largest challenges is developing green, sustainable, and efficient sample preparation procedures. A recent development in the field of solid phase extraction (SPE) known as microextraction has taken great steps forward in achieving extraction methods with low environmental impact.

Considering the increasing demand for appropriate and eco-friendly sample preparation techniques, our research aimed to evaluate the capabilities of the traditional SPE approach, as well as novel microextraction techniques such as in-tip solid-phase microextraction (in-tip SPME) and microextraction by packed sorbent (MEPS) for extraction of marker compounds of *A. paniculata* AND, NAND, and DAND from human plasma. Therefore, a highly sensitive reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC) method has been developed and validated. The established method enables analytes' detection using two detection modes convenient DAD detection as well as highly selective and sensitive mass spectrometric detection with electrospray ionization (ESI) and triple quadrupole (QqQ) analyzer.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals, Materials, and Equipment

The standard AND was purchased from TCI (Tokyo, Japan), while NAND and DAND were obtained by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol and acetonitrile (HPLC gradient grade) were supplied from J. T. Baker (Griesheim, Germany). Formic acid (LC-MS grade) was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Buffer solutions were prepared using di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (buffer substance for chromatography) and sodium dihydrogen phosphate dihydrate (EMSURE<sup>®</sup> reagent Ph. Eur.) both by Merck, Darmstadt, Germany. Lyophilized human serum was used as a matrix (SERODOS<sup>®</sup>, Hu-

man, Wiesbaden, Germany). Ultra-pure water obtained by the WaterPro water system Labconco (Kansas, MI, USA) with a resistivity of 18.2 M $\Omega$  cm (25 °C) was used in all experiments. The SPE procedure was performed using the Visiprep™ vacuum manifold that allows processing up to 12-port SPE samples, simultaneously (Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and mini diaphragm vacuum pump (Laboport® N816, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Germany). Single channel pipettes by Rainin, Mettler Toledo (Columbus, OH, USA) were used as liquid handling solutions for the in-tip SPME procedure. MEPS procedure was carried out on Trajan Scientific and Medical apparatus (Victoria, Australia) consisting of a 100- $\mu$ L eVol® XR hand-held automated analytical syringe. Additional equipment used for sample preparation includes a rotary evaporator under vacuum (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany), a centrifuge with temperature control Z 326K (Hermle, Gosheim, Germany), and Vortex 2 by IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany). In the analysis of the samples, Agilent 1260 series UHPLC system was used with a DAD detector and Ultivo Triple Quadrupole with ESI source all by Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Data acquisition and processing were carried out using OpenLab ChemStation and MassHunter software.

## 2.2. Sample Preparation

### 2.2.1. Preparation of Calibrators and Quality Controls

The stock solutions of AND, NAND, and DAND (100  $\mu$ g/mL) were prepared by dissolving appropriate amounts of each analytical standard in methanol. Further dilutions of the stock solution with methanol/water (50:50, *v/v*) mixture produced a series of standard working solutions in the concentration range of 4–12  $\mu$ g/mL which were used to spike blank human plasma. Lyophilized human serum was stored at 4 °C before use. It was thawed at room temperature for 1 h and vortexed mixed for 10 s before the addition of working solutions. Optimization of all sample preparation procedures was performed using mixed standard solution (8  $\mu$ g/mL) spiked to blank human plasma. Quality control (QC) samples for method validation were independently prepared in the same matrix at low (4  $\mu$ g/mL), two middle (6  $\mu$ g/mL and 8  $\mu$ g/mL), and high (12  $\mu$ g/mL) concentrations representative of the range of calibration curves. All the solutions were kept in dark at 4 °C until they were used.

### 2.2.2. SPE Procedure

In this study, ten different SPE sorbents (Table 1) were used to extract AND, NAND, and DAND from plasma samples. Based on sorbent chemistry and extraction mechanism different extraction procedures were applied using the vacuum manifold.

**Table 1.** List of SPE cartridges used in sample preparation optimization.

Cartridge Name	Manufacture	Sorbent Type	Bed Weight/Tube Volume
C18	Waters, Milford, MA, USA	octadecyl silane-bonded silica	500 mg/3 mL
Bond Elut C18	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	octadecyl silane-bonded silica	500 mg/6 mL
Discovery® DSC-18 SPE Tube	Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	octadecyl silane-bonded silica	500 mg/3 mL
Bond Elut C8	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	octyl silane-bonded silica	100 mg/6 mL
Oasis HLB	Waters, Milford, MA, USA	universal polymeric reversed-phase sorbent	30 mg/6 mL
Bond Elut Plexa	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	polymeric sorbent with a nonretentive, hydroxylated, amide-free surface, and a nonpolar polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) core	200 mg/6 mL

Table 1. Cont.

Cartridge Name	Manufacture	Sorbent Type	Bed Weight/Tube Volume
Oasis PRiME HLB	Waters, Milford, MA, USA	water-wettable polymeric reversed-phase sorbent	200 mg/1 mL
Bond Elut Plexa PAX	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	mixed-mode nonpolar polymeric anion exchanger sorbent	30 mg/6 mL
Isolute® PLD+	Biotage, Uppsala, Sweden	multifunctional sorbent bed	50 mg/1 mL
Phree Phospholipid removal tubes	Phenomenex, Torrance, CA, USA	multifunctional sorbent bed	50 mg/1 mL

The procedure for octadecyl (C18) and octyl (C8) silane-bonded silica as well as polymeric sorbents included precipitation of the proteins before the extraction of analytes. Organic solvent-based protein precipitation was found to be useful for efficient protein elimination in a single step. The plasma samples were mixed with four times their volume of methanol. The mixtures were placed on a vortex mixer for approximately 30 s and centrifuged at 3000 rpm to afford a clear supernatant. Before the sample loading on the sorbent, it was conditioned with 2 mL of methanol followed by 2 mL of ultra-pure water. Protein-free supernatants were loaded onto suitably conditioned columns. The washing of columns was performed with 1 mL of ultra-pure water and analytes were eluted with 1 mL of methanol. Samples were evaporated using Concentrator plus to dryness at 60 °C, re-dissolved with 200 µL of ultra-pure water and aliquots of 25 µL were injected into the chromatographic system.

The procedure for mixed-mode nonpolar polymeric anion exchanger sorbent was comparable with the above-described procedure for modified silica and polymers except solvents were adjusted to the chemistry of sorbent and anion-exchange loadings. The conditioning of sorbent was performed with 2 mL of methanol followed by 2 mL of phosphate buffer (10 mM, pH = 7.4), washing of columns with 1 mL of water/methanol mixture (50:50, *v/v*), and analyte elution with 1% (*v/v*) formic acid in methanol.

The procedure for sorbents that selectively remove plasma proteins and phospholipids omits protein removal pretreatment as it is included in the extraction step (Figure 2). An amount of 800 µL of crashing solvent methanol was dispensed on columns followed by the addition of 200 µL of plasma samples. After sample loading, tubes were placed on a vortex mixer for approximately 30 s and centrifuged at 11,000 rpm for 10 min. Collected supernatants were evaporated to dryness at 60 °C and then re-dissolved with 100 µL of ultra-pure water. Afterward, the samples (25 µL) were injected into the chromatographic system.

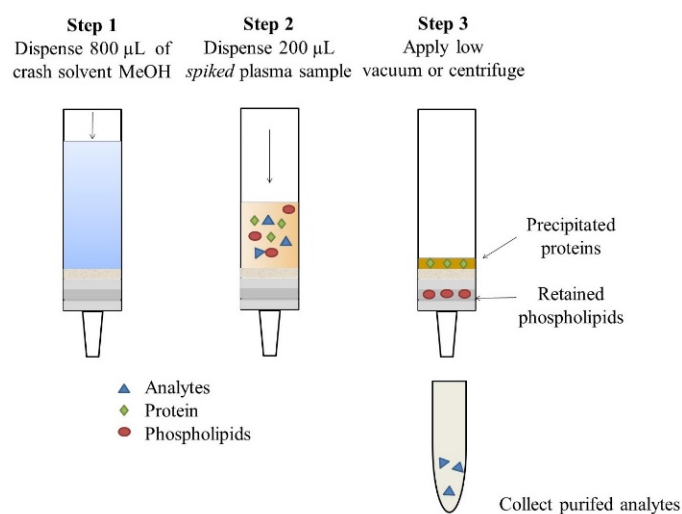


Figure 2. The schematic diagram for the SPE procedure using Isolute® PLD+ and Phree Phospholipid removal cartridges.

### 2.2.3. In-Tip SPME Procedure

Extraction of analytes was carried out using HybridSPE DPX Tips (50 mg, 1 mL) from Merck Millipore (Burlington, MA, USA) (Figure 3). Before the extraction process proteins were removed by mixing plasma samples with four times their volume of methanol. The mixtures were placed on a vortex mixer for approximately 30 s and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. For analytes' extraction, the tip-packed sorbent was conditioned by aspirating and dispensing 800  $\mu\text{L}$  of methanol. Protein-free supernatants were collected and aspirated/dispensed three times with tip-packed sorbent. In the final step, collected phospholipid-free samples were evaporated to dryness at 60  $^{\circ}\text{C}$  and then re-dissolved with 200  $\mu\text{L}$  of ultra-pure water. Aliquots of the 25  $\mu\text{L}$  were injected into the chromatographic system.

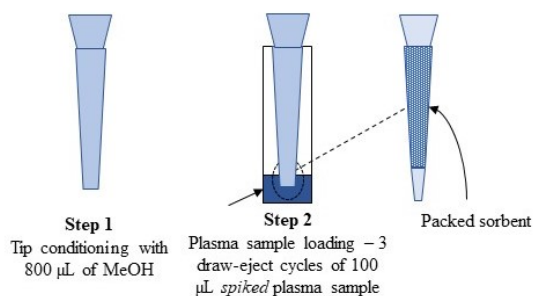


Figure 3. The schematic diagram for in-tip SPME procedure.

### 2.2.4. MEPS Procedure

MEPS procedure was carried out using 100- $\mu\text{L}$  hand-held automated analytical syringe with a removable needle fitted with a Barrel Insert and Needle (BIN) assembly containing hydrophobic C8, C18, cross-linked polystyrene divinylbenzene copolymer (HDVB) and polystyrene-divinylbenzene copolymer (SDVB) sorbents (Figure 4). Before being used for the first time, the sorbent was conditioned with four draw-eject cycles of 300  $\mu\text{L}$  of methanol followed by four draw-eject cycles of 300  $\mu\text{L}$  of ultra-pure water. After that, 100  $\mu\text{L}$  of spiked plasma samples were manually drawn through the sorbent and discharged back six times. Afterward, the MEPS cartridge then washed with 100  $\mu\text{L}$  of ultra-pure water and 200  $\mu\text{L}$  of a water/methanol mixture (90:10,  $v/v$ ). The analytes were eluted with 700  $\mu\text{L}$  of methanol, evaporated to dryness at 60  $^{\circ}\text{C}$ , redissolved with 100  $\mu\text{L}$  of ultra-pure water and 25  $\mu\text{L}$  of the sample was injected into the chromatographic system. In this study, the extraction was repeated multiple times using the same MEPS sorbent. To avoid carryover effect, the sorbent was washed with ten draw-eject cycles of 300  $\mu\text{L}$  of methanol and ten draw-eject cycles of 100  $\mu\text{L}$  of ultra-pure water.

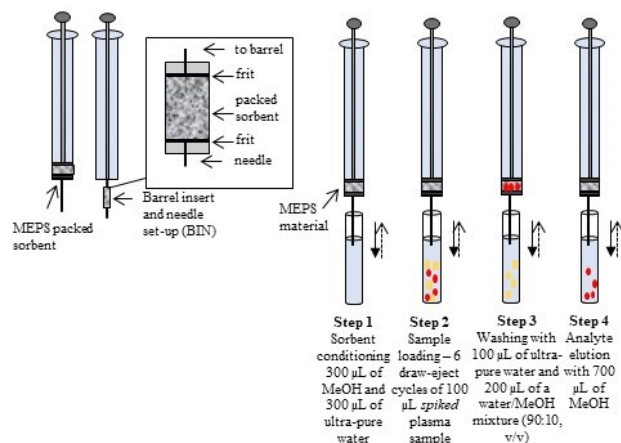


Figure 4. The schematic diagram for the MEPS procedure.

### 2.3. Chromatographic Analysis

The simultaneous determination of three major active diterpenoids of *A. paniculata* in human plasma was performed using chromatographic column XSelect HSS Cyano (3.0 × 150 mm, 3.5 µm particle size; Waters, Milford, MA, USA) with an operating temperature of 34.0 ± 0.1 °C. The mobile phase consisted of two eluents, ultra-pure water (eluent A) and acetonitrile (eluent B) both acidified with formic acid (0.1%) and delivered at a flow rate of 0.8 mL/min with a gradient system (0–6 min 7–15% B; 6–16.5 min 15–30% B; 16.5–21 min 30–53% B). After each run, the column was equilibrated with 7% of eluent B for 3 min. Both eluents were filtrated throughout a 0.45 µm membrane filter with a 47-mm diameter (Sartorius, Goettingen, Germany). The injection volume of each sample was 25 µL. To avoid carryover, the syringe and injection valve of the autosampler were set to be washed after each injection with wash solution (methanol). The DAD quantitation was performed at 206, 230, and 256 nm with a slit of 4 nm. The absorbance of the analytes during a chromatographic run was collected in the spectral range of 200–400 nm. The detection wavelength for each analyte was the one providing the maximum peak high. The MS settings were optimized to obtain the maximal signal. Results were generated in the positive mode obtained from an ESI source, operating with the capillary voltages of 3500 V and nebulizer pressure of 30 psi. The gas temperature was set at 350 °C with a gas flow of 11 L/min. An ESI-L tuning mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used daily as a calibrant delivery system. The full scan mass spectra were acquired over a range of *m/z* 100–700. Highly pure N<sub>2</sub> (>99.9995) was used as the collision gas with the collision energy of 100 eV for AND, 76 eV for NAND, and 56 eV for DAND. For dynamic multiple reaction monitoring (dMRM) mode the precursor-to-product ion transitions at *m/z* 351 → 297, 481 → 319, and 333 → 297 were used for AND, NAND, and DAND, respectively.

### 2.4. Method Validation

The optimized method was validated according to the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH (M10)) and US Food and Drug Administration (FDA) guidelines on bioanalytical method validation [26,27].

### 2.5. Analytical Method Greenness Score Evaluation

The platform Analytical GREENness metric approach software (AGREE) was used for the analytical method greenness score evaluation [28].

## 3. Results

### 3.1. Optimization of Sample Preparation

The sample preparation is the first and crucial step in the bioanalysis of xenobiotics in complex biological matrices. Carbohydrates, proteins, lipids, salts, and other endogenous components present in large amounts can hamper the preferred trace analytes via matrix effects. Thus, elimination of these interferences is the primary purpose of sample preparation before analysis. However, more than that, the increasing demand for convenient and eco-friendly sample preparation techniques in clinical laboratories is indisputable. To properly address these requirements, we explored the possibilities of three sample preparation techniques for the simultaneous extraction of marker compounds of *A. paniculata*.

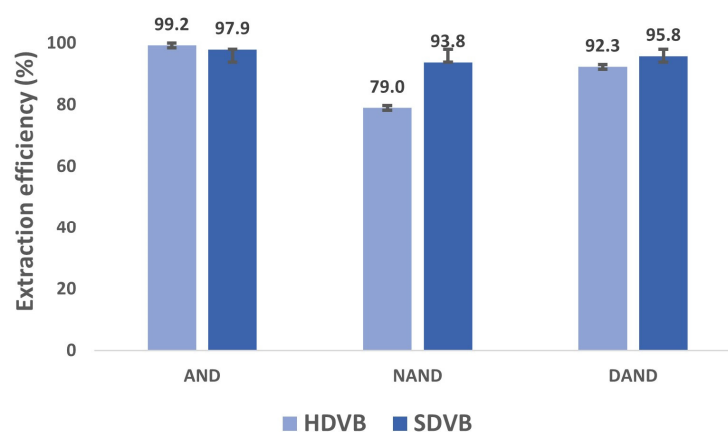
Initially, the SPE procedure, as the most widespread sample preparation in bioanalysis, was used to identify the most suitable extraction mechanism for the target compounds. One of its main advantages is its versatility since a wide range of sorbents that have different properties and types of interaction with the analytes have become available. For the current work, we have used reversed-phase silica-based sorbents that were the first to be applied to SPE. The investigated sorbents showed thwarted extraction efficiencies from 17% to 81%. Due to outstanding morphological properties that promote capacity and retention with tuned chemical properties that allow interactions with various compounds and enhanced

stability under extreme conditions polymeric sorbents were subsequently included in the evaluation. Contrary to the anticipated similar extraction efficiency was achieved using different polymeric sorbents (from 3% to 79%). It was observed that the lowest extraction recovery (up to 6%) was obtained using Bond Elut Plexa cartridges. It indicates strong interaction of hydrophobic andrographolides with polymeric sorbent which entails larger consumption of elution solvent and lowers the greenness of the method. Furthermore, the mixed-mode anion-exchange polymer material for achieving selectivity for negatively charged andrographolides was explored. The anion exchange functionalities of sorbent slightly improved the extraction efficiency (up to 14%) compared to the corresponding polymer. In recent years, development in sorbent technology involving innovative extraction mechanism has also taken place. These novel materials are tailored to selectively remove plasma proteins and phospholipids. A comparison of two protein and phospholipid removal sorbents for the analysis of andrographolides in plasma samples has been investigated to appraise the effect that these approaches have on the removal of endogenous material. Both sorbents provided superior cleanliness of the extracted samples, also acceptable extraction efficiencies (Isolute<sup>®</sup> PLD+: 91.6% with RSD 1.50% for AND, 92.4% with RSD 1.40% for NAND, and 84.8% with RSD 4.15% for DAND; Free Phospholipid Removal: 98.5% with RSD 1.67% for AND, 95.7% with RSD 3.12% for NAND, and 94.59% with RSD 0.96% for DAND,  $n = 3$ ).

The results of SPE optimization support the use of protein and phospholipid removal sorbents. However, our work was extended toward microextraction techniques as a useful tool for green sample preparation procedures. The phospholipid retention mechanism, based on a highly selective Lewis acid–base interaction between the proprietary zirconia ions, functionally bonded to sorbent and the phosphate moiety consistent within all phospholipids is available as dispersive pipette extraction technology that introduces the benefits of solid phase extraction into an easy-to-use pipette tip. This device is unique because sorbent material is loosely contained within a tip and such that sorbent was mixed with plasma samples during aspirate and dispense steps and enabled a highly efficient interaction of the sorbent and andrographolides. The obtained extraction efficiencies (96.0% with RSD 1.21% for AND, 96.5% with RSD 3.80% for NAND, and 83.0% with RSD 1.07% for DAND,  $n = 3$ ) tie well with SPE data obtained using protein and phospholipid removal sorbents. The primary advantages of in-tip SPME over conventional SPE are the minimization of the analyst intervention and the accuracy of the automatic pipette which provided customizable and precise sample flow allowing for repeatable extraction of andrographolides. It is worthwhile to note the capability of the in-tip SPME procedure for small sample volumes processing which makes this technique suitable for the bioanalytical method development of low-volume assays for pediatric studies according to international agencies' guidelines.

Advanced characteristics of mass spectrometry such as sensitivity, specificity, and fastness lead to elect this technique as the golden standard in bioanalysis. Consequently, we wanted our sample preparation technique to be suitable for MS detection. Since we are aware that SPE and in-tip SPME can contribute to inducing ion suppression/enhancement effects during LC/MS analysis through extractables endogenous to the SPE and SPME hardware (polypropylene cartridges and tips) we focused our further research on MEPS technology. For method optimization, the semi-automatic MEPS version using the digitally controlled and programmable electronic device eVol<sup>®</sup> XR was used since it is more reliable than the manual MEPS. The procedure includes the sample loading from the bottom of the device which allows the sample to pass through sorbent packed inside the barrel between frits twice for each syringe cycle. Thus, a critical parameter in MEPS extraction is the choice of sorbent. From the commercially available MEPS sorbent portfolio the extraction phase based on silica particles (C8 and C18) and polymeric phases (HDVB and SDVB) were investigated to select the appropriate sorbent for andrographolides' extraction. Both MEPS silica sorbents showed more preferable extraction efficiencies than coherent SPE sorbents (C8: 64.6% with RSD 0.83% for AND, 94.1% with RSD 2.96% for NAND, and

84.4% with RSD 1.29% for DAND; C18: 80.7% with RSD 1.89% for AND, 97.2% with RSD 2.55% for NAND, and 87.9% with RSD 0.63% for DAND,  $n = 3$ ). We presume that these improvements may be related to the high retention capabilities of MEPS sorbent consisting of a spherical silica particle with a high pore size and a surface area (typically 120 Å), which is larger than the conventional SPE pore size of up to 80 Å. Superior extraction efficiencies are seen for both polymeric sorbents based on the poly (styrene-divinylbenzene) (Figure 5).



**Figure 5.** Extraction efficiency (%;  $n = 3$ ) of andrographolide (AND), neoandrographolide (NAND), and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (DAND) obtained for polymeric MEPS sorbents (cross-linked polystyrene divinylbenzene copolymer—HDVB and polystyrene-divinylbenzene copolymer—SDVB) expressed as average value  $\pm$  standard deviation.

HDVB MEPS sorbent as a cross-linked copolymer offered 100% reversed-phase interaction with hydrophobic andrographolides. Still, based on the lower extraction efficiency achieved for NAND (14.8% lower) we might conclude that this modified, highly hydrophobic polymer is less suitable for investigated labdane glucoside containing multiple hydroxyl groups than unmodified SDVB sorbent. The retention of analytes on the MEPS sorbents is affected by the number of extraction cycles during the sample loading process. A larger number of cycles on HDVB sorbent might lead to higher extraction efficiency for NAND. However, increasing the number of extraction cycles might shorten the lifetime of the MEPS sorbent, as the complex matrix could saturate the stationary phase with interferences.

Among investigated sample preparation procedures MEPS was shown to be the most appropriate for andrographolides bioanalysis. Optimized MEPS procedure allowed miniaturization of sample volume, diminishing the consumption of organic solvents, excellent sample concentration, and clean-up, as well as high recovery. The pre-treatment steps such as dilution of the sample and removal of proteins were not required. We developed a new, straightforward methodology, performed in four consecutive steps that took only a few minutes from sample loading to andrographolides elution allowing their high throughput analysis. Moreover, the novel sample preparation procedure can be smoothly transferred to the fully automatic platform as the sorbent configuration is compatible with both systems. SDVB sorbent was chosen for further research as the most adequate sorbent for the concomitant analysis of andrographolides in human plasma samples and used for about 100 extractions without compromising efficiency.

### 3.2. Chromatographic Analysis

Chromatographic conditions were optimized to obtain high sensitivity and reproducibility of the method. Our previous investigation on andrographolides [9] has shown that the propyl cyano-bonded phase provides a superior peak shape for andrographolides and an extremely long column lifetime at low pH. Firstly, the dependable and easy-to-operate DAD detector was used to find out the appropriate sample preparation procedure. To confirm the system performance, system suitability parameters were measured by injecting a standard solution (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in six replicates. The parameters, including retention

time, peak area, resolution, retention factor, US Pharmacopeia (USP) plate count, and symmetry were evaluated (Table 2).

**Table 2.** System suitability ( $n = 6$ ).

Parameter		AND	NAND	DAND
Retention time	$t_R$ (min)	12.45	17.26	17.83
	RSD (%)	0.35	0.11	0.11
Peak area	$A$ (mAU)	372.3	295.4	350.3
	RSD (%)	0.18	1.26	0.20
Resolution	$R_s$	21.4	2.50	14.35
	RSD (%)	0.33	0.85	2.42
Retention factor	$k$	13.29	18.81	19.47
	RSD (%)	1.17	0.85	0.80
Symmetry	$A_s$	0.94	0.95	0.93
	RSD (%)	0.23	0.60	0.38
Theoretical plate count	$N$	63,023	142,252	123,305
	RSD (%)	1.55	0.05	1.40

The values of RSD were found to be less than 2.42%, thus leading to a high degree of accuracy of the chromatographic instrument.

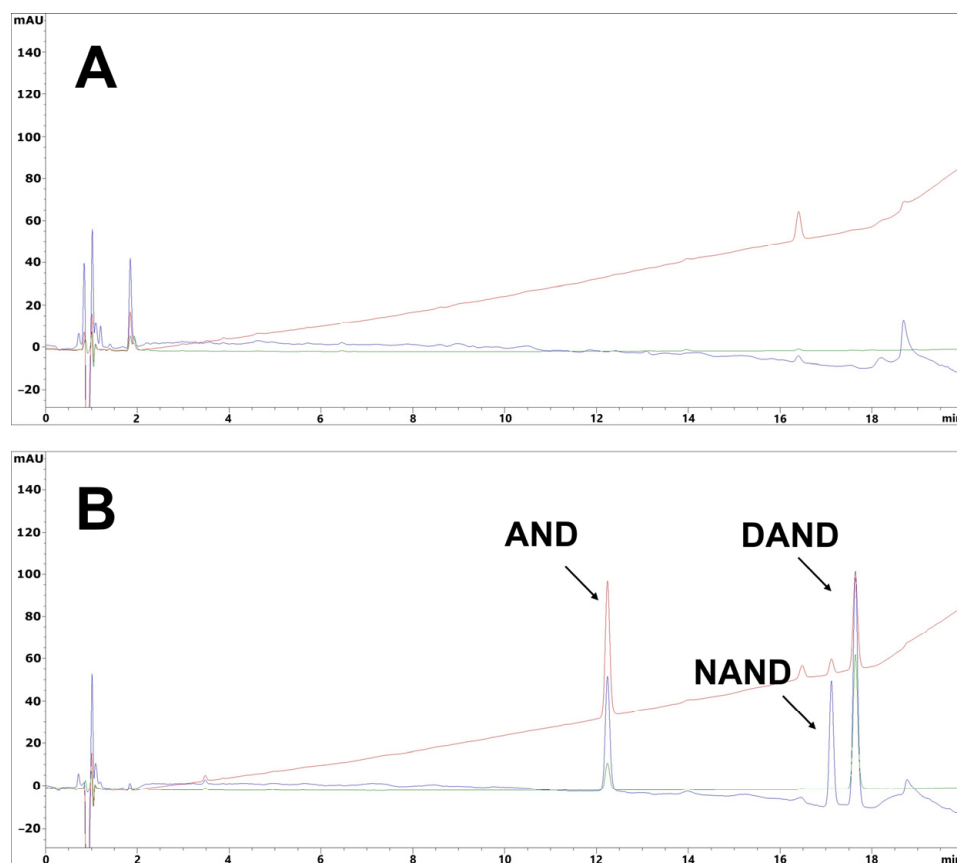
### 3.3. Method Validation

The validation of the developed bioanalytical method with MEPS sample preparation was performed as per approved guidelines of the ICH (M10) and FDA recommended condition [26,27].

The selectivity of the developed method was determined by comparing the blank plasma sample (Figure 6A) with the spiked plasma sample (Figure 6B). The results showed no interference of chromatographic peaks of analytes with the plasma. Responses attributable to interfering components were lower than the acceptable limit (lower than 20% of the andrographolides' response at the lowest calibration standard (LLOQ) level of 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). In addition, the andrographolides' peak purity in the spiked plasma samples at a QC level of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  expressed with ChemStation software was higher than 999. Furthermore, the selectivity of the method was assessed for interference by concomitant medication: nonsteroidal anti-inflammatory drugs (ketoprofen, acetylsalicylic acid, and ibuprofen), benzodiazepine tranquilizer (diazepam), and aminosalicylates (sulfasalazine and olsalazine). Hence, the developed method can be considered to be highly selective for the quantification of andrographolides in human plasma.

The calibration curve was prepared to demonstrate the relationship between the nominal analyte concentration and the response of the analytical platform to the analyte. Each calibration standard was prepared in triplicate by spiking blank plasma samples with aliquots of 25  $\mu\text{L}$  of a known quantity of AND, NAND, and DAND. Afterward, the spiked plasma samples were pre-treated with MEPS, as described previously. Calibration curves were created using five concentration levels of plasma matrix spiked with standards encompassing the range from 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (LLOQ level) to 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (the highest calibration standard (ULOQ) level) for AND, NAND, and DAND to assess the method's linearity. The calibration curve was found to be linear with a good regression coefficient value ( $r > 0.999$ ) for analytes. Linearity results have been summarized in Table 3. Furthermore, the accuracy of the back-calculated concentrations of each calibration standard was evaluated and it was found to be within  $\pm 3.1\%$  of the nominal concentration at all investigated levels. The values were within the ICH and FDA acceptable limit ( $\pm 20\%$  of the nominal concentration at the LLOQ and within  $\pm 15\%$  at all the other levels) supporting the good linearity of the bioanalytical method. Finally, the residual analysis was performed to check the assumption of linearity and homoscedasticity. The residuals appeared to be randomly scattered about

zero in residual plots versus fits and versus order, revealing that the errors had constant variance and each error was independent of all other errors (Figure 7). The Limit of Detection (LOD) was defined as the concentration providing a signal-to-noise ratio of three and it was found between 0.02 and 0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  while the Limit of Quantification (LOQ) was found to be between 0.06 and 0.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (a signal-to-noise ratio of ten) (Table 3).

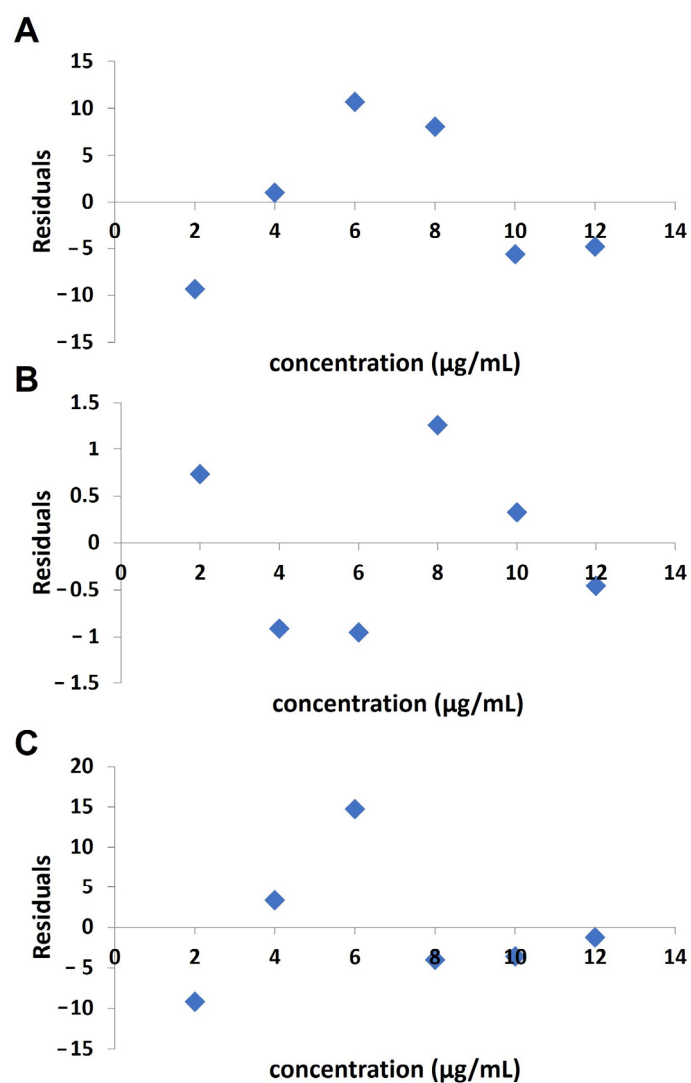


**Figure 6.** Chromatograms: blank plasma sample (A) and spiked plasma sample at ULOQ (B). Legend: Chromatogram recorded at 206 nm (blue), 230 nm (red), and 255 nm (green); AND—andrographolide, NAND—neoandrographolide, and DAND—14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide.

**Table 3.** Method calibration data.

Analyte	Linearity Range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Slope (a)	Intercept (b)	Regression Coefficient (r)	Limit of Detection (LOD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Limit of Quantitation (LOQ, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
AND	4–12	45.339	15.904	0.9989	0.04	0.15
NAND	4–12	39.255	7.130	0.9999	0.10	0.32
DAND	4–12	44.837	−0.807	0.9987	0.02	0.06

The precision of the bioanalytical method explained the closeness of the data between multiple individual samples of the same concentration prepared by the MEPS procedure and analyzed on the same day and separate days. The intra-day precision was performed at four different quality control samples at LLOQ level (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ULOQ level (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and two middle points (6 and 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in six replicates. The inter-day precision was performed at the same concentration levels on three consecutive days in three replicates. The data expressed as RSDs are presented in Table 4. RSD values for an intra-day precision range from 0.51 to 3.10% and for inter-day from 1.67 to 7.11%, showing that results were reproducible. As per ICH and FDA guidelines, the RSD should be lower than 15% for all QC levels except the LLOQ level where it should be lower than 20%.



**Figure 7.** Residual plots of calibration curves for andrographolide (AND) (A), neoandrographolide (NAND) (B), and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (DAND) (C).

**Table 4.** Precision and accuracy data.

Analyte	Nominal Concentration (µg/mL)	Precision		Accuracy
		Intra-Day (RSD, %; n = 6)	Inter-Day (RSD, %; n = 9)	Recovery (%; n = 3)
AND	4	3.09	2.04	98.89
	6	2.27	2.92	99.63
	8	0.65	3.30	94.97
	12	0.90	7.52	91.04
NAND	4	2.66	3.01	96.76
	6	1.35	1.67	93.35
	8	1.53	3.54	93.90
	12	2.48	6.23	93.60
DAND	4	2.81	6.72	95.56
	6	3.10	5.16	100.42
	8	0.51	5.88	97.42
	12	1.12	7.11	98.65

The accuracy of the bioanalytical method explained the closeness of the experimental results to the actual value. Method accuracy was evaluated by recovery assays at the same concentration levels as precision samples in three replicates. The recovery was found to be between 91.04 and 100.34%, indicating that the developed method was accurate. According to ICH and FDA guidelines, the accuracy at each QC level should be within  $\pm 15\%$  of the nominal concentration, except at the LLOQ, where it should be within  $\pm 20\%$ .

Carry-over was tested in three analytical runs, where blank samples were injected after the ULOQ samples. The response obtained at the retention time of AND, NAND, and DAND in the blanks was compared to the LLOQ response of each analyte. The responses of interfering peaks were less than 20% of the responses for spiked samples, therefore there was no carry-over for the established concentration ranges.

Stability experiments were conducted using one QC level (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Benchtop, autosampler, and long-term stability were checked at different time intervals and storage conditions. The spiked QC samples were stored at room temperature for a period of 4 h and analyzed thereafter for determining the benchtop stability of andrographolides. The processed QC samples were stored for 12 h inside the autosampler and analyzed for autosampler stability. The QC samples were stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  for 7 days to check the long-term stability of andrographolides in human plasma. Freshly spiked QC samples were used for comparison of the concentration of andrographolides with stored stability samples. The acceptance criteria for all the stability studies were set to ensure that QC samples should be within 85–115% of the nominal concentration. All stability tests showed no significant difference in concentrations (the decrease in content was up to 14.75%).

### 3.4. MS Analysis

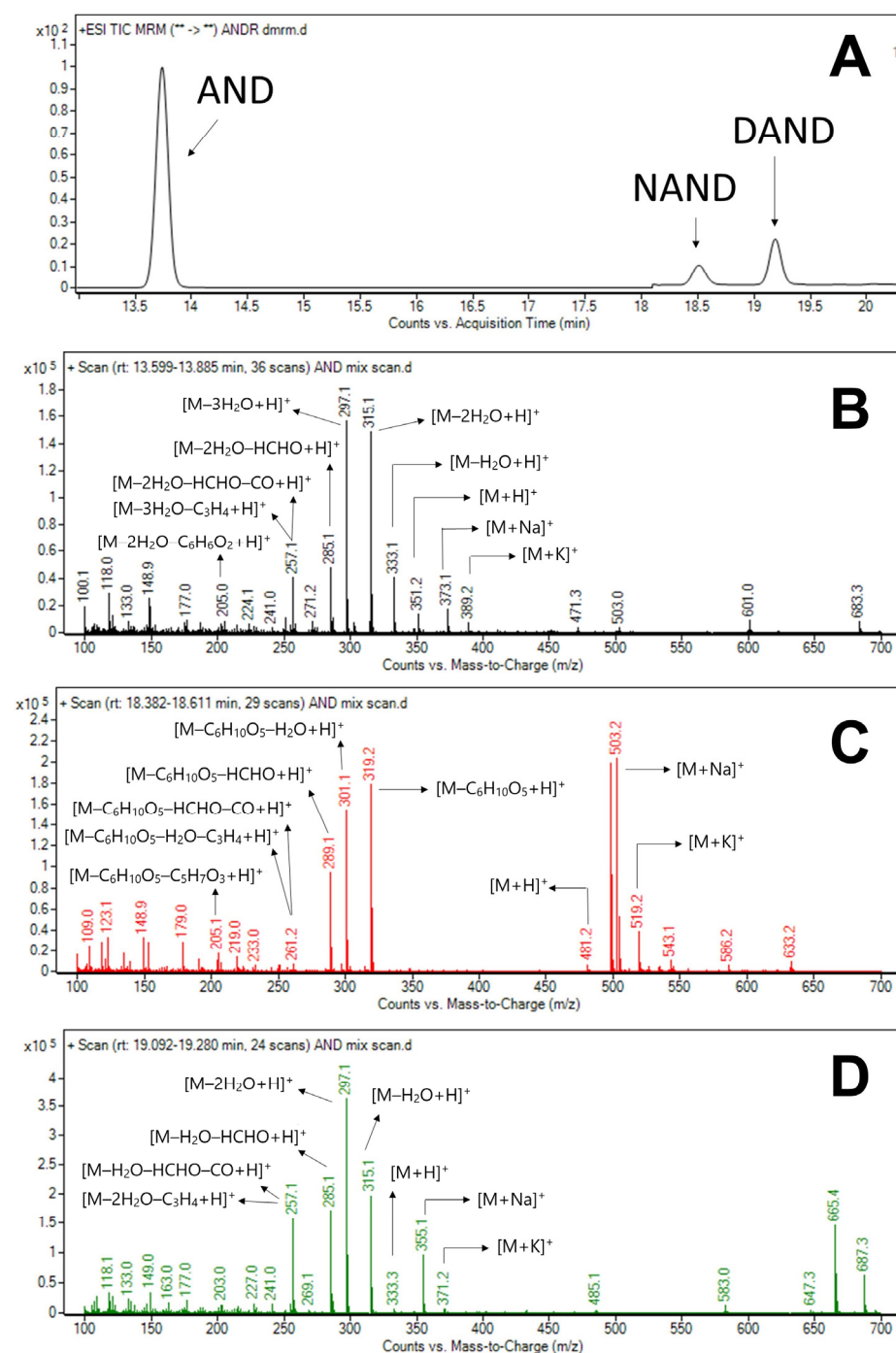
The response of analytes to ESI was evaluated by recording the full-scan mass spectra in both positive and negative ionization modes, and the higher signal intensity was obtained in the case of positive ionization mode for all andrographolides. The total-ion chromatogram obtained by dMRM mode and full-scan product ion spectra of investigated andrographolides are presented in Figure 8.

AND was detected as the pseudomolecular ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$  at  $m/z$  351.2 and gave adductor ions with sodium  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  and potassium  $[\text{M} + \text{K}]^+$  at  $m/z$  373.1 and 389.1, respectively. Considering the formation of notable three fragment ions at  $m/z$  333.1, 315.1, and 297.1, it is possible to assume that the consecutive loss of water molecules is favored for AND. A fragment ion at  $m/z$  285.1 was formed from a fragment ion at  $m/z$  315.1 due to the loss of HCHO group, while a fragment ion at  $m/z$  257.1 was furthermore formed due to the loss of CO group. Analysis of spectral data of AND, reveals that the presence of the ion at  $m/z$  257.1 may be also due to the cleavage of  $\text{C}_3\text{H}_4$  group from 297.1. Finally, the fragment ion at  $m/z$  205.0 was assigned to the cleavage of the central linkage between C9-C11 from the fragment ion at  $m/z$  315.1.

The protonated molecular ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$  at  $m/z$  481.2 next to adductor ions with sodium  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  and potassium  $[\text{M} + \text{K}]^+$  at  $m/z$  503.2 and 519.2 was observed for NAND. The cleavage of the *O*-glycosidic group attached to the bicyclic decahydronaphthalene ring allowed the formation of the characteristic fragment ion  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 + \text{H}]^+$  at  $m/z$  319.2. Further fragmentation steps were focused on aglycone, giving information on its structure. Fragments at  $m/z$  301.2 and 289.1, corresponding to the loss of  $\text{H}_2\text{O}$  and HCHO group, were created after *O*-glycosidic bond cleavage. An additional neutral loss of CO group from fragment ion at  $m/z$  289.1 resulted in the formation of low abundance fragment ion at  $m/z$  261.2. Like the fragmentation of AND, this fragment ion may also correspond to the loss of  $\text{C}_3\text{H}_4$  group from fragment ion at  $m/z$  301.1. Analysis of spectral data of NAND also reveals the presence of the ion at  $m/z$  205.1 assigned to the central bridge cleavage.

Comparing the fragmentation of AND and DAND, it can be observed that both molecules underwent similar fragmentation pathways. The product ion spectrum showed the progressive loss of water molecules from the positive pseudomolecular ion observed at  $m/z$  333.3. In addition, the fragment ion at  $m/z$  257.1 after the neutral loss of CO group

form the fragment ion at  $m/z$  285.1 and  $C_3H_4$  group from the fragment ion at  $m/z$  297.1, respectively, was identical to the one observed for AND.



**Figure 8.** The total ion chromatogram of the standard mixture (10  $\mu\text{g/mL}$ ) (A) collected in dMRM mode (quantitation transitions ( $m/z$ ): 351  $\rightarrow$  297, 481  $\rightarrow$  319 and 333  $\rightarrow$  297) and full-scan product ion spectra of andrographolide (AND) (B), neoandrographolide (NAND) (C), and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (DAND) (D).

The proposed fragmentation patterns for andrographolides were confirmed using CFM-ID v4.0 software for competitive fragmentation modelling [29]. Furthermore, the proposed fragmentation patterns of andrographolides bear a close resemblance to the ones published by Song and co-workers [30] and Zhao and co-workers [31]. Though, owing to careful MS optimization our procedure revealed new fragments and fragmentation pathways.

The compound-dependent MS parameters (precursor, qualifier, quantifier ions, fragmentator, as well as collision energy) were carefully optimized for each andrographolide by flow injection analysis using MassHunter Optimizer software. MRM parameters were optimized to achieve the most abundant, specific, and stable MRM transition for each compound (Table 5). AND and DAND during ionization in the ion source formed fragments with the same  $m/z$ . The same phenomenon was also found during the investigation of Xu and co-workers [22] for negative ionization mode. To avoid the “cross-talk” effect the method optimization was directed toward the complete separation of analytes. Furthermore, the dMRM mode that executes an MRM transition around the elution time of a compound supported accurate and reliable quantification of AND and DAND (Table 6). Finally, superior selectivity of the method was observed using an advanced MS detector confirming the suitability of the developed chromatographic method with the MEPS sample preparation procedure for the determination of andrographolides in human plasma samples.

**Table 5.** MS parameters for andrographolides.

Analyte	Quantitation Transition ( $m/z$ )	Conformation Transition ( $m/z$ )	Fragmentator Voltage (V)	Qualifier Ratio	Collision Energy (eV)
AND	351 → 297	351 → 257	215	89	100
NAND	481 → 319	481 → 289	89	43	76
DAND	333 → 297	333 → 257	83	75	56

**Table 6.** Method calibration data for MS detection of andrographolides.

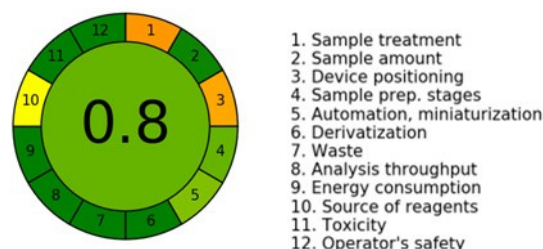
Analyte	Linearity Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope (a)	Intercept (b)	Regression Coefficient (r)	Limit of Quantitation (LOQ, $\mu\text{g/mL}$ )
AND	0.07–10	3045.35	1670.45	0.9987	0.07
NAND	0.07–10	697.15	393.10	0.9984	0.07
DAND	0.07–10	2070.11	196.46	0.9992	0.07

### 3.5. Analytical Method Greenness Score Evaluation

Several approaches to analytical green method score evaluation have been developed so far. The greenness of analytical procedures is a multivariate and complex parameter that is not easily quantifiable. These approaches should be used during method development to quantify the technical aspects of the proposed analytical procedure and identify points for improvement. Thus, the selection of approach was based on availability, suitability for the developed analytical procedure, and simplicity of output to obtain meaningful data for the development of a green bioanalytical method for andrographolides.

We have used the newest greenness assessment software AGREE calculator based on the conversion of 12 principles of green analytical chemistry into variables: sampling procedure, sample size, in situ measurement, steps in the process, miniaturization, derivatization, waste, number of analytes, energy, type of reagents, the toxicity of reagents, and operator safety. After completion of the developed method evaluation, the score of each criterion is weighted and combined to yield the overall score that ranges from 0 to 1, with 1 and dark green color representing optimum performance. The result for the proposed chromatographic method with MEPS sample preparation is presented as a round pictogram with a circle in the center that shows the overall score of 0.8, colored in green, indicating that the developed method is obeying the eco-friendly conditions (Figure 9). The surrounding bars corresponding to the 12 criteria provided an easy way to identify the weak and strong points of our procedure and their contribution to the final score. A closer look at the 12 criteria used for the greenness assessment, shows that the most critical points of our analytical procedure include sample preparation (criteria 1 and 3 highlighted in orange) followed by consumption of organic solvents highlighted in yellow. Criteria

1 and 3 promote in situ measurements and the avoidance of sample preparation, both unrealizable for biological samples. Thus, the obtained results identify the sample collection and preparation as weak points of the bioanalytical methods and the importance of microextraction techniques in bioanalytical method development as an indispensable step in the development of eco-friendly methods.



**Figure 9.** Results of AGREE analysis for UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS method.

Taken together, these findings highlight the role of microextraction in bioanalytical studies. The current work was aimed at considering the possibilities of solid-phase microextraction in the bioanalysis of andrographolides. However, our investigations into this area are still ongoing. Further studies, which take the liquid–liquid microextraction into account, will need to be undertaken. This green sample preparation procedure has been advanced over the two last decades and several variations of the technique have been developed. Moreover, the development of new green solvents provides encouragement for a new way of sample preparation optimization.

#### 4. Conclusions

This research describes the usefulness of the MEPS sample preparation procedure for the eco-friendly extraction of major pharmacologically active ingredients present in the extract of *A. paniculata* used as an anti-inflammatory remedy. Optimized MEPS procedure using SDVB sorbent allowed miniaturization of sample volume, diminishing the consumption of organic solvents, excellent analytes' concentration, and sample clean-up as well as high recovery.

To support the optimization of the microextraction procedure chromatographic analysis was developed and validated according to internationally relevant guidelines. The present findings confirm the high reliability of sample preparation and analysis procedures.

The newest greenness assessment software AGREE calculator based on the conversion of 12 principles of green analytical chemistry to the variable that cover all aspects of preanalytical and analytical procedures was used for the evaluation of the environmental performance of the developed UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS method. This aspect of research suggests that our advanced method is obeying eco-friendly conditions. Moreover, the sample collection and preparation were identified as weak points of the bioanalytical methods and the importance of microextraction techniques in bioanalytical method development is an indispensable step in the development of eco-friendly methods.

To sum up, we have found innovative and sustainable analytical solution for further pharmacokinetic studies of biologically active andrographolides present in green chiretta extracts.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.M. and J.K.; Methodology, J.K., M.-L.J. and D.A.K.; Validation, J.K.; Formal Analysis, J.K.; Investigation, J.K., M.-L.J., A.M. and D.A.K.; Resources, A.M. and D.A.K.; Data Curation, J.K.; Writing—Original Draft Preparation, A.M. and J.K.; Writing—Review and Editing, M.-L.J. and D.A.K.; Visualization, J.K.; Supervision, A.M.; Project Administration, A.M.; Founding Acquisition, A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Croatian Science Foundation, grant numbers HRZZ-UIP-2017-05-3949 and HRZZ-DOK-2021-02-7922 and the European Regional Development Fund grant number KK.01.1.1.02.0021.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within article.

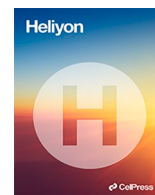
**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kaplan, G.G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *12*, 720–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jairath, V.; Feagan, B.G. Global burden of inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *5*, 2–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kuenzig, M.E.; Fung, S.G.; Marderfeld, L.; Mak, J.W.Y.; Kaplan, G.G.; Ng, S.C.; Wilson, D.S.; Cameron, F.; Henderson, P.; Kotze, P.G.; et al. Twenty-first century trends in the global epidemiology of pediatric-onset inflammatory bowel disease: Systematic review. *Gastroenterology* **2022**, *162*, 1147–1159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Roda, G.; Chien, N.S.; Kotze, P.G.; Argollo, M.; Panaccione, R.; Spinelli, A.; Kaser, A.; Peyrin-Biroulet, L.; Danese, S. Crohn's disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2020**, *6*, 22. [[CrossRef](#)]
5. Al-Bawardy, B.; Shivashankar, R.; Proctor, D.D. Novel and emerging therapies for inflammatory bowel disease. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 651415. [[CrossRef](#)]
6. Torres, J.; Ellul, P.; Langhorst, J.; Mikocka-Walus, A.; Barreiro-de Acosta, M.; Basnayake, C.; Sheng Ding, N.J.; Gilardi, D.; Katsanos, K.; Moser, G.; et al. European Crohn's and Colitis Organisation Topical review on complementary medicine and psychotherapy in inflammatory bowel disease. *J. Crohns Colitis* **2019**, *13*, 673–685e. [[CrossRef](#)]
7. Bailey, R.L. Current regulatory guidelines and resources to support research of dietary supplements in the United States. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 298–309. [[CrossRef](#)]
8. Vanti, G. Recent strategies in nanodelivery systems for natural products: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 4311–4326. [[CrossRef](#)]
9. Brusac, E.; Jeličić, M.-L.; Nigović, B.; Amidžić Klarić, D.; Mornar, A. Determination of curcuminoids, piperine, boswellic acids and andrographolides in food and dietary supplements by HPLC. *Food Technol. Biotechnol.* **2022**, *60*, 1–41. [[CrossRef](#)]
10. Cai, Q.; Zhang, W.; Sun, Y.; Xu, L.; Wang, M.; Wang, X.; Wang, S.; Ni, Z. Study on the mechanism of andrographolide activation. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 977376. [[CrossRef](#)]
11. Tang, T.; Targan, S.R.; Li, Z.S.; Xu, C.; Byers, V.S.; Sandborn, W.J. Randomised clinical trial: Herbal extract HMPL-004 in active ulcerative colitis—A double-blind comparison with sustained release mesalazine. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *33*, 194–202. [[CrossRef](#)]
12. Sandborn, W.J.; Targan, S.R.; Byers, V.S.; Ruddy, D.A.; Mu, H.; Zhang, X.; Tang, T. Andrographis paniculata extract (HMPL-004) for active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2013**, *108*, 90–98. [[CrossRef](#)]
13. Jeličić, M.-L.; Amidžić Klarić, D.; Kovačić, J.; Verbanac, D.; Mornar, A. Accessing lipophilicity and biomimetic chromatography profile of biologically active ingredients of botanicals used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 965. [[CrossRef](#)]
14. Godugu, D.; Rupula, K.; Sashidhar, R.B. Binding studies of andrographolide with human serum albumin: Molecular docking, chromatographic and spectroscopic studies. *Protein Pept. Lett.* **2018**, *25*, 330–338. [[CrossRef](#)]
15. Ali, I.; Al-Othman, Z.A.; Nagae, N.; Gaitonde, V.D.; Dutta, K.K. Recent trends in ultra-fast HPLC: New generation superficially porous silica columns. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 3235–3249. [[CrossRef](#)]
16. Ali, I.; Gupta, V.K.; Aboul-Enein, H.Y.; Hussain, A. Hyphenation in sample preparation: Advancement from the micro to the nano world. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 2040–2053. [[CrossRef](#)]
17. Gondaliya Vaishali, L.; Patel, J.H.; Varia, R.D.; Bhavsar, S.K.; Vihol, D.; Modi, D. Pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of andrographolide in rats. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 1458–1463. [[CrossRef](#)]
18. Syukri, Y.; Widarno, I.S.; Adewiyah, A.; Wibowo, A.; Martien, R.; Lukitaningsih, E.; Nugroho, A.E. Development and validation of a simple HPLC-UV method for the quantification of andrographolide in rabbit plasma. *Int. J. Drug Deliv. Technol.* **2017**, *7*, 22–26. [[CrossRef](#)]
19. Bera, R.; Ahmed, S.K.; Sarkar, L.; Sen, T.; Karmakar, S. Pharmacokinetic analysis and tissue distribution of andrographolide in rat by a validated LC-MS/MS method. *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 321–329. [[CrossRef](#)]
20. Pholphana, N.; Panomvana, D.; Rangkadilok, N.; Suriyo, T.; Ungtrakul, T.; Pongpun, W.; Thaeopattha, S.; Satayavivad, J. A Simple and sensitive LC-MS/MS method for determination of four major active diterpenoids from *Andrographis paniculata* in human plasma and its application to a pilot study. *Planta Med.* **2016**, *82*, 113–120. [[CrossRef](#)]

21. Wang, J.; Yang, W.; Wang, G.; Tang, P.; Sai, Y. Determination of six components of *Andrographis paniculata* extract and one major metabolite of andrographolide in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2014**, *951–952*, 78–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yang, T.; Xu, C.; Wang, Z.T.; Wang, C.H. Comparative pharmacokinetic studies of andrographolide and its metabolite of 14-deoxy-12-hydroxy-andrographolide in rat by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2013**, *27*, 931–937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Xu, F.F.; Fu, S.J.; Gu, S.P.; Wang, Z.M.; Wang, Z.Z.; He, X.; Xiao, W. Simultaneous determination of andrographolide, dehydroandrographolide and neoandrographolide in dog plasma by LC-MS/MS and its application to a dog pharmacokinetic study of *Andrographis paniculata* tablet. *J. Chromatogr. B* **2015**, *990*, 125–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, L.; Yu, A.; Zhuang, X.; Zhang, K.; Wang, X.; Ding, L.; Zhang, H. Determination of andrographolide and dehydroandrographolide in rabbit plasma by on-line solid phase extraction of high-performance liquid chromatography. *Talanta* **2007**, *74*, 146–152. [[CrossRef](#)]
25. Zhao, Q.; Ding, J.; Jin, H.; Ding, L.; Ren, N. A green method using a micellar system for determination of andrographolide and dehydroandrographolide in human plasma. *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *51*, 341–348. [[CrossRef](#)]
26. ICH M10 on Bioanalytical Method Validation. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline> (accessed on 22 November 2022).
27. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Available online: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (accessed on 22 November 2022).
28. Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE-Analytical GREENess metric approach and software. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 10076–10082. [[CrossRef](#)]
29. CFM-ID Competitive Fragmentation Modelling for Metabolite Identification. Available online: <https://cfmid.wishartlab.com/> (accessed on 22 November 2022).
30. Song, Y.-X.; Liu, S.-P.; Jin, Z.; Qin, J.-F.; Jiang, Z.-Y. Qualitative and quantitative analysis of *Andrographis paniculata* by Rapid Resolution Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules* **2013**, *18*, 12192–12207. [[CrossRef](#)]
31. Zhao, Y.; Kao, C.-P.; Wu, K.-C.; Liao, C.-R.; Ho, Y.-L.; Chang, Y.-S. Chemical compositions, chromatographic fingerprints and antioxidant activities of *Andrographis herba*. *Molecules* **2014**, *19*, 18332–18350. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## Research article

# Development and validation of stability-indicating method of etrasimod by HPLC/DAD/MS/MS technique with greenness profiling

Jelena Kovačić<sup>a</sup>, Daniela Amidžić Klarić<sup>a</sup>, Nikša Turk<sup>b</sup>, Željko Krznarić<sup>b,c</sup>, Ana Mornar<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>b</sup> Department of Gastroenterology, University Hospital Centre, Zagreb, Croatia

<sup>c</sup> School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia



## ARTICLE INFO

## Keywords:

Etrasimod  
Forced degradation study  
Stability-indicating method  
Green chemistry  
Mass spectrometry

## ABSTRACT

Etrasimod, a novel selective sphingosine-1-phosphate receptor modulator, was recently approved by the U.S. Food and Drug Administration and the European Medicinal Agency for the treatment of moderately to severely active ulcerative colitis in adults. In this research, the forced degradation study as an integral part of drug product and packaging development, which generates data on degradation mechanisms, is published. The development and validation of the stability-indicating method using a superior high-performance liquid chromatography technique coupled with a diode array detector and tandem mass spectrometer was performed to support the forced degradation study and monitor the formation of degradation products. Etrasimod demonstrated good stability under elevated temperature and basic stress conditions, while acidic hydrolysis, oxidative, and photolytic degradation produced eight degradation products. The knowledge of degradation products will be useful in the long-term stability study for establishing the acceptance criteria of etrasimod as a drug substance and dosage form during quality control and stability assessment. The eco-friendliness of the developed forced degradation procedure was evaluated using various greenness appraisal tools. The green metric tools showed that the forced degradation procedure obeys eco-friendly conditions.

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is known to be a polygenic disorder in which gene-environment interactions play a role, although the aetiology remains poorly understood. IBD includes two major forms: ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), although there is a small group of patients with an intermediate form. The pathological process of both UC and CD leads to bowel damage driven by an extreme inflammatory reaction against luminal antigens. UC is characterized by diffuse and superficial inflammation of the colonic mucosa and rectum, while CD causes inflammation of the full thickness of the bowel wall in any part of the digestive tract. Common symptoms of this chronic and relapse-remitting inflammatory disease of gastro-intestinal tract during the

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jelena.kovacic@pharma.unizg.hr](mailto:jelena.kovacic@pharma.unizg.hr) (J. Kovačić), [daniela.amidzic@pharma.unizg.hr](mailto:daniela.amidzic@pharma.unizg.hr) (D. Amidžić Klarić), [niksa.turk@gmail.com](mailto:niksa.turk@gmail.com) (N. Turk), [zeljko.krznaric60@gmail.com](mailto:zeljko.krznaric60@gmail.com) (Ž. Krznarić), [ana.mornar@pharma.unizg.hr](mailto:ana.mornar@pharma.unizg.hr) (A. Mornar).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34066>

Received 13 May 2024; Received in revised form 26 June 2024; Accepted 3 July 2024

Available online 4 July 2024

2405-8440/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

active phase of the disease include diarrhea, rectal bleeding, abdominal pain, weight loss, fecal urgency, fatigue, nausea, and vomiting [1–3]. Current treatment recommendations for IBD emphasize the importance of early therapeutic intervention, treat-to-target strategies, and therapeutic drug monitoring. The major goals of IBD treatment are the induction and maintenance of clinical remission, the prevention of complications, and mucosal healing. Current pharmacological options include several drug classes such as aminosalicylates, glucocorticoids, and immunomodulators in case of steroid dependence, followed by biologic therapy. In the last two decades, IBD therapeutic strategies have been completely reshaped after the introduction of biomolecular drugs. They demonstrated unique and differentiative therapeutic mechanisms that can alleviate the inflammation more effectively. But despite these advances, up to one-third of patients fail to respond adequately, while another third of initial responders experience secondary loss of response due to the generation of antibodies to the drug [4]. In the context of searching for novel therapies, the development of oral small drug molecules comprising alternative mechanisms of action has driven a significant investment in drug development, with numerous unique compounds currently being tested for the treatment of IBD [5,6].

There is a growing interest in the clinical development of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor modulators in IBD but also in other domains of medicine, such as rheumatoid arthritis, psoriasis, and atopic dermatitis. S1P is a multifunctional, membrane-derived lysophospholipid signaling molecule implicated in a vast array of physiological and pathophysiological processes. Intracellular S1P synthesis consists of sphingosine phosphorylation. Once generated, S1P is translocated by ABC transporters outside the cells, where it acts as an extracellular lipid mediator via activation of five different subtypes of receptors termed S1PR<sub>1–5</sub>. Activation of S1PR<sub>2</sub> and S1PR<sub>3</sub> may be linked to cardiovascular, pulmonary, and cancer-related adverse events, while subtypes S1PR<sub>1</sub>, S1PR<sub>4</sub>, and S1PR<sub>5</sub> are involved in the mitigation of intestinal inflammation. This finding represents a milestone in the development of selective modulators with the preserved efficacy of S1P receptor modulation and minimal adverse events related to S1PR<sub>2</sub> and S1PR<sub>3</sub> receptor subtypes [7–10].

In 2021, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved ozanimod, an agonist of S1PR<sub>1</sub> and S1PR<sub>5</sub> receptors, for the treatment of moderate-to-severe UC [11]. Etrasimod (2-[(3R)-7-[[4-cyclopentyl-3-(trifluoromethyl)phenyl]methoxy]-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[b]indol-3-yl]acetic acid) represents a next-generation S1P receptor modulator that selectively activates S1P receptor subtypes 1, 4, and 5, with no evident activity on S1PR<sub>2</sub> and S1PR<sub>3</sub> (Fig. 1). The results of phase 3 clinical trials have shown that all key secondary endoscopic, symptomatic, and endohistological endpoints were met. Moreover, the treatment with etrasimod has shown durable efficiency as well as corticosteroid-free clinical remission at week 52. During clinical studies, an increased incidence of adverse events was not observed, showing a favorable safety profile [2]. These findings have shown that etrasimod is a rising star of the IBD therapeutic armamentarium [2,9,10,12,13]. Etrasimod, under the trade name “Velsipity” by Pfizer, was approved by the FDA on October 18, 2023, for the treatment of moderately to severely active UC in adults with the recommended dosage of 2 mg orally once daily. It received marketing authorization from the European Medicinal Agency (EMA) on February 16, 2024 [14,15].

Preformulation and formulation studies are the key steps of the drug development. For marketing approval, stability testing needs to be conducted according to the appropriate regulatory requirements to predict drug performance in the final dosage form. Drug degradation may result in a low amount of drug given to the patient. On the other hand, it may generate hazard degradation products. Forced degradation study can be considered an integral part of drug product and packaging development as it enriches understanding of the decomposition behavior of drugs in various environmental conditions. It generates data on degradation mechanisms and possible degradants that might be produced during product storage [16]. The evaluation of these degradants is essential, as their presence can affect the quality, efficacy, and safety of new drug products [17].

To our knowledge, this is the first report of a forced degradation study of etrasimod, the new, innovative medication for the treatment of IBD. For this study, it was of interest to develop and validate the stability-indicating method to determine the percentage of degradation of etrasimod during forced degradation study. The degradation products formed under stress conditions using a superior high performance liquid chromatography technique coupled with a diode array detector and tandem mass spectrometer (HPLC-DAD-QqQ-MS/MS) were separate. The degradation kinetics of etrasimod is discussed. During method development, the principles of green chemistry were implemented to develop eco-friendly and sustainable analytical methods.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical and reagents

Etrasimod standard was purchased from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA) with purity of 99.82 % (according to supplier certificate analysis). HPLC gradient grade methanol and acetonitrile were supplied from J. T. Baker (Griesheim, Germany). Formic acid (LC-MS grade) was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium hydroxide pellets (ACS reagent, 97.0 %) were

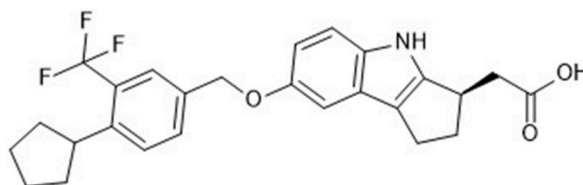


Fig. 1. Chemical structure of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor modulator etrasimod.

supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), while hydrochloric acid (37 %, for analysis) by Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). All experiments used ultra-pure water obtained from the WaterPro water system Labconco (Kansas City, MI, USA) with a resistivity of 18.2 mΩ cm (25 °C).

## 2.2. Preparation of stock and standard solution

The stock solution of etrasimod (100 µg/mL) was prepared by dissolving an appropriate amount of analytical standard in methanol. Further dilutions of the stock solution with a methanol/water (50:50, v/v) mixture produced a series of standard working solutions in the concentration range of 2–10 µg/mL. Standard solution samples for method validation were independently prepared in the same matrix at low (2 µg/mL), middle (6 µg/mL), and high (10 µg/mL) concentrations representative of the range of calibration curves. The solutions were kept in the dark at 4 °C until they were used. As the etrasimod was soluble in a mixture of water and methanol (50:50, v/v), all the stress samples were prepared using the same diluent. Final concentrations of 10 µg/mL, including the added stressor, were injected (5 µL) into the HPLC/DAD/QqQ-MS/MS system.

## 2.3. Chromatographic analysis

In the analysis of the samples, the Agilent 1260 series HPLC system was used with a DAD detector and Ultivo Triple Quadrupole with electrospray ionization (ESI) source all by Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Standard solutions and stress degradation samples were analyzed under gradient elution conditions using chromatographic column Poroshell 120 SB-C18 (3.0 × 100 mm, 2.7 µm particle size; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with an operating temperature of 40.0 ± 0.1 °C. The mobile phase consisted of two eluents, ultra-pure water (eluent A) and acetonitrile (eluent B), both acidified with formic acid (0.1 %) and delivered at a flow rate of 0.8 mL/min with a gradient system (0–6 min 15–50 % B, 6–13 min 50–95 % B, 13–14.5 min 95 % B, and 14.5–18 min 95–15 % B). The injection volume was 5 µL. The DAD quantitation was performed at 227 nm with a slit of 4 nm. The absorbance of the analytes during a chromatographic run was collected in the spectral range of 200–600 nm. Structural characterization of etrasimod and degradation products was carried out using a triple quadrupole. The MS settings were optimized to obtain the maximum signal. Data was generated in the positive mode obtained from an ESI source, operating with the capillary voltages of 3500 V and nebulizer pressure of 30 psi. The gas temperature was set at 350 °C with a gas flow of 11 L/min. A tuning mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used daily as a calibrant. The full scan mass spectra were acquired over a range of  $m/z$  100–600. Highly pure N<sub>2</sub> (>99.9995) was used as the collision gas with the collision energy of 40 V for the etrasimod fragmentation study. Fragmentor voltage was set at 135 V. Data acquisition and processing were performed and carried out using OpenLab ChemStation and MassHunter Workstation software.

## 2.4. Analytical method validation

The newly developed method was validated for the determination of etrasimod according to the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use guidelines (Validation of Analytical Procedures ICH Q2 (R2)) [18].

## 2.5. Forced degradation study

Stress study was carried out as per ICH guidelines (Stability Testing of New Drug Substances and Drug Products Q1A(R2) and Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products Q1B) under different acid, base, oxidative, photolytic, and thermal conditions [19,20]. Degradation study was carried out to demonstrate the specificity of the developed stability-indicating analytical method to investigate the degradation pathways of etrasimod and its stability under stressful conditions. Acid and basis hydrolysis were investigated by dissolving etrasimod to a final concentration of 10 µg/mL using different aqueous hydrochloric acid or sodium hydroxide solutions (0.01–1 M), separately, into amber screw cap vials and samples were left at room temperature. For oxidative studies, etrasimod solutions (final concentration 10 µg/mL) were separately incubated into amber screw cap vials with hydrogen peroxide aqueous solutions (3–33 %) at room temperature. Photostability was investigated by exposing etrasimod solution (10 µg/mL) stored in transparent screw cap vials to direct sunlight. Lastly, a thermal stress testing study was carried out by keeping etrasimod solution in amber screw-cap vials in the thermostatically controlled incubator (ES-20/60 by Biosan, Riga, Latvia) maintained at 60 °C. Samples were withdrawn at regular intervals to monitor the degradation process using the proposed HPLC/DAD/QqQ-MS/MS method. The forced degradation studies were carried out until the limit of degradation of 10–20 % was reached, or up to 7 days. For every stress condition, the blank solution is subjected to stress in the same manner as drug solution.

## 2.6. Method greenness profiling

Several theoretical approaches based on principles of green analytical chemistry were used for the evaluation of the eco-friendliness of forced degradation procedure [21–24].

The AMGS approach summarizes data from various sources that contribute to the overall AMGS score, such as solvent preparation of standards and samples, system suitability, sensitivity, mobile phase selection, instrument conditions, and instrument energy utilization. The outcome is given as the overall calculated greenness score, which is obtained by adding the following three scores: solvent energy, instrument energy, solvent environment, health, and safety [21].

The Analytical Eco-scale is based on the penalty points assigned due to the reagents and instrumentation selection. The method's point total is determined by counting from 100. The method can be categorized as "excellent green analysis" (more than 75 points), "acceptable" (between 75 and 50 points), or "inadequate" (less than 50 points) based on the final score [22].

The greenness evaluation by ComplexGAPI is presented in the form of a pictogram that includes a pentagon in the center that represents the general method type, a circle in the center denoting quantitative analysis, and four additional pentagons mirroring across each of the shape's edges, representing four main categories of assessment criteria: sample handling (fields from 1 to 4), sample preparation (fields from 6 to 8), required solvents and reagents (fields from 9 to 11), and instrumentation (fields from 12 to 15). An additional hexagonal field at the bottom corresponds to the category of pre-analysis processes (fields from I to VI). These sectors are highlighted by means of three colors (red, yellow, and green) based on their contribution to the eco-friendliness of the method [23].

To evaluate the greenness of analytical procedure, the AGREE approach converts each of the twelve principles of green analytical chemistry into scores. AGREEprep is the first tool designed for the assessment of analytical sample preparation greenness based on ten consecutive steps of assessment that correspond to the ten principles of green sample preparation. Assessment is also based on the possibility of distinguishing between criteria of importance by assigning them weights. Both approaches present results as a round pictogram with a circle in the center that shows the overall score using a reference scale ranging from 0 to 1 (where 1 represents the highest level of eco-friendliness) [24].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Method development and optimization

Chromatographic conditions were optimized during the method development, considering the chemical structure and physico-chemical properties of etrasimod. Based on data calculated by the ACD/Labs program, high lipophilicity (ACD/LogP value was 6.43) and polar surface area ( $62 \text{ \AA}^2$ ) of etrasimod were predicted [25].

Various reversed-phase chromatographic columns (solid phase type: C8 and C18; dimensions: 100 and 150 mm; particle size: 2.7, 3.5, and 5.0  $\mu\text{m}$ ), organic phase type (methanol, acetonitrile) and percentage (10–90 %) in the mobile phase, elution type (isocratic, gradient), and flow rate (0.5–1.0 mL/min) were investigated to optimize chromatographic parameters. Because of the structural similarity between etrasimod and its stress-induced degradation products, simultaneous separation was challenging. Different reversed-phase columns were evaluated, and Poroshell 120 SB-C18 gave high efficiency at lower pressures and the best resolution with outstanding sharp peaks due to its superficially porous particles that have a solid silica core and a porous outer layer. The next step in the method development process was the mobile phase selection. Methanol and acetonitrile were utilized for method development since they are by far the preferred organic modifiers used in reversed-phase chromatography due to their remarkable properties. Among them are complete miscibility with water, relatively low viscosity of their aqueous solutions (particularly in the case of acetonitrile), low UV cut-off wavelength (190 nm and 205 nm for acetonitrile and methanol, respectively), availability in the high purity required for liquid chromatography and mass spectrometry, and low chemical reactivity with most analytes, as well as with analytical equipment and chromatographic column surfaces. During the mobile phase optimization process, several isocratic chromatographic conditions were used in initial scouting, like methanol/water and acetonitrile/water in different proportions. It was observed that acetonitrile was found to be better in terms of resolution and peak shapes as compared with methanol. Even if methanol is less toxic and more easily biodegradable than acetonitrile, it was used as an organic solvent for further investigations. Formic acid as a mobile phase modifier was used mostly due to its compatibility with ESI and the superior ionization efficiency of the analytes. The UV spectrum of etrasimod in the mobile phase showed a maximum at 227 nm, and there were not any interferences that might come from the matrix components. Thus, all the stress samples were analyzed using an easy-to-operate DAD detector in a scan mode covering a range of 200–600 nm, and the final chromatogram was recorded at 227 nm to detect all degradation products.

System suitability parameters were calculated to verify the performance characteristics of the chromatographic analysis for the intended separation. Results are presented in Table 1 and a set of parameters is given: retention time, peak area, peak purity, retention factor, peak symmetry, and theoretical plate count.

#### 3.2. Method validation

The stability-indicating method was successfully validated for determination of etrasimod as per ICH guidelines for the parameters:

**Table 1**  
System suitability parameters of stability-indicating method (concentration level 6  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 6$ ).<sup>a</sup>

Parameter	Symbol	Value	RSD (%)
Retention time (min)	$t_R$	12.01	0.10
Peak area (mAU·s)	$A$	164.41	0.20
Peak purity	$P$	999.99	0.01
Retention factor	$K$	14.49	0.68
Symmetry	$A_s$	0.96	0.29
Theoretical plate count	$N$	311311	0.20

<sup>a</sup> Acceptance criteria: System Repeatability – Relative Standard Deviation (RSD) value less than 2 %, Peak purity – more than 999.0, Retention factor – more than 2.0, Symmetry – between 0.8 and 1.8, Theoretical plate count – more than 2000.

linearity, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), precision, accuracy, and standard solution stability [18].

The linearity of method is presented in Table 2. Each calibration standard was prepared in triplicate, and the validity of the method was proved by evaluating the regression line statistically. The high value of the correlation coefficient (0.9998) indicates the good linearity of the method over the specified concentration range. Furthermore, the accuracy of the back-calculated concentrations of each calibration standard was evaluated, and it was found to be within  $\pm 2.1$  % of the nominal concentration at all investigated levels. Finally, the residual analysis was performed to check the assumptions of linearity and homoscedasticity (Fig. S1). The residuals appeared to be randomly scattered about zero in residual plots versus fits and versus order, revealing that the errors had constant variance and each error was independent of all other errors.

LOD and LOQ values represent the concentration of the analyte that would yield a signal-to-noise ratio of 3 for LOD and 10 for LOQ. The values were found to be 0.10 and 0.34  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Table 2).

The repeatability, or intra-day precision, expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time. It was evaluated with six standard solutions (6  $\mu\text{g/mL}$ ), and the assay value was expressed in terms of relative standard deviation (RSD) and the box-and-whisker plot (Fig. S2). The intermediate precision, or inter-day precision, expresses within-laboratories variations. It was performed at the same concentration level on three consecutive days in three replicates. The inter-day variation is also expressed in terms of the RSD value. Both values were found to be below 0.39 %, indicating good precision, as depicted in Table 2.

The accuracy was determined at three concentration levels: low (2  $\mu\text{g/mL}$ ), medium (6  $\mu\text{g/mL}$ ), and high (10  $\mu\text{g/mL}$ ) in three replicates. Recoveries ranging from 100.3 to 102.0 % with RSD values lower than 0.28 % and accuracy errors lower than 0.04 demonstrate satisfactory accuracy of the method (Table 2).

Stability experiments were conducted using etrasimod standard solution (6  $\mu\text{g/mL}$ ). Benchtop, autosampler, and long-term stability were checked at different time intervals and storage conditions. The sample was stored at room temperature for a period of 4 h and analyzed thereafter to determine the benchtop stability of etrasimod. The autosampler stability was evaluated using a sample stored inside the autosampler for 8 h at 4 °C. The long-term stability was carried out by storing the standard solution of etrasimod at  $-20$  °C for seven days. The stability testing solutions were assayed against fresh samples. All stability tests showed no significant difference in etrasimod concentrations, with recoveries between 100.1 and 101.2 %.

### 3.3. Forced degradation study

A forced degradation study was performed to define the chemical stability of etrasimod under different stress conditions. We conducted the study based on the ICH guidelines (Q1A(R2) and Q1B) [19,20]. The primary stress conditions we chose were 0.01 M HCl, 0.1 M HCl, 1 M HCl, 0.01 M NaOH, 0.1 M NaOH, 1 M NaOH, 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 33 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , light, and a temperature of 60 °C. A degradation of 10–20 % can be found as a recommendation for stress testing to produce relevant degradation products. The above-described validated chromatographic method was used for the determination of etrasimod concentration in stress samples. The etrasimod concentration of 10  $\mu\text{g/mL}$  was used due to its low solubility. Stressed sample chromatograms are illustrated in Fig. 2.

A total of eight novel degradation products were formed under different stress conditions that were never reported earlier. Relative

**Table 2**  
Stability-indicating method validation data for determination of etrasimod.

Validation parameter	Value
Linearity	
Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	2–10
Equation	$y = 28.031x - 4.8094$
Standard error of slope	0.26
Standard error of the intercept	1.74
Correlation coefficient ( $r$ )	0.9998
Regression sum of squares	31445
Residual sum of squares	8.25
Total sum of squares	31453
<i>Sensitivity</i> <sup>a</sup>	
Limit of detection ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.10
Limit of quantitation ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.34
<i>Precision</i> <sup>b</sup>	
Repeatability ( $n = 6$ ; RSD, %)	0.26
Intermediate precision ( $n = 9$ ; RSD, %)	0.39
<i>Accuracy</i> <sup>c</sup>	
Low ( $n = 3$ ; mean recovery, %/RSD, %/accuracy error)	102.0/0.26/0.04
Medium ( $n = 3$ ; mean recovery, %/RSD, %/accuracy error)	100.5/0.28/0.03
High ( $n = 3$ ; mean recovery, %/RSD, %/accuracy error)	100.3/0.09/0.03

<sup>a</sup> The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were obtained by diluting the standard solution based on a signal-to-noise ratio 3:1 and 10:1, respectively.

<sup>b</sup> The repeatability was performed by analyzing the standard solution (6  $\mu\text{g/mL}$ ) within the same day in six replicates, while the intermediate precision was performed by analyzing same solution on three consecutive days in three replicates.

<sup>c</sup> Accuracy was performed by analyzing standard solutions (2, 6, and 10  $\mu\text{g/mL}$ ) in three replicates.

retention times (RRTs) of all those products are lower than 1.0, indicating lower hydrophobicity of degradation products compared to etrasimod. As per the elution pattern, these degradation products were denoted from DP1 to DP8 (Tables 3 and 4).

Seven of eight degradation products at relative retention times of 0.73, 0.83, 0.87, 0.90, 0.94, 0.96, and 0.99 concerning peaks DP1-DP6 and DP8 were formed under the photolytic stress condition within 5 h. Moreover, the most hydrophilic degradation product, DP1, as well as degradation products DP3 and DP5, were produced only by exposing etrasimod to daylight.

Degradation in an acidic environment using 0.01 HCl occurred rapidly, achieving more than 10 % degradation in 5 h. Acidic stress on etrasimod at room temperature resulted in four key degradation products marked as DP2, DP4, DP6, and DP8.

The rate of degradation under oxidative conditions was slower as compared to that of acidic hydrolysis. The chromatographic data

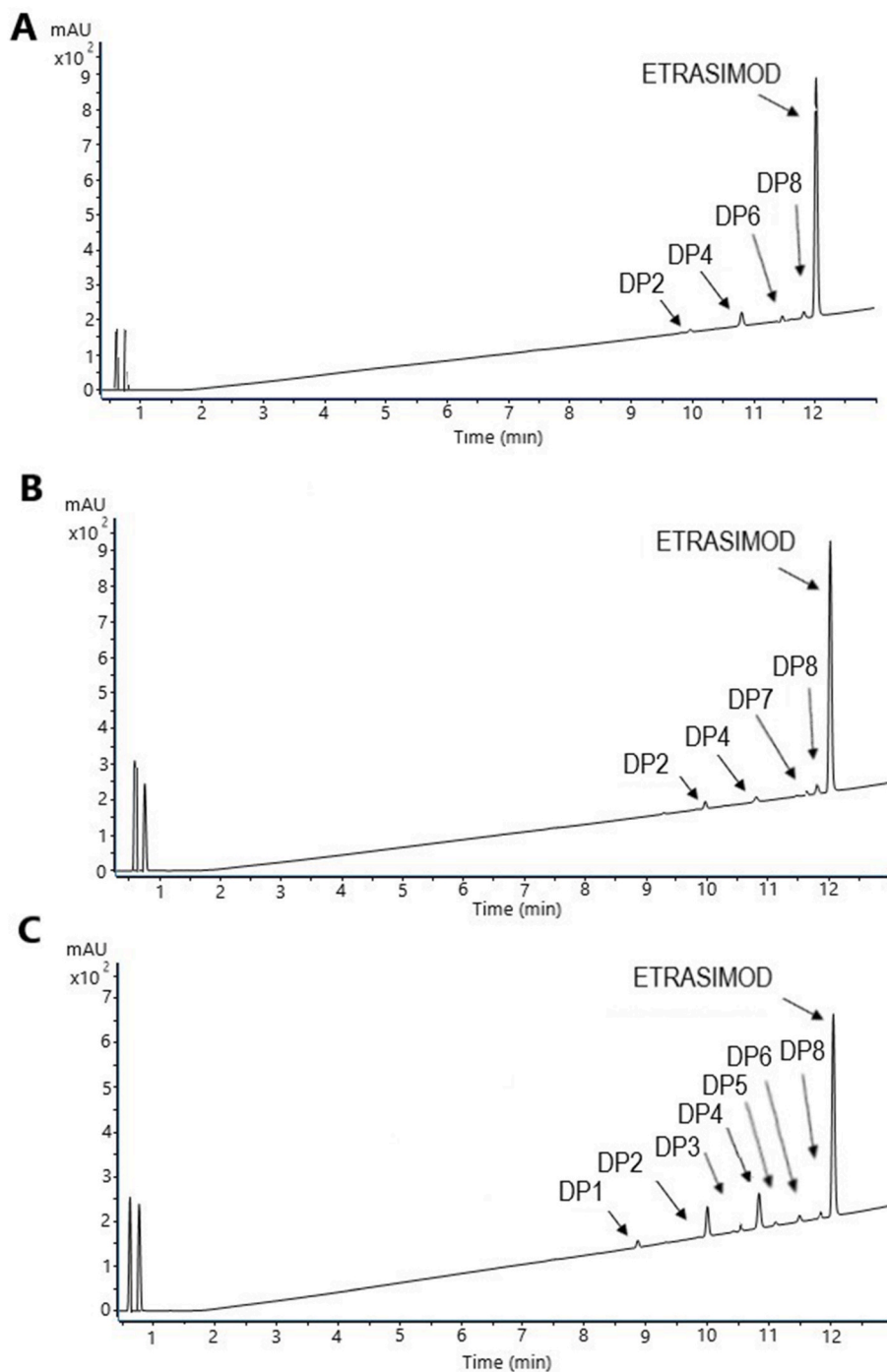


Fig. 2. Representative chromatograms of etrasimod under acidic (A), oxidative (B), and photolytic (C) stress conditions.

**Table 3**  
Forced degradation study results.

Stress condition	Temperature/time	Degradation of etrasimod (%)	Reaction rate constant ( <i>k</i> ), 1/h	Correlation coefficient ( <i>r</i> )	Observation
Base hydrolysis (1 M NaOH)	room temperature/ 7 days; 60 °C/7 days	–	–	–	No degradation observed
Acid hydrolysis (0.01 M HCl)	room temperature/ 5 h	10.46	0.0220	0.987	Formation of degradant products: DP2, DP4, DP6, DP8
Oxidation 33 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	room temperature/ 5 h	10.12	0.0047	0.990	Formation of degradant products: DP2, DP4, DP7, DP8
Thermal degradation	60 °C/7 days	–	–	–	No degradation observed
Photolytic degradation	room temperature/ 5 h	10.32	0.0161	0.950	Formation of degradant products: DP1, DP2, DP3, DP4, DP5, DP6, DP8

**Table 4**  
Retention and mass spectrometric data of etrasimod and degradation products obtained by forced degradation study.

Analyte	Retention time (min)	Relative retention time (RRT)	Retention factor ( <i>k</i> )	Base peak ( <i>m/z</i> )	Major fragments ( <i>m/z</i> )
Etrasimod	12.01	0.0	14.49	458	430, 398, 389, 231, 227, 203, 186, 171, 159, 144
DP1	8.80	0.73	10.35	288	310, 272, 149
DP2	10.02	0.83	11.93	490	528, 512, 472, 458, 412, 227, 159
DP3	10.47	0.87	12.51	508	556, 522, 490, 472, 458, 428, 412, 338, 316, 280, 227, 159, 149
DP4	10.86	0.90	13.01	490	528, 512, 472, 458, 402, 338, 227, 159, 149
DP5	11.24	0.94	13.59	428	338, 284
DP6	11.50	0.96	13.83	504	556, 526, 458, 430, 338, 284, 149
DP7	11.62	0.97	14.00	561	583, 531, 458, 430, 338, 272, 149
DP8	11.89	0.99	14.34	326	364, 338, 284, 257, 149

on the oxidative stress sample showed the formation of four degradation products. DP2, DP4, and DP8 were commonly formed under acidic hydrolysis and photolytic degradation conditions, as well as oxidative degradation conditions. The formation of DP7 was only observed under oxidative degradation conditions.

Degradation in basic conditions using 1 M NaOH did not provide noteworthy etrasimod degradation in seven days. However, a rise of a potentially relevant degradation product was noticed at a level of 0.92 % of the total peak area. On the other hand, basic conditions did not provide further degradation of etrasimod even when an elevated temperature of 60 °C was applied. Likewise, there was no major degradation observed in thermal degradation conditions even after exposure of the drug to stress conditions for 7 days, indicating that the drug is highly stable at elevated temperatures.

In order to determine the selectivity of the method, peak purity analysis was done by using diode array detection. The peak purity of etrasimod in all stress samples was higher than 999. The forced degradation study proved that the developed method is stability-indicating and capable of separating the closely eluting degradation products (resolution between adjacent peaks was higher than 1.5 in all stressed samples).

Furthermore, the order of etrasimod degradation was evaluated to support the establishment of its shelf life and optimum storage conditions for drug substance and dosage forms. To perform a degradation kinetics study of etrasimod the samples were collected at predefined time intervals (data collected at six time points: 0, 1, 2, 3, 4, and 5 h). The concentrations of the remaining etrasimod were calculated, and the reaction order was established by plotting the drug concentration (zero-order), the logarithm (first-order), and the reciprocal (second-order) versus time. The regression equations were computed, the correlation coefficients (*r*) were obtained, and the best-observed fit indicated the reaction order. The results of the forced degradation study found clear support for the first-order degradation reaction of etrasimod, as the degradation reaction rate under all stress conditions was proportional to a decrease in the initial concentration of the drug as a function of time (Table 3). The highest degradation rate coefficient (*k*) was achieved for acid degradation ( $k = 0.022 \text{ h}^{-1}$ ), indicating the fastest degradation of etrasimod in an acidic environment.

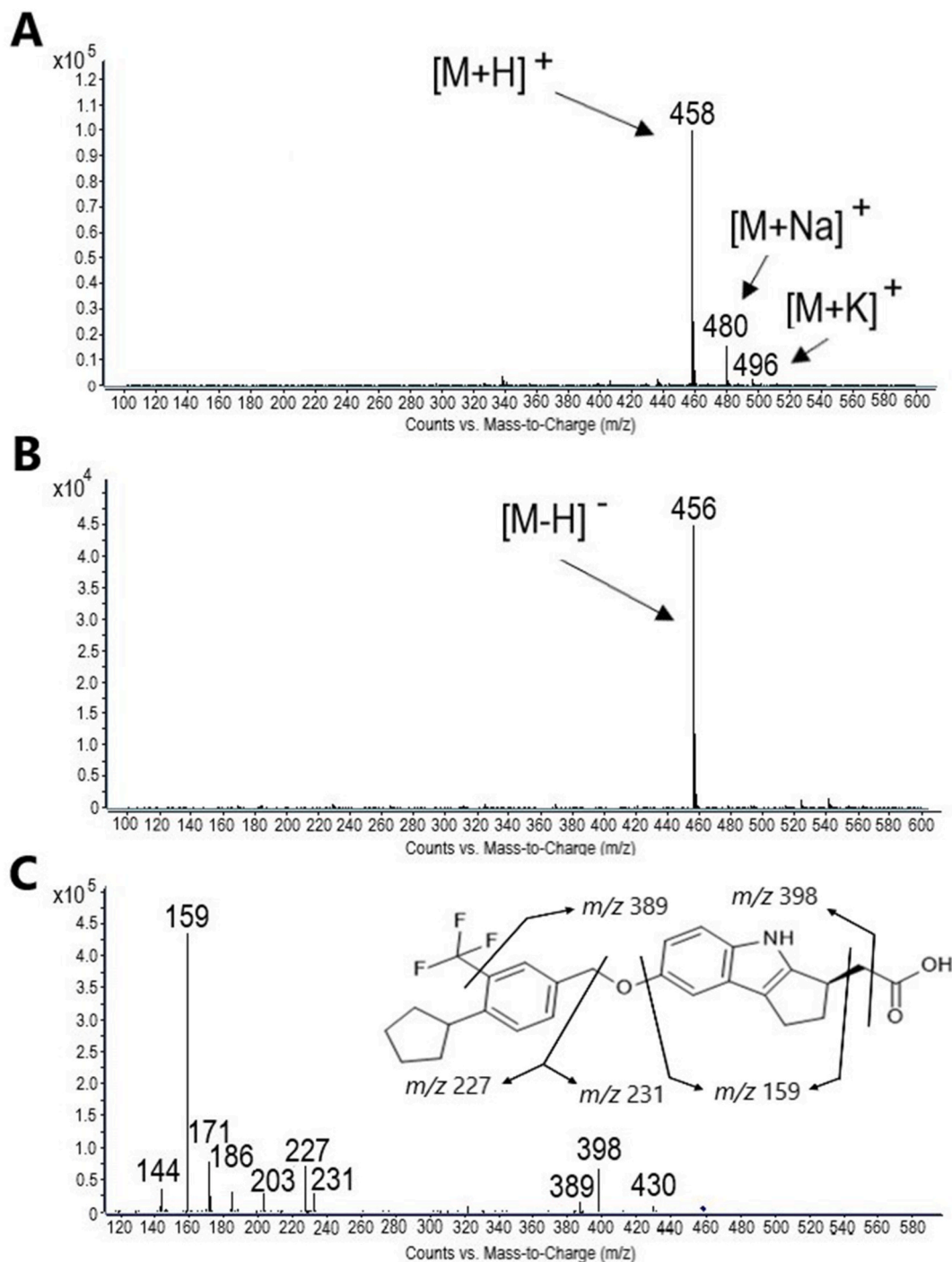
### 3.4. Mass spectrometry of etrasimod and degradation products

Monitoring of the degradation products relied on the in-depth study of the mass spectrum of etrasimod and its degradation products to pinpoint the characteristic fragmentation processes. A highly sensitive Triple Quadrupole mass spectrometer coupled with an electrospray ionization source was used to characterize etrasimod and its degradation products [26].

Initially, etrasimod was subjected to an MS scan to determine the *m/z* value and its prominent signals. The response of etrasimod to ESI was evaluated by recording the full-scan mass spectra in both positive and negative ionization modes. Although the negative ionization mode showed lower background noise, a higher signal intensity was obtained in the case of the positive ionization mode (Fig. 3). Etrasimod was observed with a major ion corresponding to the protonated molecule  $[M+H]^+$  at *m/z* of 458, with the presence

of the adduct ions  $[M+Na]^+$  and  $[M+K]^+$  at  $m/z$  of 480 and 496, respectively.

Subsequently, an MS/MS experiment was performed to gain comprehensive knowledge of the fragmentation behavior of the drug, aiding in the establishment of a fragmentation pattern for etrasimod. The detailed ESI-MS/MS spectrum of etrasimod is depicted in Fig. 3. The fragmentation behavior of etrasimod shows the breaking of the precursor ion  $m/z$  458 into many different product ions ( $m/z$  430, 398, 389, 231, 227, 203, 186, 171, 159, and 144). One of the most prominent peaks ( $m/z$  398) was obtained by McLafferty rearrangement occurring next to the carboxylic group. The  $m/z$  of 389 was produced from the parent ion with the loss of the



**Fig. 3.** MS and MS/MS spectra of etrasimod: positive ESI-MS spectrum (A), negative ESI-MS spectrum (B), and ESI-MS/MS spectrum of  $[M+H]^+$  ion ( $m/z$  458) with proposed fragmentation pattern (C).

trifluoromethyl group through cleavage of the C–C bond. The heterolytic cleavage of the C–O bond between the phenyl ring and central tricyclic cyclopenta[*b*]indol ring resulted in the generation of two ions with  $m/z$  of 227 and 231. HPLC/MS/MS analysis demonstrated the base peak at  $m/z$  of 159. This fragment ion was suspected to correspond to the central tricyclic ring produced by the removal of the 4-cyclopentyl-3-(trifluoromethyl)phenyl]methoxy fragment, followed by the neutral loss of 60 Da observed by the cleavage of the –CH<sub>2</sub>COOH fragment. To our knowledge, only one report on the disposition of etrasimod in healthy subjects giving mass spectrometric data of etrasimod without fragmentation pathways is available in the literature [27].

Following the evaluation of the etrasimod fragmentation pathway, LC-MS data were acquired for each stress sample. Fig. 4 presents the spectra of all eight degradation products (DP1–DP8) obtained when etrasimod is treated under different stress conditions.

The formation of the degradation product DP1 was caused only by photolytic degradation. The MS spectrum of the most hydrophilic degradation product (RRT = 0.73) revealed a pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  of 288 and an adductor ion  $[M+Na]^+$  at  $m/z$  of 310. A mass difference of 170 Da compared to etrasimod accounts for the prominent degradation of the etrasimod molecule. The MSTools simulator was used to propose the molecular formula for DP1. The program revealed that DP1 might be formed by the loss of –CH<sub>2</sub>COOH and –CF<sub>3</sub> groups with a molecular formula of C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO.

MS spectra of degradation products DP2 (RRT = 0.83) and DP4 (RRT = 0.90) show pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  of 490 with adductor ions  $[M+Na]^+$  and  $[M+K]^+$  at  $m/z$  of 512 and 528, respectively. Both the MS spectra with a mass difference of 32 Da compared to etrasimod are similar, except that the intensities of fragment ions were varying, suggesting an isomeric structure for DP2 and DP4. Moreover, etrasimod contains one chiral center, supporting the isomeric structure of its degradation products. The spectra of both degradation products show an ion at  $m/z$  472 suggesting loss of H<sub>2</sub>O from pseudomolecular ions  $[M+H-H_2O]^+$ . Furthermore, the

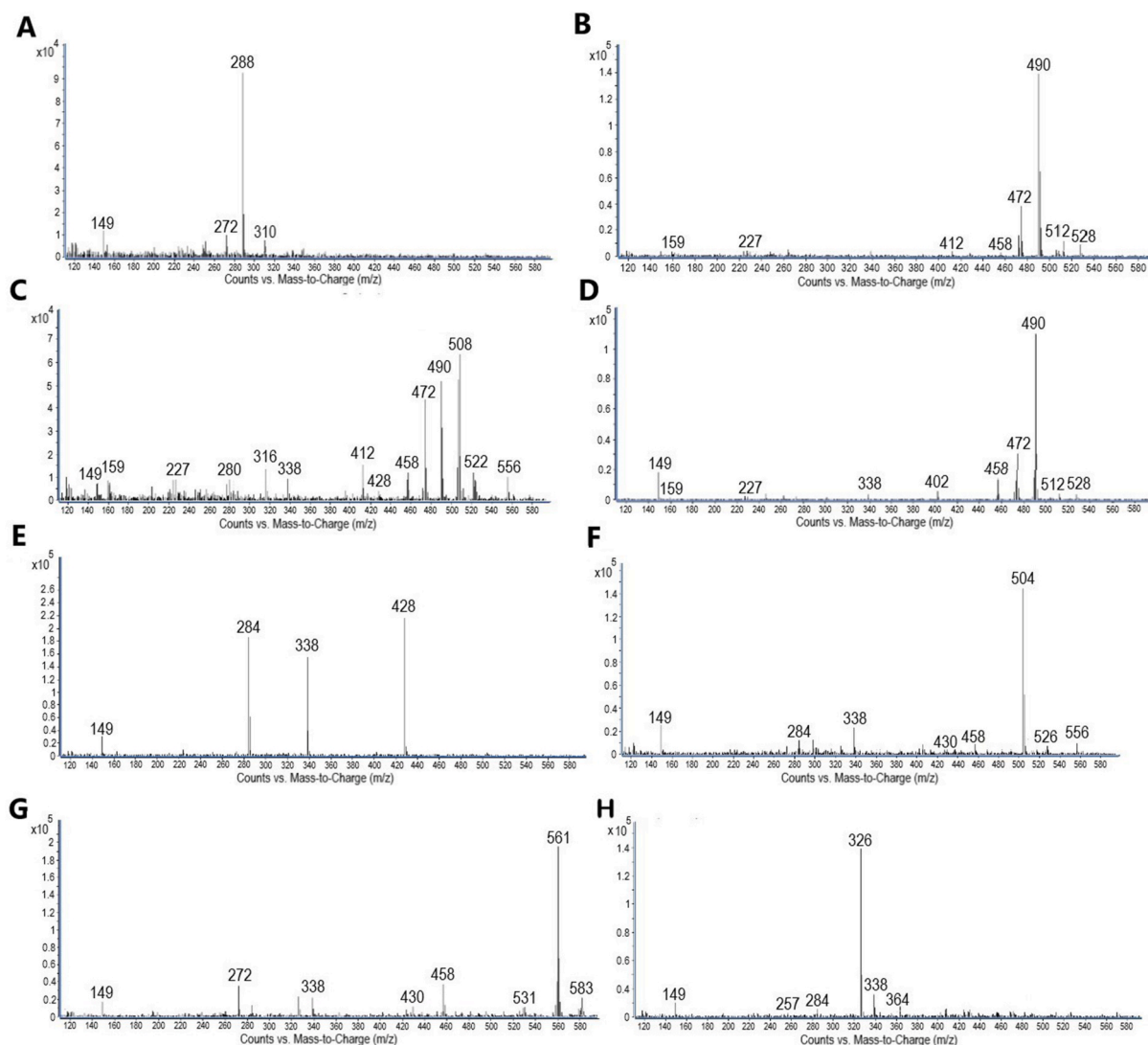


Fig. 4. ESI-MS spectra of degradation products: DP1 (A), DP2 (B), DP3 (C), DP4 (D), DP5 (E), DP6 (F), DP7 (G), and DP8 (H).

ion corresponding to the pseudomolecular ion of etrasimod at  $m/z$  of 458 was observed in their spectra. Although some authors explored the possibility of resolving isomers by MS/MS on the basis of “diagnostic fragments”, these degradation products need to be further distinguished using a chiral chromatographic system [28].

Under photolytic degradation, the degradation product DP3 was formed. Spectrum analysis of this degradation product demonstrated the base peak at  $m/z$  of 508 and other prominent ions at  $m/z$  of 490 (formed by loss of  $H_2O$  from the base peak) and 472 (formed by further loss of  $H_2O$ ). The ions at  $m/z$  458, 227, and 159, which are similar to those obtained for etrasimod, are also observed.

Photolytic degradation formed the product DP5 (RRT = 0.94), whose mass spectrum demonstrated three prominent peaks ( $m/z$  428, 338, and 284). The base peak of DP5 showed a mass difference of 30 Da compared to etrasimod, and thus the MSTools simulator proposed that the photolytic degradation caused the loss of two oxygens and the formation of a degradant with the molecular formula  $C_{26}H_{28}ONF_3$ .

The MS spectrum of degradation product DP6 (RRT = 0.96) shows pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  504 with a mass difference of 46 Da compared to etrasimod. The low abundance adduct ion  $[M+Na]^+$  at  $m/z$  526 is observed in the spectrum as are the ions at  $m/z$  458 and 430, which are similar to those obtained for etrasimod.

Oxidative degradation led to the formation of the degradation product DP7 (RRT = 0.97) with the pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  561 and the low abundance adduct ion  $[M+Na]^+$  at  $m/z$  583, as well as ions at  $m/z$  458 and 430, which are similar to those obtained for etrasimod.

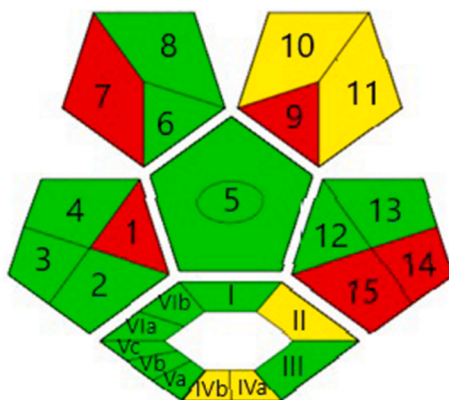
The degradation product DP8 (RRT = 0.99) formed under acidic hydrolysis, oxidation, and photolytic degradation showed pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  326 and the low abundance adduct ion  $[M+K]^+$  at  $m/z$  364. The  $m/z$  257 was produced from the parent ion with the loss of the trifluoromethyl group (loss of 69 Da) through cleavage of the C–C bond.

Based on the data presented in US patent US8853419B2 (Processes for the preparation of (R)-2-(7-(4-cyclopentyl-3-(trifluoromethyl)benzyloxy)-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[b]indol-3-yl)acetic acid and salts thereof) for enantiomeric separation of etrasimod and its impurity (3S), chiral chromatographic columns need to be employed. In our future research, we plan to evaluate the applicability of chiral separation in the forced degradation study of etrasimod. Furthermore, future research should certainly further test the applicability of the developed stability-indicating method to analyze dosage forms.

### 3.5. Green profiling of forced degradation procedure

The criteria of ideal green analysis include the elimination or minimal use of organic solvents and reagents, reduced energy consumption, reduced sample preparation, and no waste generation. In liquid chromatographic analysis, elimination of the use of organic solvents and mobile phase modifiers cannot be applicable, while some practices can be adopted in order to make such procedures greener, such as the replacement of hazardous reagents with their safer and easily degradable equivalents, eliminating or reducing the hazard of waste, reducing the number of stages in a given analytical procedure, and applying miniaturized sample preparation procedures [29]. Finding the most appropriate way to evaluate the green character of an analytical procedure is challenging since many different parameters must be taken into consideration. The sustainability of the developed forced degradation procedure was evaluated using four different greenness appraisal tools.

The first assessment tool was AMGS, which includes the safety, health, and environmental assessment of the solvents utilized, as well as solvent energy demand, instrument energy consumption, and waste production [21]. The calculated greenness score of the forced degradation procedure of etrasimod using the developed stability-indicating method was 629. Based on calculation data, the



**Fig. 5.** The ComplexGAPI pictogram of etrasimod forced degradation study. Legend: 1 – collection, 2 – preservation, 3 – transport, 4 – storage, 5 – type of method, 6 – scale of extraction, 7 – solvents/reagents used, 8 – additional treatment, 9 – amount of reagents and solvents, 10 – health hazard of reagents and solvents, 11 – safety hazard of reagents and solvents, 12 – instrumentation energy, 13 – occupational hazard, 14 – waste, 15 – waste treatment, I – yield, II – pre-analysis temperature and time, III – relation to green economy, IV<sub>a</sub> – health hazard of reagents and solvents used in pre-analysis, IV<sub>b</sub> – safety hazard of reagents and solvents used in pre-analysis, V<sub>a</sub> – technical set up, V<sub>b</sub> – energy of instruments used in pre-analysis, V<sub>c</sub> – occupational hazard of pre-analysis, VI<sub>a</sub> – end products workup, VI<sub>b</sub> – purity. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

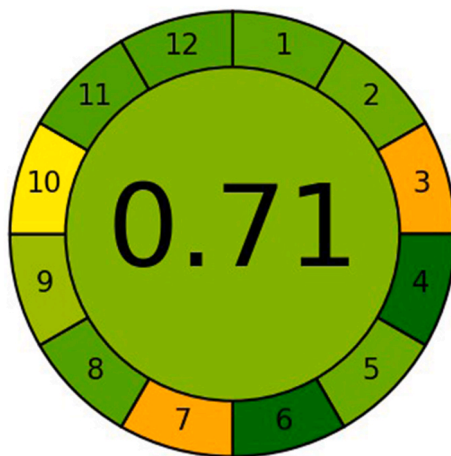
highest contribution to the greenness score was contributed to instrument energy (almost 50 %), followed by solvent influence (more than 35 %). Although the main objective of this tool is to compare methods during method development and an absolute measure of method greenness is not given, the analyst can gain insight into the weak and strong points of the developed analytical procedure. We are aware that the energy consumption of the HPLC/MS/MS technique per single run is about six times higher than that of HPLC, but still, MS detection offered us valuable data on the structural characterization of degradation products.

The Analytical Eco-Scale introduced by Gałuszka and co-workers [22] was used to evaluate the penalty points of the forced degradation procedure. The procedure collected 21 penalty points, and it was ranked on the scale with a score of 79. Although the highest number of penalty points (in total 5) was achieved due to reagents used for the promotion of degradation as well as waste production (in total 5) the procedure was ranked among excellent green analytical procedures with Analytical Eco-Scale above 75.

The greenness evaluation of the proposed analytical procedure performed by ComplexGAPI is presented in the form of a pictogram (Fig. 5). The components of the analytical procedure that correspond to the principles of green analytical chemistry are given in green (15 components), components that somewhat correspond are given in yellow (5 components), and components that do not correspond with the principles are given in red (5 components). Red (fields 1, 7, and 9) and yellow (fields 10 and 11) fields are related to the stability-indicating method due to the usage of organic solvents and formic acid as mobile phase modifiers. Furthermore, each sample analysis produces approximately 7 mL of waste. Still, numerous samples had to be analyzed during method development and validation, making the forced degradation procedure “less green” (fields 14 and 15). The hexagonal field at the bottom of the pictogram describes the green character of pre-analysis processes related to the preparation of stress samples. The ComplexGAPI pictogram indicated yellow fields due to the conduction of thermal stress (field II) and chemical stress (IVa and IVb), although low amounts of these reagents were used.

In an attempt to provide a more complete greenness profile two recently developed complementary metric tools were used, namely, the Analytical GREENness Metric Approach (AGREE) and the Analytical GREENness Sample Preparation Metric Approach (AGREE-prep) [24]. To evaluate the greenness of the forced degradation procedure, the AGREE approach shows the overall score of 0.71, colored in green, indicating that the developed method is obeying the eco-friendly conditions with several limitations (Fig. 6). The performance of the forced degradation procedure in each of the assessment criteria is reflected by the color in the segment with the number corresponding to each criterion. The scores are in the range of 0.33–1.00, reflected in the yellow, orange, and green colors. The inspection of 12 criteria used for procedure greenness assessment highlighted that 9 out of 12 criteria are marked with various hues of green with scores between 0.67 and 1.00. The most critical points of our procedure are related to the usage of hazardous chemicals used for the induction of stress conditions, none of which originates from bio-based sources, making the score equal to 0.5 (criteria 10, highlighted in yellow). Those chemicals produced analytical waste due to stress samples and mobile phase preparation (criterion 7, score 0.33, highlighted in orange). Each sample analysis produces approximately 7 mL of waste that positions this criterion in the middle of the scale. Method development and validation, as well as degradation kinetics of etrasimod evaluation includes numerous sample analysis that need to be considered. The direct analytical methodology in a forced degradation study cannot be applied; thus, criterion 3 is scored with 0.33 and highlighted in orange.

During the forced degradation study of adalimumab, we identified sample preparation as the most critical step from an eco-friendly analytical chemistry point of view [30]. To obtain a more comprehensive approach to the greenness profiling of sample preparation, the AGREEprep approach was applied [29]. The evaluation produced a round pictogram with a circle in the center that shows the overall score of 0.64 colored in light green and ten trapezoid bars corresponding to the ten criteria, each having a length equivalent to the assigned weight and color responding to the greenness of the method parameter (Fig. 7). Compared to green profiling of the overall forced degradation procedure obtained by the AGREE approach, the AGREEprep approach demonstrated lower eco-friendliness of



**Fig. 6.** The AGREE pictogram of etrasimod forced degradation study. Legend: 1 – sample procedure, 2 – sample size, 3 – sampling, 4 – sample preparation steps, 5 – automatization, 6 – derivatization, 7 – waste, 8 – analysis throughput, 9 – energy consumption, 10 – renewable reagents, 11 – toxicity of reagents, 12 – operator’ safety.

sample preparation. The trapezoid bars showed scores in the range of 0.25–1.00, demonstrating the eco-friendliness of each of them with yellow, orange, and green colors. Five green scores with values above 0.66 are earned due to low sample size, energy consumption, and high sample preparation throughput. Criterion 3 promotes materials that are sustainable, renewable, and reusable. As we used recycled materials and reusable laboratory glassware whenever possible, a score of 0.5 was obtained for criterion 3 and is highlighted in yellow. The criteria focused on the application of non-toxic reagents (criterion 2, score 0.43), automatization of analytical procedure (criterion 7, score 0.38), and analyst safety (criterion 10, score 0.25) are highlighted in orange, propounding the weakest point of the forced degradation procedure. We found 5 criteria (1, 3, 4, 5, and 8) focused on sample and waste size more significant in terms of greenness evaluation, and thus modifications of weight lengths were done.

Although the green metric tools for analytical method assessment provided data of diverse complexity, all of them highlighted two major weak points of the performed forced degradation study. Firstly, the energy consumption of the HPLC/MS/MS technique is pointed out; still, we can justify the implementation of this advanced technique as it offered us data on the structural characterization of etrasimod and its degradation products published for the first time. Furthermore, special attention was given to method selectivity, as eight structurally related analytes were determined within the method runtime of 15 min. Secondly, all green metric tools highlighted the use of reagents as the weakest point of the procedure. As there is no alternative to those chemicals for forced degradation conduction in the relevant guidelines, we tried to improve the ecological sustainability of the developed procedure by reducing the volume size of the sample as much as possible without influencing method reliability.

#### 4. Conclusions

In the present work, the forced degradation study of etrasimod was performed using a developed and validated HPLC-DAD-QqQ-MS/MS stability-indicating method. The proposed method proved to be linear, precise, accurate, and selective for the quantitative analysis of etrasimod in stress samples. Etrasimod demonstrated good stability under elevated temperatures and basic stress conditions. The stress conditions produced eight degradation products of etrasimod. The knowledge of the degradation process is useful in establishing the acceptance criteria for etrasimod as a drug substance and drug product during quality control and stability assessment.

The eco-friendliness of the developed forced degradation procedure was evaluated using four different greenness appraisal tools. This aspect of research suggests that the established forced degradation procedure is obeying eco-friendly conditions. As the sample preparation procedure was highlighted as one of the weakest points of the analytical procedure, ecological sustainability was improved by reducing the volume size.

#### Funding

This research was funded by Croatian Science Foundation, grant number HRZZ-UIP-2017-05-3949 and HRZZ-DOK-2021-02-7922 and the European Regional Development Fund grant number KK.01.1.1.02.0021.

#### Data availability statement

Data will be available on request.

#### CRedit authorship contribution statement

**Jelena Kovačić:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Daniela Amidžić Klarić:** Writing – review & editing, Visualization, Conceptualization. **Nikša Turk:** Writing – review & editing, Conceptualization. **Željko Krznarić:** Writing – review & editing, Conceptualization. **Ana Mornar:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### List of abbreviations

CD	Crohn's Disease
IBD	Inflammatory Bowel Disease
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
DAD	Diode Array Detector
EMA	European Medicinal Agency
ESI	Electrospray Ionization
FDA	U.S. Food and Drug Administration
LOD	Limit of Determination



**Fig. 7.** The AGREEprep pictogram of etrasimod forced degradation study. Legend: AGREEprep: 1 – sampling, 2 – hazardous materials, 3 – sustainability, renewability, and reusability of materials, 4 – waste, 5 – economy of a sample, 6 – sample throughput, 7 – automatization, 8 – energy consumption, 9 – analytical instrumentation, 10 – operator's safety.

LOQ	Limit of Quantitation
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
RRT	Relative Retention Time
RSD	Relative Standard Deviation
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
UC	Ulcerative Colitis
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34066>.




#### References

- [1] J. Blackwell, S. Saxena, N. Jayasooriya, A. Bottle, I. Petersen, M. Hotopf, et al., Prevalence and Duration of gastrointestinal symptoms before diagnosis of inflammatory bowel disease and predictors of timely specialist review: a population-based study, *J. Crohns Colitis* 15 (2021) 203–211, <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa146>.
- [2] W.J. Sandborn, S. Vermeire, L. Peyrin-Biroulet, M.C. Dubinsky, J. Panes, A. Yarur, Etrasimod as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis (ELEVATE): two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 studies, *Lancet* 401 (10383) (2023) 1159–1171, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00061-2).
- [3] E.A. Spencer, M. Agrawal, T. Jess, Prognostication in inflammatory bowel disease, *Front. Med.* 9 (2022) 1025375, <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1025375>.
- [4] L. Lucaciu, R. Seicean, A. Seicean, Small molecule drugs in the treatment of inflammatory bowel diseases: which one, when and why? - a systematic review, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 32 (2020) 669–677, <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001730>.
- [5] I. Ben Ghezala, M. Charkaoui, C. Michiels, M. Bardou, M. Luu, Small molecule drugs in inflammatory bowel diseases, *Pharmaceuticals* 14 (2021) 637, <https://doi.org/10.3390/ph14070637>.
- [6] T. Pérez-Jeldres, C.J. Tyler, J.D. Boyer, T. Karuppuchamy, A. Yarur, D.A. Giles, et al., Targeting cytokine signaling and lymphocyte traffic via small molecules in inflammatory bowel disease: JAK inhibitors and S1PR agonists, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 212, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00212>.
- [7] A. Dal Buono, R. Gabbadini, L. Alfarone, V. Solitano, A. Repici, S. Vetrano, et al., Sphingosine 1-phosphate modulation in inflammatory bowel diseases: keeping lymphocytes out of the intestine, *Biomedicines* 10 (2022) 1735, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071735>.
- [8] S. Bencardino, F. D'Amico, I. Faggiani, F. Bernardi, M. Allocca, F. Furfaro, T.L. Parigi, A. Zilli, G. Fiorino, L. Peyrin-Biroulet, et al., Efficacy and safety of S1P1 receptor modulator drugs for patients with moderate-to-severe ulcerative colitis, *J. Clin. Med.* 12 (2023) 5014, <https://doi.org/10.3390/jcm12155014>.
- [9] J. Wang, I. Goren, B. Yang, S. Lin, J. Li, M. Elias, et al., Review article: the sphingosine 1 phosphate/sphingosine 1 phosphate receptor axis - a unique therapeutic target in inflammatory bowel disease, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 55 (2022) 277–291, <https://doi.org/10.1111/apt.16741>.
- [10] M. Argollo, F. Furfaro, D. Gilardi, G. Roda, M. Allocca, L. Peyrin-Biroulet, et al., Modulation of sphingosine-1-phosphate in ulcerative colitis, *Expert Opin. Biol. Ther.* 20 (2020) 413–420, <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1732919>.
- [11] D. Choi, A.P. Stewart, S. Bhat, Ozanimod: a first-in-class sphingosine 1-phosphate receptor modulator for the treatment of ulcerative colitis, *Ann. Pharmacother.* 56 (2022) 592–599, <https://doi.org/10.1177/10600280211041907>.
- [12] T. Wollny, M. Wątek, B. Durnaś, K. Niemirowicz, E. Piktel, M. Żendzian-Piotrowska, et al., Sphingosine-1-phosphate metabolism and its role in the development of inflammatory bowel disease, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 741, <https://doi.org/10.3390/ijms18040741>.
- [13] P.A. Olivera, A. Dignass, M.C. Dubinsky, G. Peretto, P.G. Kotze, I. Dotan, et al., Preventing and managing cardiovascular events in patients with inflammatory bowel diseases treated with small-molecule drugs, an international Delphi consensus, *Dig. Liver Dis.* S1590–8658 (24) (2024) 312–318, <https://doi.org/10.1016/j.dld.2024.03.010>.
- [14] E. Kotsiliti, FDA approvals in gastroenterology and hepatology, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 21 (2024) (2023) 219, <https://doi.org/10.1038/s41575-024-00916-1>.
- [15] M. Shirley, Etrasimod: first approval, *Drugs* 84 (2024) 247–254, <https://doi.org/10.1007/s40265-024-01997-7>.

- [16] P. Sengupta, B. Chatterjee, R.K. Tekade, Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: a comprehensive review, *Int. J. Pharm.* 543 (2018) 328–344, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.007>.
- [17] H. Buschmann, N. Handler, U. Holzgrabe, The quality of drugs and drug products – always guaranteed? *J. Pharm. Biomed. Anal.* 239 (2024) 115880 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115880>.
- [18] ICH Q2R2, Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>. (Accessed 1 February 2024).
- [19] ICH Q1A(R2). <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products-scientific-guideline>. (Accessed 1 February 2024).
- [20] ICH Q1B. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1b-photostability-testing-new-active-substances-medicinal-products-scientific-guideline>. (Accessed 1 February 2024).
- [21] M.B. Hicks, W. Farrell, C. Aurigemma, L. Lehmann, L. Weisel, K. Nadeau, et al., Making the move towards modernized greener separations: introduction of the analytical method greenness score (AMGS) calculator, *Green Chem.* 21 (2019) 1816–1826, <https://doi.org/10.1039/C8GC03875A>.
- [22] A. Galuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 61–72, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013>.
- [23] J. Płotka-Wasyłka, W. Wojnowski, Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software, *Green Chem.* 23 (2021) 8657–8665, <https://doi.org/10.1039/D1GC02318G>.
- [24] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE-Analytical GREEnness metric approach and software, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10076–10082, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.
- [25] F. Wu, Y. Zhou, L. Li, X. Shen, G. Chen, X. Wang, et al., Computational approaches in preclinical studies on drug discovery and development, *Front. Chem.* 8 (2020) 726, <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.0072621>.
- [26] C. Li, S. Chu, S. Tan, X. Yin, Y. Jiang, X. Dai, et al., Towards higher sensitivity of mass spectrometry: a perspective from the mass analyzers, *Front. Chem.* 9 (2021) 813359, <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.813359>.
- [27] C.A. Lee, D.A. Oh, Y. Tang, P. Yi, M. Bashir, S. English, et al., Disposition and mass balance of etrasimod in healthy subjects and in vitro determination of the enzymes responsible for its oxidative metabolism, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 12 (2023) 553–571, <https://doi.org/10.1002/cpdd.1255>.
- [28] S. Crotti, M. Menicatti, M. Pallecchi, G. Bartolucci, Tandem mass spectrometry approaches for recognition of isomeric compounds mixtures, *Mass Spectrom. Rev.* 42 (2023) 1244–1260, <https://doi.org/10.1002/mas.21757>.
- [29] J. Kovačić, M.-L. Jeličić, D. Amidžić Klarić, A. Mornar, Green solid-phase (micro)extraction of andrographolides' from human plasma samples followed by UHPLC-DAD-Qq-MS/MS analysis, *Separations* 10 (2023) 69, <https://doi.org/10.3390/sep10020069>.
- [30] J. Kovačić, D. Amidžić Klarić, N. Turk, A. Mornar, Size exclusion chromatography as green support for forced degradation study of adalimumab, *Acta Pharm.* 73 (2023) 1–13, <https://doi.org/10.2478/acph-2023-0044>.

## Article

# The Stability-Indicating Ultra High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Tandem Mass Spectrometry Method Applied for the Forced Degradation Study of Ritlecitinib: An Appraisal of Green and Blue Metrics

Jelena Kovačić <sup>1</sup>, Daniela Amidžić Klarić <sup>1</sup>, Nikša Turk <sup>2</sup>, Željko Krznarić <sup>2,3</sup>, Emma Riordan <sup>4</sup> and Ana Mornar <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia; jelena.kovacic@pharma.unizg.hr (J.K.); daniela.amidzic@pharma.unizg.hr (D.A.K.)

<sup>2</sup> Department of Gastroenterology, University Hospital Centre, 10000 Zagreb, Croatia; niksa.turk@gmail.com (N.T.); zeljko.krznaric60@gmail.com (Ž.K.)

<sup>3</sup> School of Medicine, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>4</sup> School of Pharmacy, University College Cork, T12 YT20 Cork, Ireland; 121470174@umail.ucc.ie

\* Correspondence: ana.mornar@pharma.unizg.hr

**Abstract:** Background/Objectives: Janus kinase inhibitors open new horizons for small-molecule drugs in treating inflammatory bowel disease, with ritlecitinib demonstrating significant efficacy in clinical trials for ulcerative colitis and Crohn's disease. Ritlecitinib, a second-generation JAK3 inhibitor, is a novel therapeutic agent for alopecia areata and other autoimmune conditions. Methods: A new stability-indicating UHPLC-DAD-MS/MS method was developed, validated, and applied for a forced degradation study of ritlecitinib under ICH guidelines. Results: The method demonstrated high specificity, sensitivity (LOD: 0.04 µg/mL; LOQ: 0.14 µg/mL), precision (RSD ≤ 0.15%), and accuracy (99.9–100.3%). Forced degradation studies under acidic, basic, oxidative, thermal, and photolytic conditions revealed four novel degradation products. Basic degradation followed second-order kinetics, while oxidative degradation followed zero-order kinetics. Conclusions: The validated method reliably characterized ritlecitinib's stability and degradation products, providing essential data for optimizing formulation, determining proper storage conditions, anticipating drug–excipient interactions, and ensuring quality control. The eco-friendliness and applicability of the developed forced degradation procedure were evaluated using various green and blue metric tools. Incorporating green analytical principles underscores its potential for sustainable pharmaceutical analysis.

**Keywords:** ritlecitinib; JAK3 inhibitor; stability-indicating method; forced degradation study; green analytical chemistry; degradation kinetics; HPLC; mass spectrometry



Academic Editor: Ziyaur Rahman

Received: 6 December 2024

Revised: 2 January 2025

Accepted: 14 January 2025

Published: 17 January 2025

**Citation:** Kovačić, J.; Amidžić Klarić, D.; Turk, N.; Krznarić, Ž.; Riordan, E.; Mornar, A. The Stability-Indicating Ultra High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Tandem Mass Spectrometry Method Applied for the Forced Degradation Study of Ritlecitinib: An Appraisal of Green and Blue Metrics. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 124. <https://doi.org/10.3390/ph18010124>

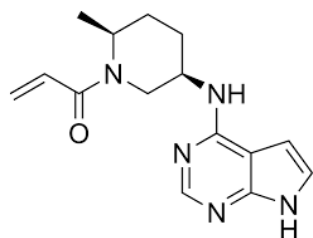
**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Janus kinases (JAKs) are intracellular, multidomain non-receptor tyrosine kinases that play pivotal roles in the transduction of cytokine-mediated signals. The JAK family consists of four members (JAK1, JAK2, JAK3, and tyrosine kinase—TYK2) that relay signals downstream of type I and type II cytokine receptors through signal transducers and activators of transcription (STATs). The JAK-STAT signaling pathway, as an evolutionarily conserved pathway, is crucial in innate immunity, adaptive immunity, hematopoiesis, and disorders that frequently appear in cancer, autoimmune, and inflammatory disorders [1].

Based on this, the targeting of JAK-associated pathways to prevent its phosphorylation using JAK inhibitors has rapidly entered the clinical arena for treating a wide array of inflammatory, autoimmune, and myeloproliferative diseases, improving many classic therapeutic algorithms. As of now, 13 JAK inhibitors, typically administered once or twice daily in oral (tablet, capsule, and solution) and topical (cream) formulations, have been approved by relevant regulatory authorities [2]. Despite their increasing popularity, significant discussions regarding their safety profiles have arisen. First-generation JAK inhibitors, which act in an orthosteric manner by occupying the phosphotransferase pocket of JAKs, inhibit multiple JAKs and interfere with the biological activity of many factors. The side effects of first-generation JAK inhibitors can be partially attributed to their lack of selectivity, prompting recent research to focus on developing second-generation highly selective JAK inhibitors aimed at increasing therapy precision and reducing off-target activity [3,4].

Ritlecitinib (1-[(2S,5R)-2-methyl-5-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-ylamino)piperidin-1-yl]prop-2-en-1-one; WHO ACT code L04A-F08; CAS No: 1792180-81-4; PF-06651600) is an irreversible inhibitor of JAK3 and TYK2 that Pfizer is developing under the trade name LITFULO™ for treatment of alopecia areata (Figure 1).



**Figure 1.** Structure of the irreversible Janus kinase 3 and tyrosine kinase inhibitor, ritlecitinib.

This new therapeutic solution for severe alopecia areata was first approved in the USA on 23 June 2023, followed by Japan on 26 June 2023. It received a marketing authorization valid throughout the European Union, including Iceland, Liechtenstein, and Norway on 15 September 2023. Thereafter, the UK Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency authorized LITFULO™ on 1 November 2023. It became the first approved treatment for severe alopecia areata in Canada on 13 February 2024 [5].

Moreover, ritlecitinib, as a highly selective and orally bioavailable JAK3 inhibitor, represents a potential immunomodulatory therapy. Due to its favorable efficiency, safety, tolerability, and bioavailability, it has been under clinical studies for the treatment of other conditions. Randomized, double-blind, multicenter, phase 3 trials (ClinicalTrials.gov identifier: NCT05583526—TRANQUILO, and ClinicalTrials.gov identifier: NCT06072183—TRANQUILO 2) are currently recruiting patients to investigate the efficacy and safety of ritlecitinib in patients with vitiligo. JAK inhibitors are opening up new horizons for small molecule drugs in inflammatory bowel disease treatment strategies. Thus, the efficiency of ritlecitinib in treating moderate to severe active ulcerative colitis was reported in the VIBRATO phase 2b study (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02958865). Furthermore, ritlecitinib met the primary endpoint during the induction period, demonstrating significant clinical improvements versus placebo in patients with active Crohn's disease (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02958865—PIZZICATO).

From the stages of drug research and development to marketing and post-marketing, analytical techniques play a vital role in the pharmaceutical industry in ensuring quality control, regulatory compliance, process optimization, troubleshooting, and batch release. As drug development progresses, analytical methods are refined and expanded, based on enhanced knowledge of the active pharmaceutical ingredient and drug product, as well as the requirements specific to each development and clinical application stage. Finally,

analytical methods are included in the compendial monographs of relevant pharmacopeias to characterize the quality of bulk drug materials and pharmaceutical products. The main objective of a stability-indicating method is to monitor results during stability studies to guarantee safety, efficacy, and quality. These methods help to ensure that the final product meets the required specifications, complies with regulatory requirements, and provides safe and effective patient treatment [6–9].

The literature on liquid chromatographic techniques for the determination of ritlecitinib in pharmaceutical and biomedical samples is limited. There are only two studies about the determination of ritlecitinib concentration levels in rat and human biofluids [10,11]. To the best of our knowledge, forced degradation studies and development of stability-indicating analytical methods were not reported on ritlecitinib. Hence, to predict the stability of ritlecitinib, there is a tremendous need to carry out a comprehensive study of the forced degradation of the drug substance under the various forced degradation conditions conducted by the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines.

Herein, we report (i) a validated stability-indicating method using ultrahigh-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector and tandem mass spectrometer (UHPLC-DAD-MS/MS), which successfully separated four degradation products; (ii) a comprehensive forced degradation study of ritlecitinib under hydrolytic, oxidative, thermal, and photolytic conditions as prescribed by ICH guidelines; (iii) an identification of degradation products; (iv) a discussion on degradation kinetics of ritlecitinib; and (v) an evaluation of the ecological character of the proposed analytical procedure.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Method Development and Optimization

During the method development, different chromatographic conditions were tested, considering the chemical structure and physicochemical properties of ritlecitinib. It is a pyrrolopyrimidine that contains three rings, three rotatable bonds, and six heteroatoms (one oxygen and five nitrogen atoms). Four of these are hydrogen acceptors, while two are hydrogen donors. Ritlecitinib is a white to off-white solid that is insoluble in water. Based on data calculated by the ALOGPS v2.1 program, its water solubility is 0.46 mg/mL. It is moderately lipophilic, with predicted log *P* data in the range of 1.27 (ACD/Labs v9.0 program) to 1.95 (Mcule v1.0 program). Ritlecitinib is a multiprotic compound with dissociation constant ( $pK_a$ ) values ranging from 6.6 (strongest basic) to 13.6 (strongest acidic).

This part of the study aimed to develop a chromatographic method that would allow for fast separation of ritlecitinib and its degradation products, as well as the quantitation of ritlecitinib in stressed samples. As a result, Core-Shell technology was employed as the stationary phase to achieve higher chromatographic efficiencies at substantially lower system backpressures. Furthermore, chromatographic columns packed with smaller particle size (sub-3  $\mu\text{m}$ ) were chosen to explore the benefits offered by these columns. Finally, the C18 column showed higher hydrophobic retention suitable for ritlecitinib and its non-polar degradation products in comparison to the C8 column. The reversed-phase C18 columns were also used by Bauman and co-workers [10] for ritlecitinib metabolite profiling, as well as by Salva and Galla [11] for the determination of ritlecitinib in rat plasma samples.

After the selection of the stationary phase, the mobile phase composition was optimized to achieve the required retention and selectivity of the chromatographic procedure. The mobile phase modifiers led to different eluent viscosity and UV cut-offs, and these factors were considered during the design of eluent systems as well. Since the volatility and the solvent's ability to donate a proton are important in the electrospray ionization (ESI) technique, they were also scrutinized when designing eluent systems. Experimental trials

revealed that using acetonitrile, compared to methanol and ethanol, resulted in improved peak shapes for ritlecitinib and its degradation products. Different mobile phase modifiers covering acidic to neutral pH were screened. Using lower pH values, solvents offered better separation and enhanced peak resolution. We observed that the detection sensitivity of ritlecitinib and its degradation products was improved using formic acid ( $pK_a$  3.75) as an additive of the mobile phase for UHPLC-DAD-MS/MS analysis. Overall, these findings follow analytical methods reported by Bauman and co-workers [10] as well as Salva and Galla [11].

By analyzing the stressed samples, it became evident that fewer polar degradation products had suitable retention factor values with a lower percentage of aqueous mobile phase, while polar degradation products had appropriate retention factor values with a lower percentage of organic mobile phase. Therefore, the use of a gradient system for increasing eluting power was necessary.

Ritlecitinib showed good absorption between 200 and 300 nm; however, the wavelength of 280 nm was selected for analysis to achieve superior sensitivity and peak shape.

By applying optimized chromatographic conditions, parameters defining the system's suitability were determined. The system suitability parameters for the proposed method were established at the target concentration of ritlecitinib (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The proposed analytical method meets ICH and USP standards for system appropriateness. The observed retention time of ritlecitinib was 3.77 min with a method total run time of 13 min, making the method both time- and cost-effective. According to Table 1, the relative standard deviation (RSD) values did not surpass the recommended value of 2%. Compliance with these factors is crucial in verifying the system's appropriateness for its intended purpose.

**Table 1.** Summarized system suitability data of the newly developed stability-indicating method (ritlecitinib concentration level 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $n = 6$ ).

Parameter	Symbol	Value	RSD <sup>1</sup> (%)	Reference Values
Retention time (min)	$t_R$	3.77	0.02	RSD < 2.0%
Peak area (mAU·s)	$A$	68.90	0.97	RSD < 2.0%
Peak purity	$P_p$	999.8	0.20	>999.0
Peak capacity	$P_c$	258	4.01	N/A <sup>2</sup>
Symmetry	$A_s$	1.00	0.78	0.8–1.2

<sup>1</sup> RSD—Relative Standard Deviation; <sup>2</sup> N/A—Not Applicable.

## 2.2. Method Validation

Using guidelines (Validation of analytical procedures, ICH Q2(R2)), various parameters for the developed stability-indicating method were validated, including linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), precision, accuracy, and standard solution stability [12].

The ritlecitinib solutions, ranging from 2 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , were utilized to create the linearity curve. Table 2 contains the results of the linear regression study. With a correlation coefficient ( $r$ ) value of 0.999, the results demonstrate a significant correlation between observed responses and ritlecitinib concentrations. In addition, the accuracy of the back-calculated concentrations of each calibration standard was evaluated, revealing relative errors within  $\pm 2.24\%$  of the theoretical concentration at all investigated levels. Furthermore, residual analysis was conducted to assess the assumptions of linearity and homoscedasticity (Figure S1). The visual evaluation of the pattern of the residual versus fits plot showed that the residuals appeared to be randomly dispersed around the zero, with no recognizable patterns in the points, revealing that the proposed linear model approximates the data points well without favoring certain inputs.

**Table 2.** Summarized stability-indicating method validation data.

Validation Parameter	Value	Reference Values
Linearity		
Range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	2–100	N/A <sup>8</sup>
Slope	18.31	N/A
Intercept	−6.59	N/A
SE <sup>1</sup> of the slope	0.020	N/A
SE of the intercept	0.939	N/A
Correlation coefficient ( <i>r</i> )	0.999	0.990
Regression SS <sup>2</sup>	3,439,121	N/A
Residual SS	30.06	N/A
Total SS	3,439,151	N/A
Sensitivity <sup>3</sup>		
LOD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.04	N/A
LOQ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.14	N/A
Precision <sup>4</sup>		
Repeatability ( <i>n</i> = 6; RSD <sup>5</sup> , %)	0.12	RSD < 2.0
Intermediate precision ( <i>n</i> = 18; RSD, %)	0.15	RSD < 2.0
Accuracy <sup>6</sup>		
Low ( <i>n</i> = 3; mean recovery, %/RSD, %)	100.3/0.3	95–105/RSD < 2.0
Medium ( <i>n</i> = 3; mean recovery, %/RSD, %)	99.9/0.7	95–105/RSD < 2.0
High ( <i>n</i> = 3; mean recovery, %/RSD, %)	100.3/0.7	95–105/RSD < 2.0
Stability <sup>7</sup>		
Benchtop stability (recovery, %)	99.7	95–105
Short-term stability (recovery, %)	99.5	95–105
Long-term stability (recovery, %)	99.2	95–105

<sup>1</sup> SE—Standard Error; <sup>2</sup> SS—Sum of Squares; <sup>3</sup> The limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ) were determined using signal-to-noise value 3 and 10, respectively; <sup>4</sup> The repeatability was assessed by analyzing standard solution (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) within the same day in six replicates, while the intermediate precision was assessed by analyzing standard solution on three consecutive days in six replicates; <sup>5</sup> RSD—Relative Standard Deviation; <sup>6</sup> The accuracy was performed by analyzing three concentration levels of standard solutions (low-level 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , medium-level 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and high-level 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in triplicate; <sup>7</sup> The standard solution (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was stored at room temperature for a period of 8 h and analyzed thereafter to determine the benchtop stability of ritlecitinib. The short-term stability was carried out by storing the standard solution of ritlecitinib (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at 4 °C for 72 h. For the long-term stability, the standard solution of ritlecitinib (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was stored at −20 °C for 7 days; <sup>8</sup> N/A—Not Applicable.

The LOD and LOQ values were determined experimentally, the method based on signal-to-noise (S/N) ratio was applied. The LOD (S/N = 3) and LOQ (S/N = 10) values were found to be 0.04 and 0.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , indicating the sensitivity of the method (Table 2).

Method precision was determined by repeatability (intraday), where the analysis of samples at the same concentrations was evaluated on the same day at different time intervals, and by intermediate precision (interday), where the samples were evaluated by comparing the assays on three separate days. Each day six sample solutions (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were prepared and analyzed; the assay value was expressed in terms of RSD values and the box-and-whisker plot (Table 2, Figure S2). Low values of RSDs, ranging from 0.12 to 0.15%, demonstrate acceptable method precision.

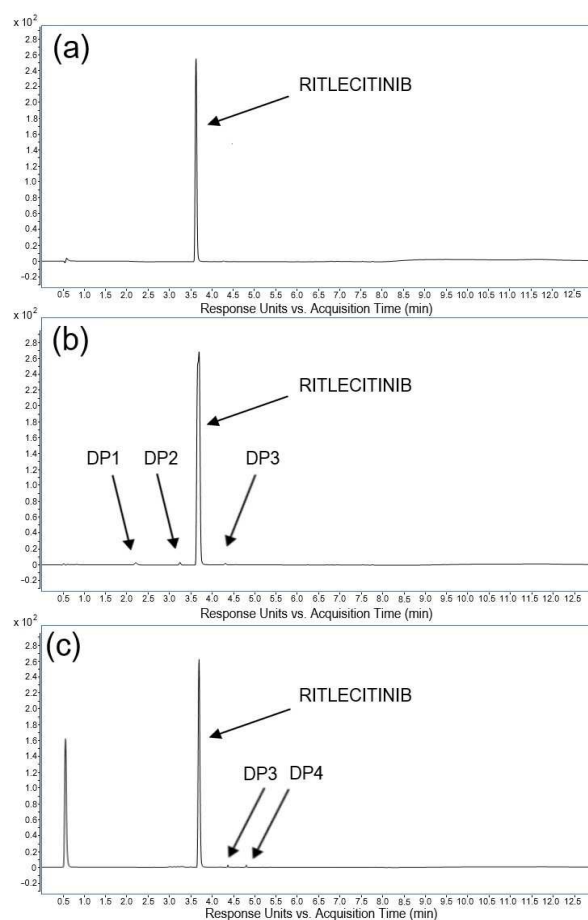
Method accuracy was calculated using the regression equation based on percentage recoveries at three concentration levels (low-level 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , medium-level 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and high-level 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) crossing the linearity curve. All solutions prepared and analyzed in triplicate were experimentally recovered (99.9–100.3%) with low values of RSD (lower than 0.7%) during analysis (Table 2).

The experimental results demonstrate the high stability of the standard solution. Despite being stored for 8 h at room temperature, for 3 days in a laboratory refrigerator (4 °C), and for 7 days in a laboratory freezer (−20 °C), the stability testing solutions showed excellent agreement with the freshly prepared samples. All stability tests showed no

significant difference in ritlecitinib concentrations, with recoveries ranging from 99.2 to 99.7% (Table 2).

### 2.3. Forced Degradation Study

Intentional degradation was attempted at stress conditions of acidic (using 0.01–1 M HCl), basic (using 0.01–1 M NaOH), oxidative (using 3–33% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), photolytic (daylight degradation), and thermal degradation (heated at 40 and 70 °C) to evaluate the ability of the proposed analytical method to separate ritlecitinib and its degradation products [13,14]. A critical aspect of designing well-structured forced degradation experiments was defining the severity and exposure time for each condition, along with providing meaningful endpoints. The two endpoints, the degradation of the drug molecule up to 10–20% or an exposure time of no more than 10 days, were selected to ensure thorough coverage of pharmaceutically-relevant degradation. The analysis of all stress samples revealed that the retention times for ritlecitinib remained unaltered compared to the control solution ( $t_{R(\text{average})} = 3.74$  min; RSD = 1.1%). The peak purity of ritlecitinib in all stress samples was above 999.1, with the resolution between the peaks of ritlecitinib and degradation products higher than 6.5. Thus, the concentration of ritlecitinib in stress samples was reliably quantified, and the degradation products were separated, indicating the high specificity of the proposed method as well as its stability-indicating power. The chromatograms depicting the degradation behavior of the ritlecitinib drug substance under different stress conditions are shown in Figure 2.



**Figure 2.** Representative LC chromatograms of ritlecitinib samples (100 µg/mL): (a) control, (b) basic, and (c) oxidative degradation.

The results for the acidic, basic, oxidative, thermal, and photolytic degradation of ritlecitinib are presented in Table 3. Four novel degradation products, which have not been previously reported, were identified under the applied stress conditions. As per the elution pattern, the degradation products were denoted as DP1 to DP4 (Table 4).

**Table 3.** Summarized forced degradation study data.

Stress Type	Stress Condition	Exposed Conditions	Duration	Degradation of Ritlecitinib (%)	Ritlecitinib Retention Time ( $t_R$ , min, Average $\pm$ RSD <sup>1</sup> , $n = 6$ )	Ritlecitinib Peak Symmetry Index (Average $\pm$ RSD, $n = 6$ )	Remarks
Acidic hydrolysis	1 M HCl	70 °C	10 days	-	3.74 $\pm$ 0.02	0.911 $\pm$ 0.78	No degradation was observed
Basic hydrolysis	1 M NaOH	RT <sup>2</sup>	72 h	12.6	3.79 $\pm$ 0.02	0.935 $\pm$ 0.45	Three degradation peaks observed: DP1, DP2, and DP3
Oxidation	33% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	RT	48 h	9.5	3.76 $\pm$ 0.02	0.966 $\pm$ 0.07	Two degradation peaks observed: DP3 and DP4
Thermal	Elevated temperature	70 °C	10 days	-	3.73 $\pm$ 0.23	0.911 $\pm$ 0.70	No degradation was observed
Photodegradation	Daylight	RT	10 days	-	3.76 $\pm$ 0.77	0.918 $\pm$ 0.61	No degradation was observed

<sup>1</sup> RSD—Relative Standard Deviation; <sup>2</sup> RT—Room Temperature.

**Table 4.** UHPLC-ESI-QQQ data of ritlecitinib and its degradation products.

Compound/Degradation Product	Stress Conditions	Retention Time ( $t_R$ , min)	Relative Retention Time (RRT)	Retention Factor	Base/Main Peak ( $m/z$ )	List of Peaks ( $m/z$ )
Ritlecitinib	-	3.77	-	5.18	286	286, 215, 185, 173, 159, 152, 135, 119, 108
Degradation product 1 (DP1)	Basic hydrolysis	2.24	0.59	2.67	331	331, 274, 232, 224, 183, 140, 119
Degradation product 2 (DP2)	Basic hydrolysis	3.28	0.87	4.38	304	333, 304, 205, 183, 137, 119
Degradation product 3 (DP3)	Basic hydrolysis/Oxidative	4.37	1.16	6.16	571	571, 286, 159, 152, 119
Degradation product 4 (DP4)	Oxidative	4.79	1.27	6.85	302	302, 286, 225, 152, 119

Over 72 h, ritlecitinib significantly degraded through basic hydrolysis at room temperature. This stress condition resulted in a degradation of 12.6% of ritlecitinib with the appearance of three degradation peaks. Relative retention times (RRTs) of DP1 and DP2 were lower than 1.0, indicating lower hydrophobicity of these degradation products, while the RRT value of DP3 was higher than 1.0, indicating its higher hydrophobicity compared to ritlecitinib.

The degradation of ritlecitinib under oxidative stress, using 33% hydrogen peroxide solution, occurred rapidly, achieving a degradation of 9.5% of ritlecitinib within 48 h. The chromatogram obtained from analyzing oxidative stress illustrates a distinct separation between ritlecitinib and two more hydrophobic degradation products, namely DP3 and DP4.

The acidic degradation study was carried out in 1 M HCl for 10 days under reflux conditions, at room temperature and 70 °C. It was revealed that ritlecitinib is stable to acidic hydrolysis, with a loss of ritlecitinib of less than 1%. For thermal degradation, the ritlecitinib standard solution was kept at 40 and 70 °C for 10 days, but no appreciable degradation occurred under these conditions (less than 1%). The photolytic degradation of ritlecitinib resulted in a loss of analyte of 1% without the formation of a degradant peak.

Our results underscored ritlecitinib's vulnerability to basic and oxidizing conditions. It was noticed that it was not sensitive to acidic conditions, temperature, and light. These data

provide invaluable insights into the stability profile of ritlecitinib, guiding the optimization of synthesis conditions, formulation development, package development of pharmaceutical products, and the development of storage protocols. Moreover, by addressing the stability-related challenges early in the development process, the production of high-quality ritlecitinib formulations with innovative excipients can be ensured.

After testing for accelerated degradation, a kinetic study of basic and oxidative degradation of ritlecitinib was performed. For this purpose, samples were collected at predefined time intervals (at least ten data points were collected before reaching 50% drug degradation). Various kinetic models were used and compared to examine the rate of the basic and oxidative degradation processes. The reaction order was determined by plotting the drug concentration (zero-order), the logarithm of drug concentration (first-order), and the reciprocal of drug concentration (second-order) versus time (all equations are given in Table S1). The regression equations were computed, the correlation coefficients were calculated, and the reaction order was identified based on the best-fitting model.

Based on the correlation coefficients obtained for zero-order ( $r = 0.983$ ), first-order ( $r = 0.989$ ), and second-order model fits ( $r = 0.994$ ) in the basic degradation kinetic study, it was concluded that the basic degradation of ritlecitinib follows second-order kinetics. Accordingly, basic degradation of ritlecitinib mainly depends on the concentration of the drug substance and stressor.

The correlation coefficient for the zero-order kinetics model in the oxidative degradation kinetic study was 0.999. It was higher than the coefficients derived from first-order ( $r = 0.997$ ) and second-order model fits ( $r = 0.993$ ). This suggests that the oxidative degradation process followed the zero-order kinetics model, indicating that the oxidative degradation of ritlecitinib does not depend on the concentration of the drug and stressor. It is by now generally accepted that zero-order reactions primarily include rearrangement or radical-mediated cleavage of chemical bonds under oxidative stress conditions [15].

Rate constant, half-life ( $t_{50}$ ), and shelf-life ( $t_{90}$ ) are the primary parameters measured in degradation kinetics, presented in Table 5. Both  $t_{50}$  and  $t_{90}$  values were found to be lower for oxidative degradation than basic hydrolysis.

**Table 5.** Degradation kinetics data for basic hydrolysis and oxidative degradation.

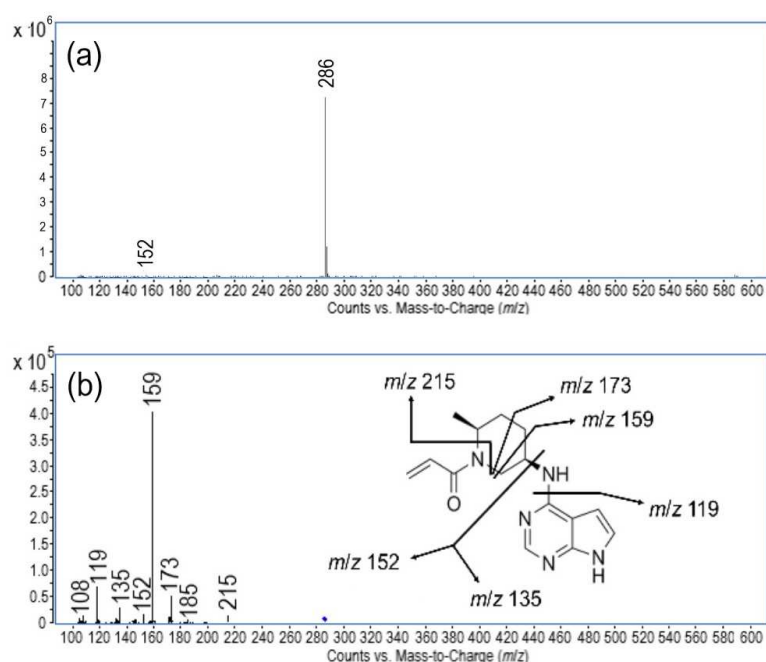
Degradation Condition	Duration of Kinetic Study (Days)	Order of Kinetic Degradation	Reaction Rate Constant ( $k$ , $\mu\text{g mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	Half-Life ( $t_{50}$ , h)	Shelf-Life ( $t_{90}$ , h)
Basic hydrolysis, 1 M NaOH, RT <sup>1</sup>	30	Second-order kinetics	0.000016	662.5	66.3
Oxidative degradation, 33% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , RT	12	Zero-order kinetics	0.181	266.8	53.4

<sup>1</sup> RT—Room Temperature.

#### 2.4. Mass Spectrometry of Ritlecitinib and Its Degradation Products

The mass spectrometric experiments were conducted for the mass identification of newly generated degradation products (DP1–DP4). Monitoring was carried out following a detailed analysis of the mass spectrum of ritlecitinib and its fragmentation products, enabling the identification of the characteristic fragmentation processes involved (Figure 3). Under positive ESI-MS conditions, the prominent molecular peak  $[M + H]^+$  at  $m/z$  286 was observed, confirming that the molecular formula for ritlecitinib is C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O. Thereafter, MS/MS experiments were conducted to acquire a thorough understanding of its fragmentation behavior, facilitating the establishment of a defined fragmentation pattern for ritlecitinib and its degradation products. The fragmentation pattern observed for ritlecitinib is shown in Figure 3. A total of six fragments were distinguished. The first fragment, having

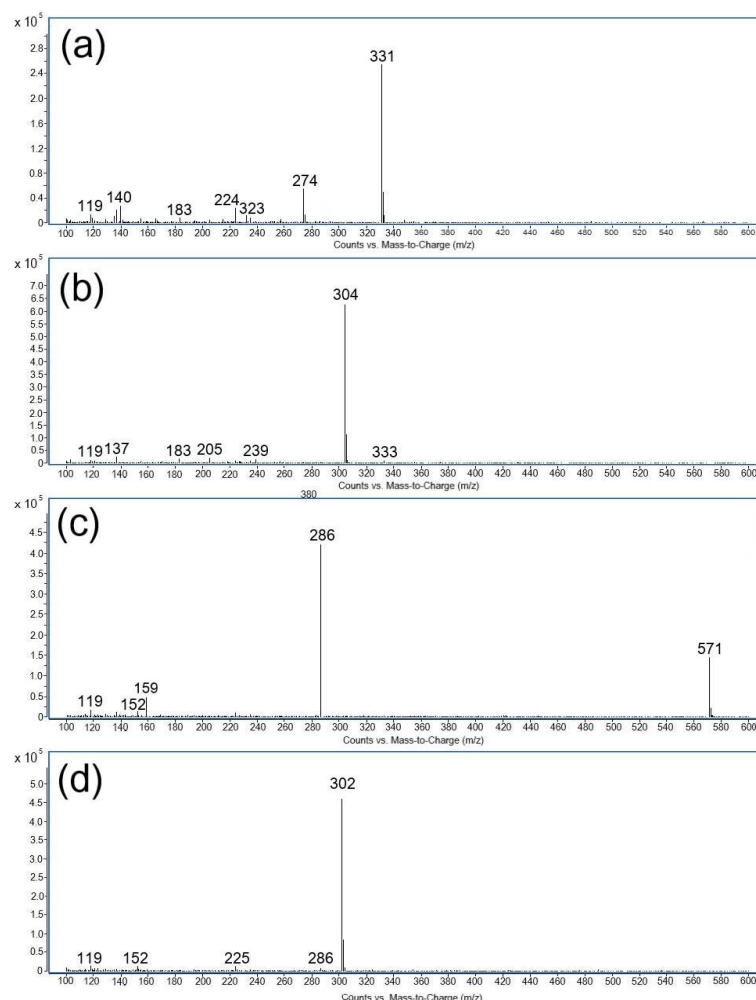
$m/z$  215, was obtained due to the neutral loss of the prop-2-enamide. Further cleavage of the piperidine ring resulted in the formation of the fragment at  $m/z$  173. The loss of the methyl group gave rise to the prominent fragment having  $m/z$  159. The next fragments, with  $m/z$  152 and 135, were observed due to cleavage around the central nitrogen. The fragment ion at  $m/z$  119 was generated due to the removal of the amino group from the fragment at  $m/z$  135, forming 7H-pyrrolo [2,3-d]pyrimidine. To our knowledge, only one report on the pharmacokinetics, metabolism, and clearance mechanism of ritlecitinib, including its mass spectrometric data, is available in the literature [10]. Our proposed fragmentation pattern of ritlecitinib bears a close resemblance to the previously published one. However, due to the careful optimization of the mass spectrometry parameters, our procedure revealed three new fragments.



**Figure 3.** Mass spectra data of ritlecitinib. (a) Full scan ESI-MS spectrum, showing the protonated molecular ion  $[M+H]^+$  at  $m/z$  286. (b) Product ion ESI-MS/MS spectrum of the protonated molecular ion  $[M+H]^+$  ( $m/z$  286), collision energy of 20 V (insert: proposed fragmentation pattern).

The formation of degradation products was evaluated based on the mass fragmentation pattern of ritlecitinib as well as its degradation products, identifying the underlying chemical transformations. Furthermore, this was complemented by the EPFL Mass Spectrometry online tool, chemical knowledge, and the conditions of impurity formation. The mass spectra of all four degradation products (DP1-DP4) are shown in Figure 4. The retention times, relative retention times (RRTs), main peaks, along with major fragments of all the degradation products, are summarized in Table 4.

DP1 (base peak at  $m/z$  331) and DP2 (base peak at  $m/z$  304), derived from the basic hydrolysis of ritlecitinib, showed RRT values lower than 1. Both degradation products generated a simple MS spectrum with the formation of one base peak and several minor fragment ions. In the case of DP2, the experimental  $m/z$  value of the base peak was 304, which is 18 Da higher than the molecular ion of ritlecitinib  $[M + H]^+$ . It is presumed that this polar product is generated under basic conditions due to the 1,4 addition of a hydroxyl group across the alkene bond of the  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl present in the acrylamide moiety of ritlecitinib.



**Figure 4.** Positive single scan ESI-MS spectra of degradation products: (a) Degradation Product 1—DP1 (basic hydrolysis), (b) Degradation Product 2—DP2 (basic hydrolysis), (c) Degradation Product 3—DP3 (basic hydrolysis/oxidative stress), and (d) Degradation Product 4—DP4 (oxidative stress).

DP3 is produced under both stress conditions, basic hydrolysis and oxidative stress. The most important peak of DP3 was found to be at  $m/z$  571, as shown in Figure 4 and Table 4. Due to its apolar nature, it elutes after ritlecitinib with an RRT of 1.16. Three ions were also observed for DP3, having  $m/z$  286, 159, 152, and 119. Ritlecitinib's structure contains an acrylamide moiety, which is prone to the formation of dimers featuring either C-C or C-N linked chains, with the latter arising from Michael addition. Based on the aforementioned data on the MS spectrum of DP3 and its apolar nature, a possible structure of DP3 could be proposed as the ritlecitinib dimer. Recent work of Chum and co-workers [16] highlighted the importance of determining ritlecitinib dimers, as this impurity may affect the crystallization of the drug.

The second apolar degradation product of oxidative stress (DP4) was observed at the highest retention time (RRT = 1.27). In the MS spectrum, the base peak of DP4 was found to be at  $m/z$  302 in positive mode, indicating a molecular weight of 301 Da, which is 16 Da higher than the molecular weight of ritlecitinib. As described in the literature, hydrogen peroxide can react with tertiary amines, which are susceptible to electron transfer oxidation, producing N-oxides [17]. The difference of 16 Da corresponds to oxygen and may be related to the formation of an N-oxide in the piperidine ring of ritlecitinib. Other peaks obtained in the MS spectrum of DP4 showed three characteristic peaks at  $m/z$  286, 152, and 119. The formation of the peak at  $m/z$  286 could be attributed to the loss of an oxygen atom  $[M + H - O]^+$ . This fragmentation

pattern has already been described for N-oxides [18]. Two other peaks at  $m/z$  152 and 119 were also observed in the MS spectrum of ritlecitinib.

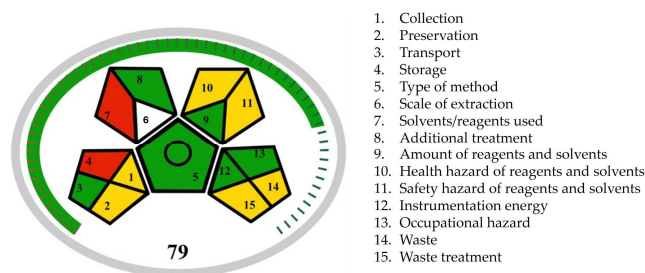
### 2.5. Assessment of Sustainability of Forced Degradation Procedure

We used seven green metric tools to evaluate the green performance of the developed forced degradation procedure and its subsequent impact on the environment.

The Analytical Method Greenness Score (AMGS) tool was used in the greenness assessment because it is a composite of several metrics, including the operator's safety and procedure's environmental impact [19]. The assigned greenness score of the forced degradation procedure of ritlecitinib, using the developed UHPLC/DAD/MS/MS method, was 711.85. Based on the calculated data, the highest contribution to the greenness score came from instrument energy (436.25, or 61.3% of overall score), followed by solvent influence (182.05, or 25.6% of overall score) and environment, health, and safety (99.55, or 13.1% of overall score). The scoring also includes a color-coding system that indicates the contribution of each category to the overall score. A green color highlights the green parameters of the method, while yellow and red colors indicate areas where the method can be improved. For the ritlecitinib forced degradation study, the category of instrument energy contributed over 50% of the overall AMGS score and is thus indicated in red. According to the AMGS score, the weakest point of our method is the energy consumption by the LC/MS technique; therefore, we attempted to reduce the instrument energy by shortening the method run time as much as possible.

The Analytical Eco-Scale [20] assigns a score out of 100, and our procedure accrued a total of 16 penalty points. Eleven penalty points were assigned due to the reagents used for the promotion of ritlecitinib degradation, two penalty points due to energy consumption of the LC/MS technique, and three points due to waste generation. Nonetheless, a score of 84 demonstrates the procedure's strong ecological sustainability and environmental friendliness.

Plotka-Wasyłka and co-workers [21,22] developed complementary metric tools Green Analytical Procedure Index (GAPI), along with its recent versions Modified Green Analytical Procedure Index (MoGAPI), and Complementary Green Analytical Procedure Index (ComplexGAPI). MoGAPI evaluated the environmental hazards of our procedure using a central pentagon surrounded by four additional pentagons mirroring each of its sides, excluding the bottom. Each pentagon assessed specific aspects of the methodology using three colors (green, yellow, and red), where green represents the most eco-friendly method aspects and red indicates non-ecofriendly method aspects (Figure 5). According to the MoGAPI pictogram, the ritlecitinib forced degradation study showed six green, six yellow, and two red areas. The yellow areas (fields 10, 11, 14, and 15) are related to the usage of organic solvents and formic acid as mobile phase modifiers, leading to chemical waste generation. The red areas (fields 4 and 7) are attributed to the preparation of forced degraded samples, particularly the use of stressors and high temperatures. We need to be aware that method development and validation, as well as the evaluation of degradation kinetics for ritlecitinib, included numerous sample analyses that needed to be performed. Furthermore, the use of stress conditions in forced degradation studies is inevitable. Therefore, during the method development, we prioritized the minimization of sample size and method run time and, alongside that, the minimization of waste production. The MoGAPI tool also offered an overall assessment of the method's greenness by calculating a total score. The total score of 79 for the ritlecitinib forced degradation study appeared on the chart, and the green color of the scale around the pentagons indicated a high overall greenness score.



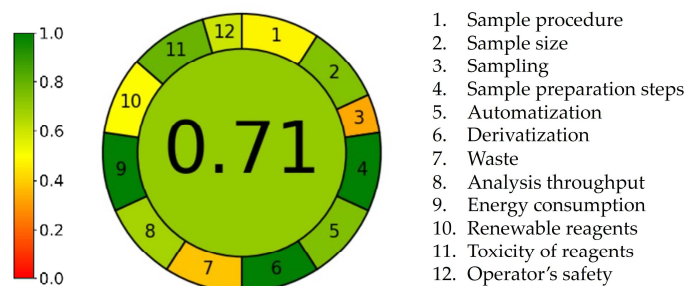
**Figure 5.** The MoGAPI score of ritlecitinib forced degradation protocol.

ComplexGAPI expands the pictogram by adding a hexagonal field at the bottom to represent the environmental impact of pre-analysis processes [22]. The ComplexGAPI pictogram indicated six green areas, two yellow areas, and one red area of the hexagonal grid (Figure 6). Again, the red area (field II) is attributed to the use of a high temperature for the thermal stress study, while the two yellow areas (fields IV<sub>a</sub> and IV<sub>b</sub>) are attributed to the use of acids, bases, and oxidants for the induction of chemical stress, although low amounts of these reagents were used.



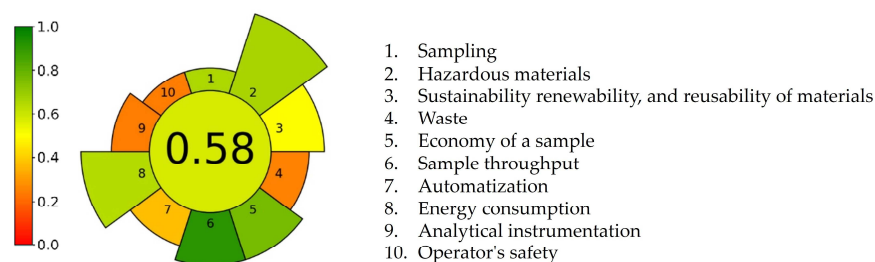
**Figure 6.** The ComplexGAPI score of ritlecitinib forced degradation protocol.

The Analytical GREENess Metric Approach and Software (AGREE) v1.0 tool is based on twelve consecutive assessment steps that correspond to the ten principles of green analytical chemistry [23]. The result is presented as a round green pictogram with a circle in the center that shows an overall score of 0.71, indicating that the developed method complies with the principles of green analytical chemistry, despite several limitations (Figure 7). The segments display scores in the range of 0.33–1.00. A score of 1, indicating high greenness and depicted by the deepest shade of green, is assigned for three criteria (criteria 4, 6, and 9). Scores in the range of 0.60–0.80, with the color transitions gradually from dark green to light green, are assigned for five criteria (criteria 2 and 5 — score 0.75; criterion 8 — score 0.68; criterion 11 — score 0.80; and criterion 12 — score 0.60). As previously mentioned, one of the most critical points of our procedure is related to the usage of hazardous chemicals, making criteria 1 and 10 highlighted in yellow with scores of 0.48 and 0.50, respectively. Each sample analysis generates approximately 10 mL of waste, placing criterion 7 at the bottom of the scale (score 0.39, highlighted in orange). The main limitation regarding greenness is associated with the sampling procedure. Since in situ sampling cannot be applied in a forced degradation study, criterion 3 is scored with 0.33 and highlighted in orange. Despite these constraints, the overall methodology was considered environmentally friendly, as indicated by the high overall score, eight out of twelve green areas, and the absence of red areas in the AGREE pictogram.



**Figure 7.** The AGREE score of ritlecitinib forced degradation protocol.

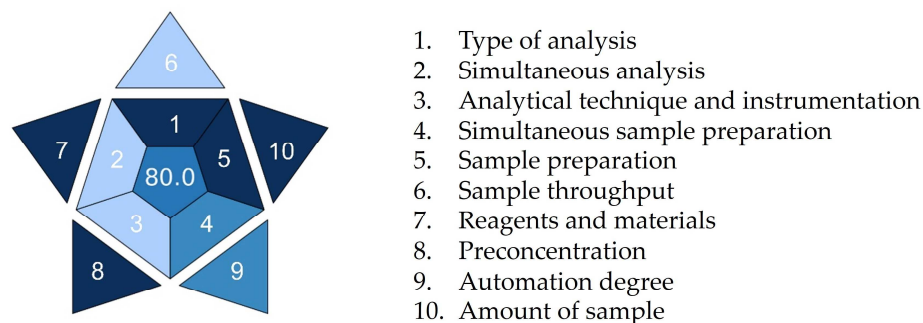
Sample preparation in the forced degradation study has been identified as one of the most critical steps from the perspective of green analytical chemistry [8,9], primarily due to the typical requirements for reagents and energy consumption. Thus, we used the Analytical GREENess Metric for Sample Preparation (AGREEprep) tool, which emphasizes sample preparation. It predicted, as well as identified, aspects of the developed forced degradation study that could be improved for greening the critical step of sample preparation. The key strength of the AGREEprep tool lies in its comprehensive coverage of all ten green sample preparation principles, offering a detailed evaluation of each aspect through a diverse range of colors [24]. Figure 8 depicts a round AGREEprep pictogram with a circle in the middle that shows an overall score of 0.58, colored in light green. Ten trapezoid bars correspond to the ten criteria. Five out of ten criteria are marked with various shades of green, with scores between 0.64 and 0.92. These green points were obtained due to high sample preparation throughput, low sample size, and moderate consumption of hazardous reagents. The third principle of green sample preparation promotes the use of reusable, renewable, and sustainable resources. Since we utilized recycled materials and reusable laboratory glassware whenever possible, the corresponding bar is highlighted in yellow with a score of 0.5. Four bars, representing the waste generation (criterion 4, score 0.26), automatization of procedure (criterion 7, score 0.38), analytical technique used for sample analysis (criterion 9, score 0.25), and operator safety (criterion 10, score 0.25), are shown in orange, denoting the weakest points of the developed procedure.



**Figure 8.** The AGREEprep score of ritlecitinib forced degradation protocol.

In recent years, the idea of white analytical chemistry has also been promoted as an extension and complement to green analytical chemistry. It combines the ecological, analytical, and practical perspectives of an analytical method [25]. To obtain a more comprehensive approach to the sustainability of the proposed procedure, the Blue Applicability Grade Index (BAGI) approach was applied [26]. Figure 9 shows an asteroid pictogram demonstrating the practicability of our procedure. A BAGI score of 80 was assigned to the procedure, demonstrating its superiority in terms of practicality and applicability. The shades of blue assigned to the individual pictogram fields indicate the weak and strong points of the analytical procedure. The biggest advantages of the proposed procedure are undemanding sample preparation, low sample quantity, and usage of commonly com-

mercially available reagents (criteria 1, 5, 7, 8, and 10 highlighted in dark blue for high compliance). Semi-automated devices were used for sample preparation, making criteria 4 and 9 highlighted in blue for medium compliance. On the other hand, due to limited sample analysis capacity per hour, concurrent analyte determination capacity, and instrumentation requirements, criteria 2, 3, and 6 are highlighted in light blue for low compliance. It is encouraging that none of the procedure's aspects were highlighted in white, demonstrating no compliance.



**Figure 9.** The BAGI score of ritlecitinib forced degradation protocol.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Chemicals

The ritlecitinib standard substance (assigned purity 99.98%) was purchased from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA). Methanol, acetonitrile, and formic acid from Merck (Darmstadt, Germany) were of LC-MS grade. Sodium hydroxide pellets (97.0%, ACS reagent) and hydrogen peroxide solution (35% (*w/w*) in H<sub>2</sub>O) were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), while hydrochloric acid (37%, p.a.) was purchased from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Ultra-pure water was procured using the WaterPro water system (a resistivity of 18.2 mΩ·cm at 25 °C) Labconco (Kansas City, MI, USA).

#### 3.2. Preparation of Stock and Standard Solutions

The stock solution of ritlecitinib (1 mg/mL) was prepared by dissolving an appropriate amount of the standard substance in methanol, followed by 15 min of sonication. Using a mixture of methanol and ultra-pure water (50:50, *v/v*), necessary aliquots from the stock solution were diluted to create the serial solutions in the required range of 2–100 µg/mL. Until they were used, the solutions were kept at 4 °C, protected from light.

#### 3.3. Instruments and Analytical Conditions

The analytical equipment used comprised a liquid chromatograph Agilent 1260 series (auto-injector, binary pump, vacuum degasser, thermostat, and diode array detector) and an Agilent Ultivo triple quadrupole mass spectrometer with an ESI, connected to a computer loaded with OpenLab ChemStation v2.8 and MassHunter software v11.0 for equipment control, data acquisition, and processing.

Optimum separation of all analytes was achieved on a Kinetex EVO C18 Core-Shell analytical column (3.0 mm × 100 mm with 2.6 µm particle size) by Phenomenex (Torrance, CA, USA), with an operating temperature of 40.0 ± 0.1 °C, by employing ultra-pure water as mobile phase A, while acetonitrile served as mobile phase B; both were acidified with formic acid (0.1%) in gradient elution mode (0–4 min: 0–25% B; 4–6 min: 25–80% B; 6–13 min: 80–0%). A flow of 0.8 mL/min was utilized for the mobile phase. During a chromatographic run, the absorbance of the analytes was collected in the spectral range of 200 to 400 nm, while the

wavelength of ritlecitinib assessment was determined to be 280 nm with a slit of 4 nm. The injection volume was 5  $\mu$ L.

The MS settings were optimized to maximize the signal. The results were acquired in the positive mode obtained from the ESI source, operating at a capillary voltage of 3.5 kV and a nebulizer pressure of 20 psi. The gas temperature was maintained at 350 °C with a gas flow rate of 11 L/min. Daily calibration was performed using an ESI-L tuning mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Mass spectra were recorded in full-scan mode over the  $m/z$  range of 100 to 600. The ritlecitinib fragmentation investigation employed a highly pure N<sub>2</sub> (>99.9995) as the collision gas, with a collision energy of 20 V and a fragmentor voltage of 110 V.

### 3.4. Analytical Method Validation

Using ICH guidelines (Validation of analytical procedures, ICH Q2(R2)), a variety of parameters for the newly developed method for the assessment of ritlecitinib were validated [12].

### 3.5. Forced Degradation Study

The forced degradation study was conducted to prove the ability of the method to indicate stability. The testing was carried out as per ICH guidelines (Stability testing of new drug substances and drug products, Q1A(R2) and Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products, Q1B) under different acid, base, oxidative, photolytic, and thermal conditions [13,14]. The forced degradation study was conducted either until a degradation level of 10–20% was achieved or for a maximum duration of 10 days. The samples were analyzed at zero time (without exposure) and at regular intervals after exposure to stress conditions. The optimal conditions found are described below. For acidic and basic degradation, the prepared stock solution was added to 1 M hydrochloric acid or 1 M sodium hydroxide and kept at ambient temperature in amber glass vials for 72 h for basic degradation and 10 days for acid degradation. For oxidative degradation, solutions were prepared in a hydrogen peroxide (33%) solution and kept at ambient temperature in amber screw cap vials for 48 h. Photodegradation of the sample solution was induced by a combination of UV and visible light for 10 days in transparent screw cap vials at room temperature. Finally, a thermal stress test was performed by storing the sample solution in amber screw cap vials within a thermostatically controlled incubator (ES-20/60, Biosan, Riga, Latvia) set at 70 °C for a period of up to 10 days. The stress samples were transferred to a volumetric flask and diluted with a mixture of methanol and ultra-pure water (50:50,  $v/v$ ) to obtain a final concentration of 100  $\mu$ g/mL. For every stress condition, the blank solution was subjected to stress in the same manner as the drug solution. The zero-time, blank, and stressed solutions were analyzed using the proposed UHPLC-DAD-MS/MS method. For kinetic study, samples were collected for up to 30 days until reaching 50% drug degradation. To define the kinetic model, equations presented in the Supplementary Materials (Table S1) were used. All calculations were obtained using Microsoft<sup>®</sup> Excel v16.0 software.

### 3.6. Sustainability Assessment Methods

The sustainability of the forced degradation procedure was evaluated using the most widely applied greenness assessment tools such as AMGS, Analytical Eco-scale assessment method, MoGAPI, ComplexGAPI, AGREE, and AGREEprep. These approaches considered various aspects of the proposed analytical procedure to provide the green index of the forced degradation study [19–24]. Furthermore, BAGI, a new metric tool for evaluating the practicality of an analytical method, was applied [26]. The method input data are given in the Supplementary Materials (Tables S2–S8).

## 4. Conclusions

Following ICH recommendations, a UHPLC/DAD/MS/MS stability-indicating method for determining ritlecitinib and its degradation products was developed and validated. The stability of ritlecitinib was evaluated by exposing the substance to various stress conditions. The formation of degradation products was observed for the basic and oxidative stress conditions. A kinetic study was conducted, and the rate constant, half-life ( $t_{50}$ ), and shelf-life ( $t_{90}$ ) were determined. Oxidative degradation of ritlecitinib follows zero-order kinetics, while basic degradation follows second-order kinetics. The careful optimization of the mass spectrometry parameters led to the formation of six ritlecitinib fragments; among them, three were first reported in our study. The analysis showed four degradation products characterized for the first time. This study presents contributory data for future investigations on the ritlecitinib formulation development, determination of proper storage conditions, selection of container closure system, drug–excipient interactions anticipation, better stabilization of the drugs, and accurate prediction of shelf-life.

The eco-friendliness and applicability of the developed forced degradation procedure were evaluated using various metrics. As for the future perspective, we believe that the introduction of principles of green and white analytical chemistry into method development may contribute to an increase in the development of eco-friendly analytical procedures applicable in routine analysis.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph18010124/s1>, Figure S1: Residual plot of calibration curve of ritlecitinib; Figure S2: The box-and-whisker plot of intermediate precision data. The average value is indicated by a cross, the central line represents the median value, and the large box indicates the inter-quartile range (1st to 3rd quartiles). The upper and lower whiskers correspond to the highest and lowest values, respectively; Table S1: Orders of degradation reaction and equations for calculating kinetic parameters; Table S2: AMGS input data of ritlecitinib forced degradation procedure; Table S3: Analytical Eco-Scale input data of ritlecitinib forced degradation procedure; Table S4: MoGAPI input data of ritlecitinib forced degradation procedure; Table S5: ComplexGAPI input data of ritlecitinib forced degradation procedure; Table S6: AGREE input data of ritlecitinib forced degradation procedure; Table S7: AGREEprep input data of ritlecitinib forced degradation procedure; Table S8: BAGI input data of ritlecitinib forced degradation procedure.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.K., D.A.K., N.T., Ž.K. and A.M.; methodology, J.K. and A.M.; software, J.K. and A.M.; validation, J.K.; formal analysis, J.K.; investigation, J.K.; resources, D.A.K. and A.M.; data curation, J.K., E.R. and A.M.; writing—original draft preparation, J.K. and A.M.; writing—review and editing, J.K., D.A.K., N.T., Ž.K., E.R. and A.M.; visualization, J.K. and A.M.; supervision, D.A.K., N.T., Ž.K. and A.M.; project administration, A.M.; funding acquisition, D.A.K. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Croatian Science Foundation, grant number HRZZ-DOK-2021-02-7922 and the European Regional Development Fund, grant number KK.01.1.1.02.0021.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Roskoski, R., Jr. Properties of FDA-approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2024 Update. *Pharmacol. Res.* **2024**, *200*, 107059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Taylor, P.C.; Choy, E.; Baraliakos, X.; Szekanecz, Z.; Xavier, R.M.; Isaacs, J.D.; Strengholt, S.; Parmentier, J.M.; Lippe, R.; Tanaka, Y. Differential Properties of Janus Kinase Inhibitors in the Treatment of Immune-mediated Inflammatory Diseases. *Rheumatology* **2024**, *63*, 298–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gadina, M. JAK inhibitors: Is specificity at all Relevant? *Semin. Arthritis Rheum.* **2024**, *64S*, 152327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. The Lancet Rheumatology. JAK inhibitors—Friend or Foe? *Lancet Rheumatol.* **2024**, *6*, e129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Blair, H.A. Ritlecitinib: First Approval. *Drugs* **2023**, *83*, 1315–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zelesky, T.; Baertschi, S.W.; Foti, C.; Allain, L.R.; Hostyn, S.; Franca, J.R.; Li, Y.; Marden, S.; Mohan, S.; Ultramari, M.; et al. Pharmaceutical Forced Degradation (Stress Testing) Endpoints: A Scientific Rationale and Industry Perspective. *J. Pharm. Sci.* **2023**, *112*, 2948–2964. [[CrossRef](#)]
7. Alvarenga Junior, B.R.; Carneiro, R.L. Chemometrics Approaches in Forced Degradation Studies of Pharmaceutical Drugs. *Molecules* **2019**, *24*, 3804. [[CrossRef](#)]
8. Kovačić, J.; Amidžić Klarić, D.; Turk, N.; Krznarić, Ž.; Mornar, A. Development and Validation of Stability-indicating Method of Etrasimod by HPLC/DAD/MS/MS Technique with Greenness Profiling. *Heliyon* **2024**, *10*, e34066. [[CrossRef](#)]
9. Kovačić, J.; Amidžić Klarić, D.; Turk, N.; Mornar, A. Size Exclusion Chromatography as Green Support for Forced Degradation Study of Adalimumab. *Acta Pharm.* **2023**, *73*, 709–721. [[CrossRef](#)]
10. Bauman, J.N.; Doran, A.C.; Gualtieri, G.M.; Hee, B.; Strelevitz, T.; Cerny, M.A.; Banfield, C.; Plotka, A.; Wang, X.; Purohit, V.S.; et al. The Pharmacokinetics, Metabolism, and Clearance Mechanisms of Ritlecitinib, a Janus Kinase 3 and Tyrosine-Protein Kinase Family Inhibitor, in Humans. *Drug Metab. Dispos.* **2024**, *52*, 1124–1136. [[CrossRef](#)]
11. Salva, C.; Galla, R. Method Development and Validation for the Estimation of Ritlecitinib in Rat Plasma by LC-MS/MS and its Application in Pharmacokinetic Studies. *Afr. J. Biol. Sci.* **2024**, *6*, 830–847.
12. International Council for Harmonisation (ICH). ICH Q2R2: Validation of Analytical Procedures Scientific Guideline. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (accessed on 1 September 2024).
13. International Council for Harmonisation (ICH). ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products-scientific-guideline> (accessed on 1 September 2024).
14. International Council for Harmonisation (ICH). ICH Q1B: Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1b-photostability-testing-new-active-substances-medicinal-products-scientific-guideline> (accessed on 1 September 2024).
15. Bhangare, D.; Rajput, N.; Jadav, T.; Sahu Kumar, A.; Tekade, R.K.; Sengupta, P. Systematic Strategies for Degradation Kinetic Study of Pharmaceuticals: An issue of Utmost Importance Concerning Current Stability Analysis Practices. *J. Anal. Sci. Technol.* **2022**, *13*, 7. [[CrossRef](#)]
16. Chum, C.K.; Gladwell, I.R.; Marziano, I.; Salvalaglio, M. Unravelling the Impact of Process Impurities on the Crystallization of Ritlecitinib Tosylate Using Molecular Dynamics. *Org. Process Res. Dev.* **2024**, *28*, 3437–3752. [[CrossRef](#)]
17. Gabrič, A.; Hodnik, Ž.; Pajk, S. Oxidation of Drugs During Drug Product Development: Problems and Solutions. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Doddaga, S.; Peddakonda, R. Chloroquine-N-oxide, a Major Oxidative Degradation Product of Chloroquine: Identification, Synthesis, and Characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *81–82*, 118–125. [[CrossRef](#)]
19. Hicks, M.B.; Farrell, W.; Aurigemma, C.; Lehmann, L.; Weisel, L.; Nadeau, K.; Lee, H.; Moraff, C.; Wong, M.; Huang, Y.; et al. Making the Move Towards Modernized Greener Separations: Introduction of the Analytical Method Greenness Score (AMGS) Calculator. *Green Chem.* **2019**, *21*, 1816–1826. [[CrossRef](#)]
20. Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.M.; Konieczka, P.; Namieśnik, J. Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of Analytical Procedures. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 61–72. [[CrossRef](#)]
21. Mansour, F.R.; Płotka-Wasyłka, J.; Locatelli, M. Modified GAPI (MoGAPI) Tool and Software for the Assessment of Method Greenness: Case Studies and Applications. *Analytica* **2024**, *5*, 451–457. [[CrossRef](#)]
22. Płotka-Wasyłka, J.; Wojnowski, W. Complementary Green Analytical Procedure Index (ComplexGAPI) and Software. *Green Chem.* **2021**, *23*, 8657–8665. [[CrossRef](#)]
23. Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 10076–10082. [[CrossRef](#)]
24. Wojnowski, W.; Tobiszewski, M.; Pena-Pereira, F.; Psillakis, E. AGREEprep—Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2022**, *149*, 116553. [[CrossRef](#)]

25. Nowak, P.M.; Wietecha-Posłuszny, R.; Pawliszyn, J. White Analytical Chemistry: An Approach to Reconcile the Principles of Green Analytical Chemistry and Functionality. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2021**, *138*, 116223. [[CrossRef](#)]
26. Manousi, N.; Wojnowski, W.; Płotka-Wasyłka, J.; Samanidou, V.F. Blue Applicability Grade Index (BAGI) and Software: A New Tool for the Evaluation of Method Practicality. *Green Chem.* **2023**, *25*, 7598–7604. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 8. POPIS KRATICA I OZNAKA

ACN – acetonitril

API – djelatna farmaceutska tvar (engl. *Active pharmaceutical ingredient*)

AGREE – alat za procjenu usklađenosti s načelima zelene analitičke kemije (engl. *Analytical GREENness metric*)

AGREEprep – alat za procjenu zelene pripreme uzoraka (engl. *Analytical greenness metric for sample preparation*)

AMGS – ocjena ekološke prihvatljivosti analitičke metode (engl. *Analytical method greenness score*)

BAGI – bioanalitički zeleni indeks (engl. *BioAnalytical greenness Index*)

C – masena koncentracija analita kvantificirana u uzorcima plazme

CD – Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease, CD*)

CE – kolizijska energija (engl. *Collision energy*)

C<sub>max</sub> – vršna koncentracija u krvi (engl. *Maximum plasma concentration*)

C18 – oktadecilsilil

DLLME – disperzivna tekućinska mikroekstrakcija (engl. *Dispersive liquid-liquid microextraction*)

DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. *Differential scanning calorimetry*)

dSPME – disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Dispersive solid-phase microextraction*)

DP – produkt razgradnje (engl. *Degradation product*)

DTA – diferencijalna termička analiza (engl. *Differential thermal analysis*)

EIC – kromatogram ekstrahiranog iona (engl. *Extracted ion chromatogram*)

EDS – energijsko-disperzijska spektroskopija (engl. *Energy Dispersive spectroscopy*)

EMA – Europska agencija za lijekove (engl. *European medicines agency*)

ESI – elektrosprejna ionizacija (engl. *Electrospray ionization*)

FA – mravlja kiselina (engl. *Formic acid*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and drug administration*)

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*)

GAPI – zeleni analitički piktoqram (engl. *Green analytical procedure index*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High-performance liquid chromatography*)

IBD – upalna bolest crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*, IBD)

ICH – Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove (engl. *International council for harmonisation*)

IS – interni standard (engl. *Internal standard*)

k – konstanta brzine reakcije

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid chromatography*)

LLE – ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction*)

LLOQ – donja granica određivanja (engl. *Lower limit of quantification*)

LOD – granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*)

LOQ – granica određivanja (engl. *Limit of quantification*)

MeOH – metanol

MEPS – mikroekstrakcija pakirani sorbensom (engl. *Microextraction by packed sorbent*)

MoGAPI – modificirani zeleni analitički piktogram (engl. *Modified green analytical procedure index*)

MS – spektrometar masa (engl. *Mass spectrometer*)

MS/MS – tandemaska masena spektrometrija (engl. *Tandem mass spectrometry*)

MQ – ultračista voda (engl. *Milli-Q water*)

MRM – višestruko praćenje reakcija (engl. *Multiple reaction monitoring*)

QC – kontrolni uzorak (engl. *Quality control*)

QQQ – analizator trostrukog kvadrupola (engl. *Triple quadrupole*)

UC – ulcerozni colitis (engl. *Ulcerative colitis*)

ULOQ – gornja granica određivanja (engl. *Upper limit of quantification*)

r – koeficijent korelacije (engl. *Correlation coefficient*)

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije (engl. *Determination coefficient*)

R<sub>s</sub> – faktor razlučivanja (engl. *Resolution factor*)

RSD – relativno standardno odstupanje (engl. *Relative standard deviation*)

RRT – relativno vrijeme zadržavanja (engl. *Relative retention time*)

SPE – ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid phase extraction*)

SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid phase microextraction*)

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija (engl. *Scanning electron microscopy*)

S/N – omjer signal/šum (engl. *Signal-to-noise ratio*)

TIC – kromatogram ukupnih iona (engl. *Total ion chromatogram*)

TDM – terapijsko praćenje lijeka (engl. *Therapeutic drug monitoring*)

TGA – termogravimetrijska analiza (engl. *Thermogravimetric analysis*)

$T_{1/2}$  – vrijeme polueliminacije

$T_{max}$  – vrijeme za postizanje vršne koncentracije

$t_R$  – vrijeme zadržavanja (engl. *Retention time*)

XRD – rendgenska difrakcija (engl. *X-ray diffraction*)

## 9. ŽIVOTOPIS

Jelena Kovačić Šantek rođena je 03.10.1997. godine u Varaždinu. Osnovnu školu završila je u Vidovcu, a srednju školu – Prvu gimnaziju u Varaždinu. Studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2016. te završava 2021. godine obranom diplomskog rada pod mentorstvom prof. dr. sc. Šime Ukića. Od studenoga 2021. godine zaposlena je na radnom mjestu asistentice na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova, gdje se bavi znanstveno-istraživačkim radom u području analitičke kemije.

Njezin znanstveni interes usmjeren je na razvoj i validaciju (bio)analitičkih kromatografskih metoda, ispitivanje prisilne razgradnje lijekova te karakterizaciju produkata razgradnje primjenom HPLC-DAD i HPLC-MS/MS tehnika. Sudjelovala je u izradi i objavi 11 znanstvenih radova te u prezentaciji rezultata sudjelovanjem na 20 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Doktorski rad izrađuje pod mentorstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk kroz projekte „Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva“ (HRZZ-UIP-2017-05-3949; HRZZ-DOK-2021-02-7922) te „Napredne i održive metode analize novih lijekova za upalne bolesti crijeva“ (HRZZ-IP-2025-02-2541).

### **Izvorni znanstveni radovi**

1. Amidžić Klarić D, **Kovačić J**, Bajt P, Turk N, Krznarić Ž, Riordan E, Mornar A. Combined shake-flask, chromatographic and in silico approaches for evaluating the physicochemical and ADME properties of aloin A and aloe-emodin. *Acta Pharm.* 2025;75(3):427–447.
2. **Kovačić J**, Amidžić Klarić D, Turk N, Krznarić Ž, Riordan E, Mornar A. The stability-indicating ultra high-performance liquid chromatography with diode array detector and tandem mass spectrometry method applied for the forced degradation study of ritlecitinib: An appraisal of green and blue metrics. *Pharmaceuticals.* 2025;18(1):124.
3. **Kovačić J**, Turk N, Amidžić Klarić D, Krznarić Ž, Mornar A. Development and validation of stability-indicating method of etrasimod by HPLC/DAD/MS/MS technique with greenness profiling. *Heliyon.* 2024;10(13):e34066.
4. **Kovačić J**, Amidžić Klarić D, Turk N, Mornar Turk A. Size exclusion chromatography as green support for forced degradation study of adalimumab. *Acta Pharm.* 2023;73(4):709–721.

5. Amidžić Klarić D, **Kovačić J**, Jeličić ML, Zubčić S, Stankov V, Gulan Čičak M, Bučar B, Klarić I, Mornar A. Assessment of physicochemical parameters and contaminants in herbal dietary supplements used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceuticals*. 2023;16(6):893.
6. **Kovačić J**, Jeličić ML, Amidžić Klarić D, Mornar A. Green solid-phase (micro)extraction of andrographolides from human plasma samples followed by UHPLC-DAD-QqQ-MS/MS analysis. *Separations*. 2023;10(2):69–87.
7. Amidžić Klarić D, Mornar A, Kovačić J, Jeličić ML, Brusač E, Brletić I, Klarić I. Polyphenol content and antioxidant activity of phytoestrogen containing food and dietary supplements: DPPH free radical scavenging activity by HPLC. *Acta Pharm*. 2022;72:375–388.
8. Jeličić ML, Amidžić Klarić D, **Kovačić J**, Verbanac D, Mornar A. Accessing lipophilicity and biomimetic chromatography profile of biologically active ingredients of botanicals used in the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmaceuticals*. 2022;15(8):965.
9. Jeličić ML, **Kovačić J**, Cvetnić M, Mornar A, Amidžić Klarić D. Antioxidant activity of pharmaceuticals: Predictive QSAR modeling for potential therapeutic strategy. *Pharmaceuticals*. 2022;15(7):791.

### **Pregledni rad**

10. Mornar A, Marinac-Andić I, Amidžić Klarić D, **Kovačić J**. Mikroekstrakcija čvrstom fazom – inovativni pristup u bioanalitičkim istraživanjima. *Kem Ind*. 2022;71(9–10):639–652.

### **Stručni rad**

11. Amidžić Klarić D, **Kovačić J**, Zubčić S, Tomić S, Klarić I, Topolovec L, Mornar A. Farmakopejska ispitivanja u kontroli kakvoće biljnih sirovina i čvrstih oblika dodataka prehrani za ublažavanje simptoma menopauze. *Farm Glas*. 2025;81(1–2):19–34.