

## POVZETEK

Atorvastatin je sintezni predstavnik statinov, učinkovin za omejevanje lastne sinteze holesterola v jetrih. Terapija se izvaja dolgoročno, zato je eden od ključnih parametrov poleg učinkovitosti zdravila, da le-to vsebuje čim manj nečistot. To dosežemo po eni strani z obvladovanjem nastanka nečistot tekom sinteze oziroma z ustreznim čiščenjem in po drugi strani z ustrežno sestavo formulacije in primernim pakiranjem, s čimer preprečimo nastanek razpadnih nečistot. Za popolno obvladovanje profila nečistot je potrebno pripraviti standarde nečistot, ki jih spremljamo z analizami med sintezo in na končni učinkovini. Standarde nečistot pripravimo s sintezo ali pa z izolacijo iz zmesi. Za izolacijo uporabljamo različne kromatografske metode, med katerimi je najpogosteje uporabljena preparativna HPLC kromatografija.

V doktorski disertaciji sem na primeru spojine atorvastatina (aktivna farmacevtska učinkovina – API) pokazal, da je izolacija sorodnih nečistot API s superkrično tekočinsko kromatografijo (SFC) dobra alternativa drugim izolacijskim tehnikam, kot so tankoplastna (TLC), kolonska ali preparativna HPLC kromatografija. V določenih primerih izolacije sem pokazal tudi nekatere prednosti SFC v primerjavi s prej omenjenimi tehnikami. Atorvastatin je kompleksna organska spojina s precejšnjim številom možnih sorodnih degradacijskih nečistot.

Nečistote sem izoliral iz degradacijskih vzorcev, ki sem jih pripravil na podlagi obremenilnih stresnih testov. Degradacijske vzorce sem pripravil na osnovi eksperimentalnega načrta, upoštevajoč kombinacije reakcijskih pogojev, temperature, pH, vpliva topila, svetlobe in oksidacije. Namen je bil kvalitativno pokriti čim širše polje razpadnih produktov molekule in zagotoviti nečistote v količinah, zadostnih za izolacijo s semipreparativnim SFC.

Razvil in optimiziral sem metode za izolacijo nečistot s SFC. Preizkusil sem različne kolone, topila, modifikatorje, spreminjal gradient mobilne faze, temperaturo kolone, povratni tlak itd., da sem dobil optimalne oziroma dovolj dobre pogoje za lovljenje frakcij in izolacijo nečistote s ciljano kromatografsko čistoto nad 97 ploščinskih %. Dodatno sem moral pri nekaterih nečistotah loviti frakcije pod posebnimi pogoji (ohlajeno topilo, drugo topilo), da sem nečistote stabiliziral, ker so bile v mobilni fazi nestabilne. Pri nekaterih drugih nečistotah pa sem moral uvesti dodatno kromatografsko stopnjo pod drugimi pogoji, da sem dobil dovolj čist material (nečistoto).

V zadnjem koraku izolacije, ki je pridobivanje trdne nečistote, sem izkoristil uporabo hlapnih in plinastih mobilnih faz, ki so ena glavnih prednosti superkrične tekočinske kromatografije.

Frakcije sem lahko preprosto uparil na rotavaporju, medtem ko so pri preparativni HPLC kromatografiji potrebne desolvatacija, ekstrakcija ali liofilizacija, kar je zelo zamudno.

Izolirane nečistote sem strukturno karakteriziral in primerjal z razpoložljivimi standardi oziroma sem strukture nečistot identificiral in potrdil z LC-MS in/ali NMR. Nekatere izmed nečistot so pri normalnih pogojih nestabilne in/ali so težje dosegljive kot standard.

V sklopu svojega dela sem prvi izoliral nečistote E, L, Z in AG. Vse štiri nečistote so razpadne nečistote atorvastatina. S pomočjo izolacije s superkritično tekočinsko kromatografijo in karakterizacije z LC-MS in NMR sem prvi dokazal nastanek nečistote E v kislih pogojih pod vplivom svetlobe v vodi ali kombinaciji acetonitrila in vode. Pod temi pogoji atorvastatin razpade in nastane nečistota E, s kemijskim imenom 4-(7-(4-fluorofenil)-1,1-dimetil-8-fenil-9-(fenilkarbamoil)-4,5-dihidro-1*H*,3*H*-pirolo[2,1-*c*][1,4]oksazepin-3-il)-3-hidroksibutanojska kislina. Hkrati v acetonitrilu nastaja tudi nečistota L, ki pa je zelo nestabilna v uparini. S pomočjo LC-MS sem predvidel strukturo s kemijskim imenom (7-(4-fluorofenil)-1,1-dimetil-3-((4-oksooksetan-2-il)metil)-*N*,8-difenil-4,5-dihidro-1*H*,3*H*-pirol[2,1-*c*][1,4]oksazepin-9-karboksamid).

Nečistoti Z ((*E*)-7-(2-(4-fluorofenil)-5-izopropil-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-1*H*-pirol-1-il)-5-hidroksihept-3-enojska kislina) in AG ((3*E*, 5*E*)-7-(2-(4-fluorofenil)-5-izopropil-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-1*H*-pirol-1-il)hepta-2,4-dienojska kislina) sem izoliral iz degradacijskega vzorca atorvastatina, ki je bil termično obdelan na 180 °C. Nečistoti Z in AG sta kinetični nečistoti termičnega razpada in nastaneta v manjši meri kot termodinamski nečistoti P in R.

S superkritično tekočinsko kromatografijo sem izoliral in okarakteriziral 21 nečistot, od tega so bile, glede na razpoložljivo literaturo, štiri do sedaj neznane. Glede na pridobljene rezultate sem podrobneje razložil in revidiral razpadne poti aktivne učinkovine atorvastatina.

**Ključne besede:** Superkritična tekočinska kromatografija, atorvastatin, izolacija, degradacijske nečistote