



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Nika Hošnjak

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**ODREĐIVANJE NABUMETONA I  
NJEGOVIH METABOLITA TEKUĆINSKOM  
KROMATOGRAFIJOM**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. NIVES GALIĆ

Zagreb, 2023.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

17. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

14. srpnja 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. NIVES GALIĆ

Potpis:



## SADRŽAJ

§ Sažetak .....	V
§ 1. UVOD .....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....	2
2. 1. Nabumeton i njegovi metaboliti .....	2
2.2. Kromatografija.....	5
2.2.1. Tekućinska kromatografija.....	5
2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	6
2.3. Analiza nabumetona i njegovih metabolita .....	8
2.3.1. Određivanje nabumetona u ljudskoj plazmi .....	8
2.3.2. Određivanje nabumetona i njegovih metabolita u urinu.....	11
2.3.3. Metaboliti faze II.....	14
2.4. Zaključak .....	20
§ 3. LITERATURNI IZVORI .....	21

## § Sažetak

Razvoj farmaceutske industrije, kao posljedica društvenog razvoja, dovodi do stalnog otkrivanja novih lijekova, a jedan od njih je i nabumeton. Nabumeton je prolijek koji se koristi u liječenju reumatoidnog artritisa, osteoartritisa i akutnih ozljeda mekog tkiva. Svrha ovoga rada je dati pregled kromatografskih metoda koje su se koristile u istraživanju i određivanju prolijeka nabumetona i njegovih metabolita. Navedeni analiti određeni su u urinu, ljudskoj plazmi i biološkim izlučevinama patuljaste svinje. Kroz rad će biti prikazani i analizirani rezultati provedenih istraživanja.

## § 1. UVOD

Kroz ljudsku povijest potreba za korištenjem lijekova pokazala se nužnom kako bi obogatila i poboljšala kvalitetu ljudskog života. Iz tog razloga farmaceutska industrija iz dana u dan napreduje sve više i više. Svake godine se tržište obogati za neke dodatne farmaceutske proizvode i lijekove ili njihove generike. Sukladno navedenom, farmakokinetika se bavi istraživanjem svojstvima lijeka te njegovih nuspojava i eventulanih nedostataka prije puštanja na tržište.

Nabumeton se na tržištu farmaceutika nalazi vrlo kratko te se zasad pokazao kao najkorisniji u liječenju reumatoidnog artritisa, osteoartritisa i akutnih ozljeda mekog tkiva. Navedeni lijek se najčešće konzumira oralno u obliku tableta.<sup>1</sup>

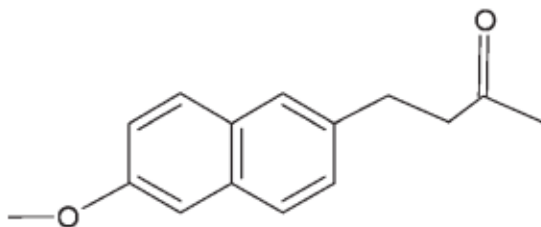
Pri ispitivanju djelotvornosti i učinkovitosti određenog lijeka provode se analize različitih uzoraka kao što su uzorci urina, ljudske plazme, bioloških tekućina i slično. Na taj način se omogućava što bolja primjena promatranog lijeka.

U ovome radu opisane su kromatografske metode korištene u analizi nabumetona i njegovih metabolita. Kao primarna metoda za određivanje nabumetona i njegovih metabolita primijenjena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) uz korištenje različitih detektora.

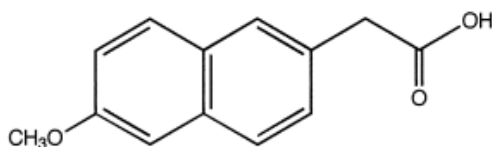
## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2. 1. Nabumeton i njegovi metaboliti

Nabumeton ( $C_{15}H_{16}O_2$ ) je spoj molekulske mase  $M_r = 228,3$  g/mol te imenom 4-(6-metoksi-2-naftil)-butan-2-on (Slika 1.). Nabumeton (NAB) je neutralni i nestereoidni protupalni lijek koji se koristi u liječenju reumatoidnog artritisa, osteoartritisa i akutnih ozljeda mekog tkiva. Nabumeton je prolijek točnije biološki neaktivna komponenta koja se može metabolizirati u tijelu kako bi se proizveo sami lijek. Nakon oralne primjene nabumetona u jetri dolazi do brze metabolizacije u aktivni metabolit 6-metoksi-2-naftiloctenu kiselinu, 6-MNA (Slika 2.). 6-MNA je metabolit koji nastaje oksidacijom bočnog lanca i pokazuje veću protuupalnu aktivnost od samog nabumetona te je zato upravo on primarno odgovoran za terapijski učinak nabumetona.<sup>3</sup> Neke od najčešćih nuspojava nabumetona su: glavobolja, vrtoglavica, mučnina, blagi osip, oticanje zglobova i bolovi u trbuhu. Također, pokazalo se da postoji nešto manji rizik od gastrointestinalnih nuspojava korištenjem nabumetona od većine drugih nesteroidnih protuupalnih lijekova



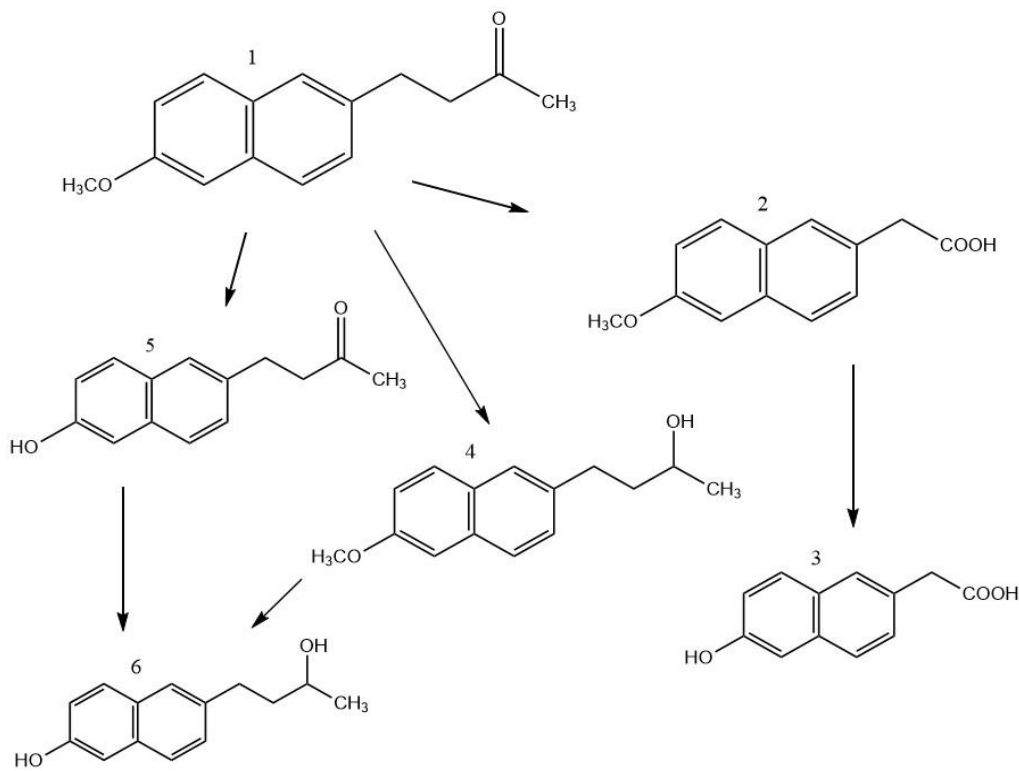
Slika 1. Struktura nabumetona.<sup>2</sup>



Slika 2. Struktura 6-metoksi-2-naftiloctene kiseline (6-MNA).<sup>3</sup>

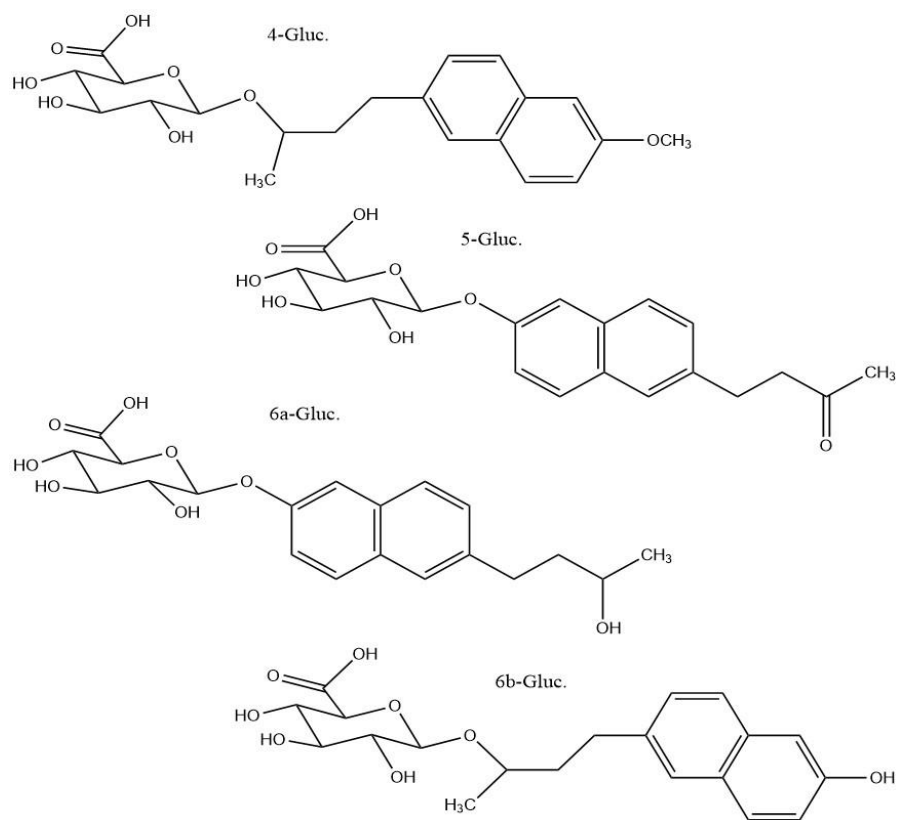


Metaboliti nabumetona dijele se na metabolite faze I i metabolite faze II. Osim 6-MNA, ostali metaboliti nabumetona faze I su: 6-hidroksi-2-naftiloctena kiselina (6-HNA), 4-(6-metoksi-2-naftil)-2-butanol (6-MeOnphBu-OH), 4-(6-hidroksi-2-naftil)-2-butanon (6-HOnphBu=O) i 4-(6-hidroksi-2-naftil)-2-butanol (6-HOnphBu-OH) (Slika 3.).<sup>4</sup> Strukture metabolita faze II prikazane su na Slici 4.



Slika 3. Strukture nabumetona (1) i metabolita nabumetona faze I (2–6)

(2 = 6-MNA; 3 = 6-HNA; 4 = 6-MeOnphBu-OH; 5 = 6-HOnphBu=O; 6 = 6-HOnphBu-OH).<sup>4</sup>



Slika 4. Strukture glavnih metabolita nabumetona faze II pronadenih u biološkim tekućinama. (4-Gluc. = 6-MeOnphBu-OH Gluc.; 5-Gluc. = 6-HOnphBu=O Gluc.; 6a/6b-Gluc. = 6-HOnphBu-OH Gluc.).<sup>4</sup>

## 2.2. Kromatografija

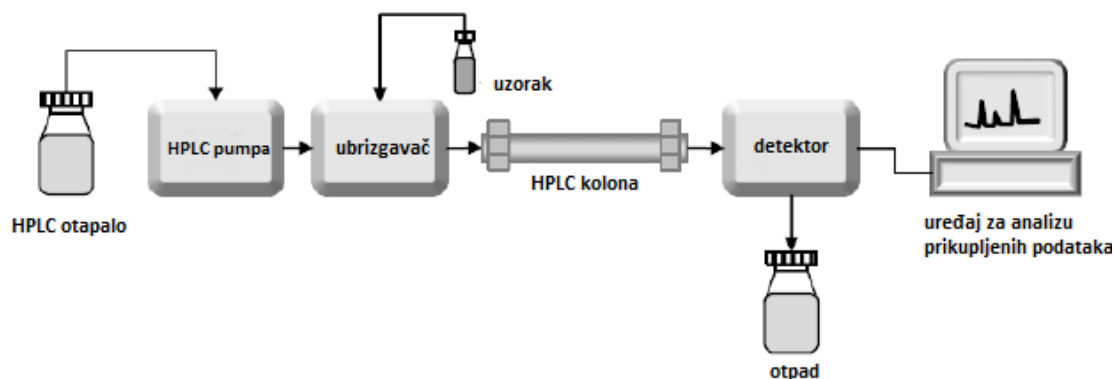
Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda razdvajanja smjese na temelju različite raspodjele sastojaka smjese između stacionarne i mobilne faze koje se ne miješaju. Stacionarna faza može biti čvrsta ili u obliku gela. Mobilna faza može biti plin, tekućina ili fluid pri superkritičnim uvjetima te time razlikujemo plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Pokretna faza u plinskoj kromatografiji se naziva plin nosilac dok se u tekućinskoj kromatografiji naziva eluens. Kromatografske metode se na temelju različitih mehanizma odjeljivanja dijele na ionsko-izmjenjivačku, afinitetnu, adsorpcijsku, razdjelnu i kromatografiju isključenjem. Kromatografija na ionskim izmjenjivačima temelji se na ionskim interakcijama nabijenih komponenata sa stacionarnom fazom. Afinitetna kromatografija temelji se na specifičnoj biološkoj interakciji analita i liganda. Adsorpcijska kromatografija temelji se na fizičkoj adsorpciji molekula na površinu čvrste tvari. Razdjelna kromatografija temelji se na različitom otapanju tvari u pokretnoj i nepokretnoj fazi, odnosno u nepokretnoj fazi ako se radi o plinskoj kromatografiji. Kromatografija isključenjem temelji se na razlici u veličini, obliku ili naboju čestica.<sup>9</sup>

### 2.2.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je metoda razdvajanja tvari između stacionarne faze i tekuće mobilne faze. Odvajanje u tekućinskoj kromatografiji temelji se na različitoj sklonosti sastojaka smjese prema stacionarnoj i mobilnoj fazi. Prema obliku kromatografske podloge kromatografija može biti kolonska u kojoj se nepokretna faza nalazi unutar kolone ili plošna gdje je nepokretna faza ploha. Grafički prikaz kromatografskog odjeljivanja naziva se kromatogram. Kromatogram prikazuje odziv detektora u ovisnosti o vremenu (volumenu) eluiranja odijeljenih tvari. Kvalitativna analiza odnosno identifikacija sastojaka određiva je iz položaja pika, a kvantitativna analiza odnosno količina sastojaka određiva je iz visine ili površine pika.

## 2.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je tehnika koja se koristi za određivanje polarnih i nepolarnih spojeva u biokemijskoj, farmaceutskoj i ostalim industrijama. HPLC je ustvari napredniji oblik LC-a. Glavna razlika između HPLC i LC je ta da u LC mobilna faza putuje pod utjecajem sile gravitacije dok kod HPLC-a mobilna faza putuje pod utjecajem visokog tlaka. Prednosti HPLC-a u odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju su visoko razlučivanje koje omogućava lako odjeljivanje komponenti iz smjese te skraćeno vrijeme odvajanja koje rezultira većom brzinom samog postupka. Dijelovi uređaja za HPLC su spremnik s mobilnom fazom, pumpa koja tjera mobilnu fazu kroz sustav pod utjecajem visokog tlaka, injektor (ubrizgavač) za unos uzorka, kromatografska kolona, detektor i uređaj za analizu prikupljenih podataka.<sup>8</sup>



Slika 5. Shematski prikaz HPLC uređaja.<sup>6</sup>

Kako bi se opisao način rada uređaja potrebno je objasniti same sastavne dijelove istoga. Viskotlačna pumpa osigurava protok mobilne faze kroz kolonu ispunjenu nepokretnom fazom. Tlak potreban za protok mobilne faze mora biti jako visok kako bi se dobila što bolja protočnost u HPLC uređaju. Uloga injektora je ubrizgavanje uzorka u tok mobilne faze koja ga dalje unosi u kolonu. Kolona je sastavljena od stacionarne faze, otporna je na primjenjeni tlak te služi za odvajanje komponenti uzorka na temelju njihovih različitih svojstava. Sljedeća komponenta instrumenta je detektor koji je služi za detekciju odvojenih sastojaka smjese. Detektor je povezan sa računalom na kojem se detektira električni signal potreban za generiranje kromatograma za

identifikaciju sastojaka uzorka. Razlikujemo nekoliko vrsta detektora poput ultraljubičastog (UV) apsorpcijskog detektora, fluorimetrijskog detektora, foto-diodnog detektora te spektrometra masa.<sup>8</sup>

Ultraljubičasti (UV) apsorpcijski detektor mjeri apsorpciju odjeljenih sastojaka koji apsorbiraju UV zračenje. Mjerenje se provodi pri jednoj valnoj duljini. Ukoliko se koristi foto-diodni detektor, istovremeno se snima apsorpcija pri različitim valnim duljinama. Fluorimetrijski detektor registrira fluorescenciju odjeljenih sastojaka smjese. Korištenje spektrometra masa kao detektora povezuje kromatografsko odjeljivanje i analizu sastojaka spektrometrijom masa.<sup>8</sup>

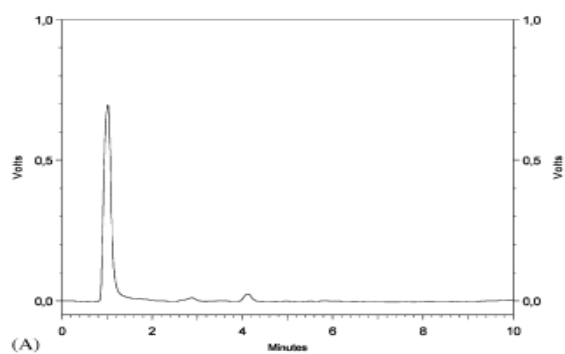
U kromatografiji normalnih faza nepokretna faza je polarna, a pokretna faza je nepolarna. S druge strane, u kromatografiji obrnutih faza (RP-HPLC) koristi se nepolarna stacionarna faza (modificirani silikagel) te polarna pokretna faza koja je smjesa vode i polarnog organskog otapala.<sup>8</sup>

## 2.3. Analiza nabumetona i njegovih metabolita

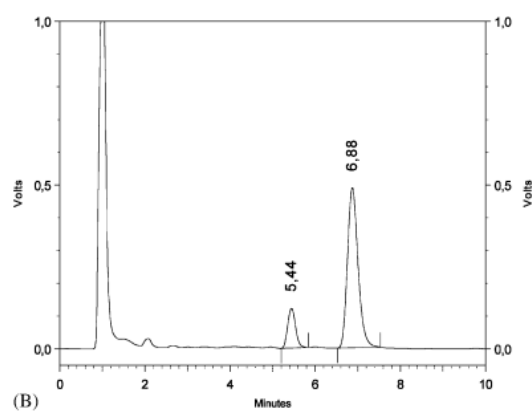
### 2.3.1. Određivanje nabumetona u ljudskoj plazmi

Analiza i određivanje koncentracije nabumetona te njegova farmakokinetika određene su jednostavnom HPLC metodom. Proces je uključivao ekstrakciju tekuće-tekuće s etil-acetatom te kromatografiju obrnutih faza uz fluorimetrijski detektor. Mobilna faza sastojala se od acetonitrila i 0,02% trietilamina uz dodatak fosforne kiseline (85%). U navedenom farmakokinetičkom ispitivanju nabumetona sudjelovalo je 24 zdravih dobrovoljaca. Dobrovoljcima su dane dvije Relifex tablete (1000 mg) te su im uzimani uzorci krvi kroz određeni vremenski period nakon konzumacije lijeka. Uzorci venske krvi (8 mL) bili su centrifugirani 10 minuta pri temperaturi od 4 °C. Dobivena plazma je do samog procesa analize bila skladištena pri –70 °C.<sup>5</sup>

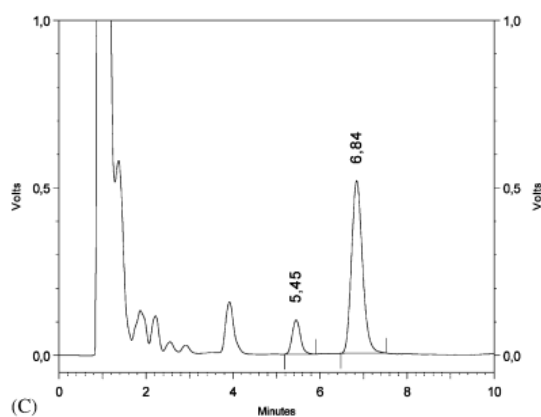
Dobiveni kromatogram plazme bez nabumetona (Slika 5.) ne pokazuje nikakve interferirajuće komponente u uzorku. U kromatogramu plazme (Slika 6.) obogaćene s nabumetonom i internim standardom mogu se uočiti pikovi pri vrijednostima od 5,44 i 6,88 min. U kromatogramu plazme (Slika 7.) dobrovoljaca 10 sati nakon konzumacije Relifex tablete (1000 mg) mogu se uočiti jasno definirani pikovi pri 5,45 i 6,84 min te pikovi ostalih komponenti u uzorku. Vrijeme zadržavanja odnosi se na vrijeme od unošenja uzorka u kolonu do pojave sastojka u detektoru smještenom na samom izlazu iz kromatografske kolone. Izmjereno vrijeme zadržavanja nabumetona i internog standarda iznose 5,4 min odnosno 6,8 min te je vidljivo poklapanje eksperimentalnih s referentnim vrijednostima.<sup>5</sup>



Slika 6. Kromatogram ljudske plazme bez nabumetona.<sup>5</sup>

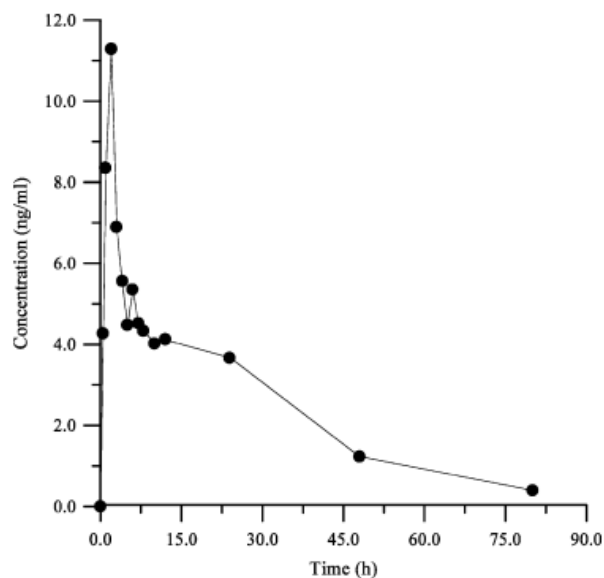


Slika 7. Kromatogram ljudske plazme obogaćene nabumetonom i internim standardom.<sup>5</sup>



Slika 8. Kromatogram ljudske plazme dobivene od dobrovoljca koji je oralno konzumirao Relifex tablete.<sup>5</sup>

Na Slici 9. prikazana je prosječna koncentracija nabumetona u plazmi 24 dobrovoljaca koji su konzumirali Relifex tablete (1000 mg) u ovisnosti o vremenu.<sup>5</sup>



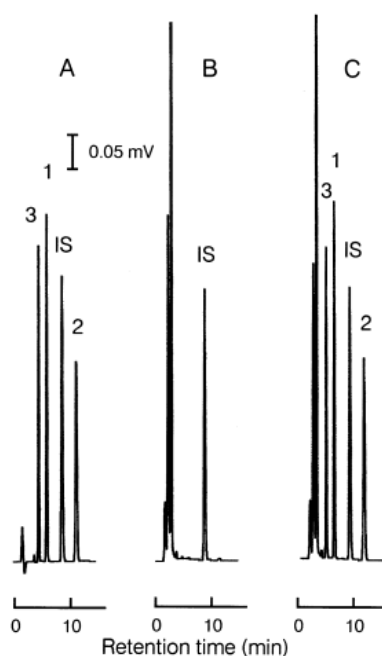
Slika 9. Prikaz prosječne koncentracije nabumetona u ljudskoj plazmi u ovisnosti o vremenu od konzumacije Relifex tablete.<sup>5</sup>

Na temelju grafičkog prikaza vidljivo je kako je maksimalna koncentracija nabumetona u ljudskoj plazmi bila postignuta otprilike 3 sata nakon konzumacije samog lijeka Relifex. Provedenim istraživanjem utvrđeno je da je koncentracija nabumetona u ljudskoj plazmi mala što je i očekivano jer je nabumeton predlijeak koji je sklon konverziji u pripadajući aktivni metabolit.



### 2.3.2. Određivanje nabumetona i njegovih metabolita u urinu

Uzorci urina često su upotrebljavani za određivanje farmakokinetičkih parametara lijekova. Analiza i istovremeno određivanje nabumetona i njegovog glavnog metabolita 6-metoksi-2-naftiloctene kiseline (6-MNA) u uzorcima urina odrađena je pomoću HPLC metode obrnutih faza (RP-HPLC). Za kvantitativnu analizu korištena je kromatografija ionskih parova pri čemu je upotrebljen trietilamin i natrijeva sol heptan-1-sulfonske kiseline (HSA) kao reagensa. Uzorci urina detektirani su fluorimetrijskim detektorom. Fluorimetrijska detekcija provedena je uz eksitaciju pri 280 nm te je emisija praćena pri 350 nm. Standardne otopine nabumetona, 6-MNA i internog standarda metil p-toluata pripremljene su otapanjem određene količine komponenti u etanolu pri sobnoj temperaturi. Pripremljene otopine čuvane su pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do samog početka analize. U ispitivanju su korišteni čisti uzorci urina dobiveni od zdravih dobrovoljca koji su čuvani pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do početka analize. Navedeni uzorci urina prikupljeni su 0-4 sata nakon oralne primjene 800 mg nabumetona. Prije samog proces uzorci urina bili su pročišćeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi kako bi se omogućilo lakše i točnije praćenje derivata od interesa. Za ekstrakciju na čvrstoj fazi korištena je Bond-Elut Certify II kolonica koja sadrži nepolarni C8 sorbent i jaki anionski izmjenjivač. Mobilna faza korištena u kromatografskoj analizi sastojala se od 0,5 g natrijeve soli heptan-1-sulfonske kiseline (HSA) otopljene u 1000 mL smjese acetonitrila, vode i trietilamina uz dodatak fosforne kiseline do pH 3. Odgovarajući kromatogrami prikazani su na Slici 10.<sup>3</sup>



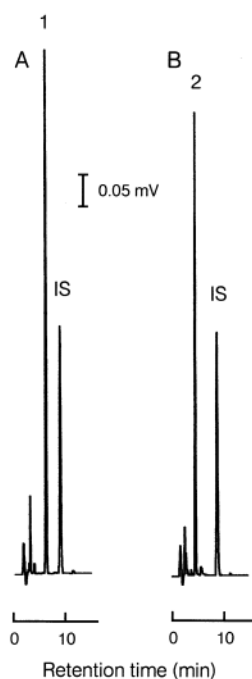
Slika 10. Kromatogram standardne otopine naproksena\*, nabumetona, 6-MNA i internog standarda (A). Kromatogram čistog ljudskog urina (B) i kromatogram urina obogaćenog s naproksenom, nabumetonom i 6-MNA (C).

(1 = NAP; 2 = NAB; 3 = 6-MNA; IS = interni standard).<sup>3</sup>

\*autori su u navedenom istraživanju osim nabumetona i njegovih metabolita istraživali i lijek naproksen

Na temelju kromatograma prikazanih na Slici 10. vidljivo je da je vrijeme analize iznosilo samo 13 minuta.

Uzorci urina sakupljenih 0-4 sata nakon konzumacije lijeka razrijeđeni su u svrhu određivanja NAP i NAB glukuronida. NAP i NAB glukuronidi određivani su kao naproksen (NAP) i nabumeton (NAB) nakon procesa alkalne hidrolize. Alkalna hidroliza postignuta je dodatkom natrijeva hidroksida u razrijeđene uzorke urina. Alkalna hidroliza odnosi se na nukleofilnu supstituciju u kojoj hidroksidni ion ima ulogu nukleofila. Sam proces glukuronidacije podrazumijeva konjugaciju lijeka ili metabolita s glukuronskom kiselinom te se odvija u jetri, a dobiveni konjugati odnosno glukuronidi se uklanjaju iz organizma urinom.



Slika 11. Kromatogram dobiven analizom urina 0-4 sata nakon oralne konzumacije lijeka naproksena (A) i nabumetona (B). (1 = NAP; 2 = 6-MNA; IS = interni standard).<sup>3</sup>

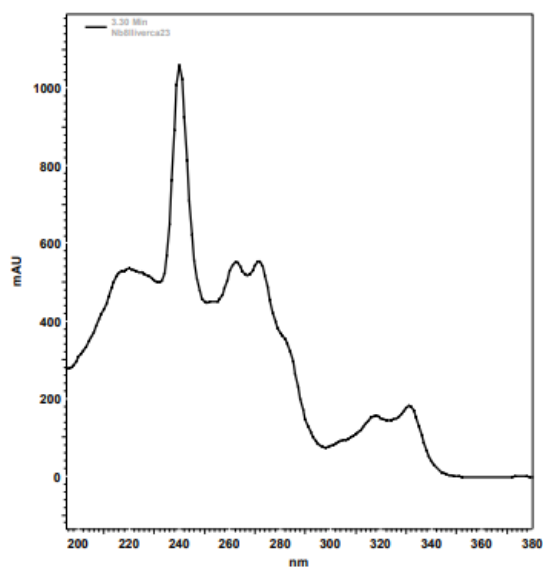
U kromatogramu B prikazanom na Slici 11. vidljiv je samo pik metabolita 6-MNA, a razlog tome je što je koncentracija nabumetona u uzorcima urina sakupljenih 0-4 sata nakon konzumacije i dekonjugacije alkalnom hidrolizom, bila ispod granica detekcije. Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti da je koncentracija i stopa izlučivanja metabolita 6-MNA veća u uzorcima urina koji su dekonjugirani alkalnom hidrolizom.

### 2.3.3. Metaboliti faze II

Metabolizam opisuje kemijske reakcije koje mijenjaju lijekove u spojeve koje je lakše eliminirati iz organizma, a produkti tih kemijskih reakcija nazivaju se metaboliti. Navedene reakcije su katalizirane enzimima te se najčešće događaju u jetri. Metabolizam je većinom podijeljen u dvije faze: metabolizam faze I i metabolizam faze II. Metabolizam faze I uključuje kemijske reakcije poput oksidacije, redukcije i hidrolize. Reakcije metabolizma faze I pretvaraju izvorni lijek u polarnije aktivne metabolite. Metabolizam faze II uključuje reakcije koje kemijski mijenjaju lijek ili metabolit faze I u spojeve koji se dobro topljivi da se mogu izlučiti u urinu. Navedene reakcije u kojima je za molekulu lijeka ili metabolita vezana ionizirajuća skupina naziva se konjugacija, a nastali produkt konjugat. Nastali konjugati su polarniji, ali neaktivni metaboliti.<sup>7</sup>

Metaboliti nabumetona faze I su: 6-metoksi-2-naftiloctena kiselina (6-MNA), 6-hidroksi-2-naftiloctena kiselina (6-HNA), 4-(6-metoksi-2-naftil)-2-butanol (6-MeOnphBu-OH), 4-(6-hidroksi-2-naftil)-2-butanon (6-HOnphBu=O) i 4-(6-hidroksi-2-naftil)-2-butanol (6-HOnphBu-OH).<sup>4</sup>

Metaboliti faze II imaju kompliciranije strukture te zato njihova identifikacija i određivanje zahtijeva pristup koji uključuje korištenje nekoliko analitičkih metoda. Identifikacija i određivanje metabolita nabumetona faze II provedena je HPLC metodom uz fotodiodni detektor te vezanim sustavom tekućinska kromatografija – spektroskopija masa.<sup>4</sup> Karakterističan UV-spektar smjese naproksena (I.S.), nabumetona i svih njegovih metabolita faze I i II prikazan je na Slici 12.



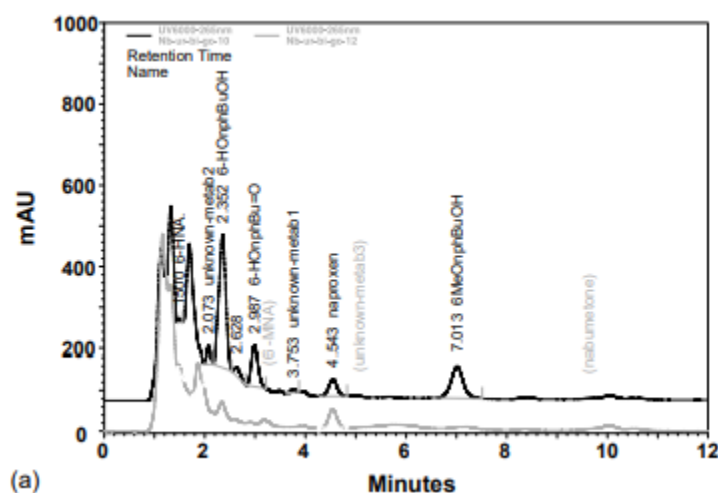
Slika 12. UV spektar nabumetona i njegovih metabolita dobiven uz detektor s nizom dioda.

UV maksimumi: 220, 240, 265, 272, 318 i 333 nm.<sup>4</sup>

U kvantitativnoj analizi metabolita faze II korišteni su uzorci žuči, sadržaj tankog crijeva i urin patuljaste svinje. Kastrirani mužjak patuljaste svinje oralno je primio 1 g nabumetona (dvije tablete od 500 mg) te su pet sati nakon primjene uzete navedene tekućine za analizu. Referentni uzorci bioloških tekućina uzeti su od patuljaste svinje koja nije konzumirala lijek. Uzorci su čuvani pri  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  do početka same analize. Prilikom pripreme uzorka napravljena je ekstrakcija tekuće-tekuće s dietil-eterom, ali kako su svi metaboliti faze II izrazito polarni nije došlo do potpune ekstrakcije. Navedeni problem je riješen tako da su se biološke tekućine podijelile u tri dijela. U prvi dio je dodan enzim  $\beta$ -glukuronidaza, u drugi dio je dodan enzim sulfataza, a u treći dio nije dodano ništa radi usporedbe. Oba navedena enzima pretvaraju metabolite faze II natrag u metabolite faze I. Tako nastale inkubacijske smjese su zatim bile podvrgnute ekstrakciji tekuće-tekuće i daljnoj analizi.<sup>4</sup>

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda (HPLC-DAD) korištena je za određivanje metabolita nabumetona faze II te su pritom korištene dvije mobilne faze. Mobilna faza A sastojala se od acetonitrila, vode visoke kakvoće i octene kiseline u volumnim

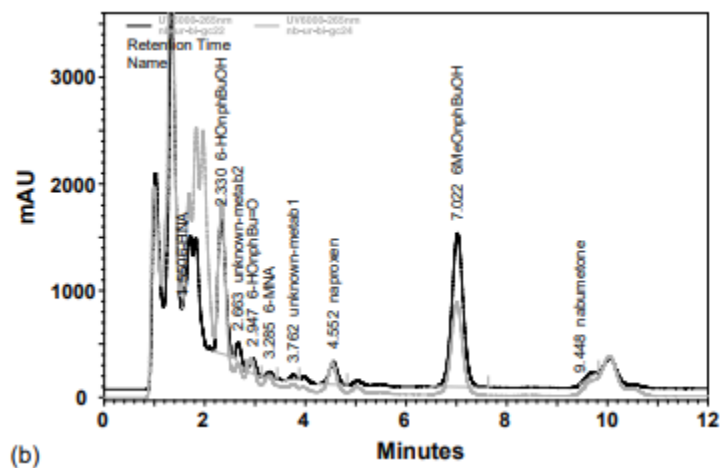
omjerima 45:55:1, a korištena je za separaciju i određivanje nabumetona i njegovih metabolita faze I u uzorcima bioloških tekućina. Mobilna faza B sastojala se od acetonitrila, vode visoke kakvoće i octene kiseline u volumnim omjerima 10:90:1, a korištena je za odvajanje metabolita faze II u razrijeđenim biološkim tekućinama direktno unešenih u kromatografsku kolonu. Metoda HPLC-a obrnutih faza s mobilnom fazom A korištena je za određivanje nabumetona i njegovih metabolita faze I, ali i za neizravno određivanje metabolita faze II nakon njihove pretvorbe u metabolite faze I kao što je prethodno opisano. Kada su mjereni ekstrakti žuči i urina, pojedinačna analiza je trajala 12 minuta dok je u slučaju uzorka crijevnog sadržaja trajala 45 minuta zbog prisutnosti nepoznatih dodatnih spojeva. Analiza polarnih metabolita faze II, uz korištenje mobilne faze A, nije bila moguća jer nisu dostupni odgovarajući standardi. Budući da metaboliti faze II eluiraju iz kromatografske kolone u području blizu najpolarnijeg metabolita faze I, 6-MNA, uvedena je mobilna faza B, drugačijeg sastava, koja je omogućila bolju rezoluciju polarnih konjugata.<sup>4</sup>



Slika 13. Kromatogram razrijeđenog uzorka žuči patuljaste svinje uzetog 5 sati nakon konzumacije lijeka bez dodatka enzima (donja) i uz dodatak enzima  $\beta$ -glukuronidaze (gornja).<sup>4</sup>

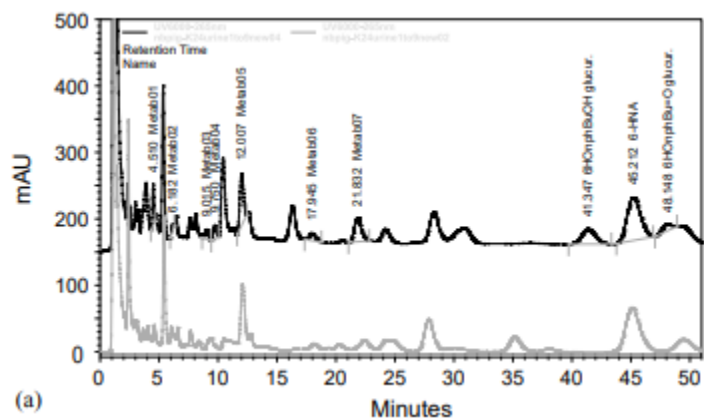
Na kromatogramskom prikazu, donji sivi kromatogram odgovara analizi razrijeđenog uzorka žuči koji nije bio tretiran enzimom. Vidljiv je samo pik naproksena, dok pikovi koji odgovaraju metabolitima faze I gotovo da nisu prisutni. Gornji tamniji kromatogram prikazuje isti uzorak žuči samo tretiran enzimom  $\beta$ -glukuronidaze. Mogu se uočiti pikovi pripisani 6-HonphBu-OH, 6-

HonphBu=O, 6-MeOnphBu-OH te ostali pikovi koji odgovaraju nepoznatim metabolitima. Usporedba dva navedena kromatograma dovela je do zaključka da glukuronidi 6-HOnphBu-OH, 6-HOnphBu=O i 6-MeOnphBu-OH prevladavaju među metabolitima nabumetona u uzorku žuči patuljaste svinje.<sup>4</sup>



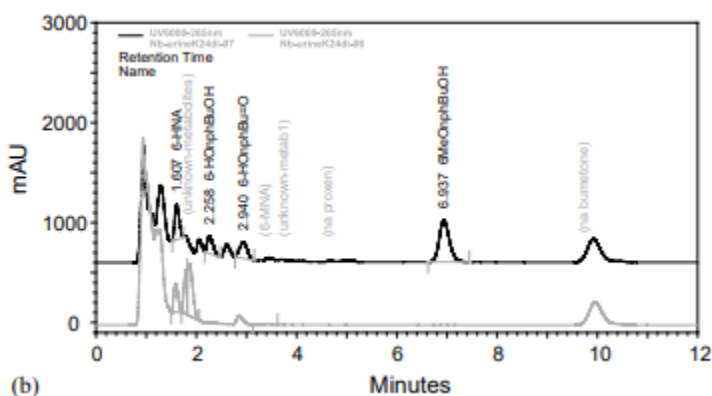
Slika 14. Kromatogram uzorka sadržaja crijeva patuljaste svinje bez dodatka enzima (donja) i uz dodatak enzima  $\beta$ -glukuronidaze (gornja).<sup>4</sup>

Na kromatogramskom prikazu, donji sivi kromatogram pripada analizi uzorka sadržaja crijeva koji nije bio tretiran enzimom dok gornji kromatogram pripada uzorku koji je tretiran enzimom  $\beta$ -glukuronidaze. Iz oba prikaza vidljivi su 6-HOnphBu-OH i 6-HOnphBu=O koji pripadaju metabolitima faze I. Veći pik 6-HOnphBu-OH na prikazu kromatogram, koji prikazuje uzorak s dodatkom enzima, potvrđuje postojanje njegovog glukuronida u uzorku sadržaja crijeva.<sup>4</sup>



Slika 15. Kromatogram razrijeđenog uzorka urina patuljaste svinje dobiven uz mobilnu fazu A bez dodatka enzima (gornja) i uz dodatak enzima  $\beta$ -glukuronidaze (donja).<sup>4</sup>

Slika 15. prikazuje analizu urina patuljaste svinje. Da bi se dobio izravan dokaz postojanosti metabolita faze II korištena je mobilna faza B koja omogućuje bolju rezoluciju polarnih konjugata. Na gornjem kromatogramu je pronađeno najmanje devet pikova s istim UV- spektrom kao nabumeton, a samo su dva spoja pronađena u višim koncentracijama. Nakon inkubacije urina s enzimom  $\beta$ -glukuronidaze pikovi ta dva navedena spoja više nisu uočljivi u kromatogramu. Navedeno je potvrdilo da ta dva pika pripadaju glukuronidima metabolita faze I točnije glukuronidima 6-HOphBu-OH i 6-HOphBu=O.<sup>4</sup>



Slika 16. Kromatogram razrijeđenog uzorka urina patuljaste svinje dobiven uz mobilnu fazu B bez dodatka enzima (donja) i uz dodatak enzima  $\beta$ -glukuronidaze (gornja).<sup>4</sup>



Na Slici 16. isto prikazani su rezultati analize urina patuljaste svinje, ali uz korištenje mobilne faze A. Donji kromatogram odgovara uzorku bez prisutstva enzima dok gornji uzorku s enzimom  $\beta$ -glukuronidaze. Na donjem kromatogramu vidljiv je samo pik koji pripada 6-HNA i pik koji pripada grupi nepoznatih metabolita. Na gornjem kromatogram izostaje pik koji pripada grupi nepoznatih metabolita, dok se uočava pik koji odgovara metabolitu 6-MeOnphBu-OH.<sup>4</sup>

Strukture metabolita faze II potvrđene su analizom bioloških tekućina vezanim sustavom HPLC-MS.

## 2.4. Zaključak

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti prikladna je tehnika za određivanje farmakokinetičkih parametara nabumetona i određivanje njegovih metabolita faze I i II u ljudskoj plazmi, urinu i biološkim izlučevinama patuljaste svinje.

Analizirajući prethodno provedena istraživanja nabumetona u ljudskoj plazmi utvrđeno je kako je za postizanje maksimalne koncentracije nabumetona u ljudskoj plazmi bio potreban vremenski period od tri sata nakon konzumacije lijeka Relifex. Nadalje, u urinu koncentracija nabumetona je bila ispod granica detekcije odnosno utvrđeno je postojanje samo njegovog metabolita 6-metoksi-2-naftiloctene kiseline (6-MNA). Na provedenom istraživanju patuljaste svinje promatrani su uzorci žuči, sadržaja crijeva i urina. U uzorku žuči patuljaste svinje zaključeno je da glukuronidi 6-HOnphBu-OH, 6-HOnphBu=O i 6-MeOnphBu-OH prevladavaju među metabolitima nabumetona. U uzorku sadržaja crijeva potvrđeno je postojanje glukuronida 6-HOnphBu-OH. Na uzorku urina korištene su dvije mobilne faze te time dobivena dva zaključka. Korištenjem mobilne faze B utvrđeni su glukuronidi metabolita faze I točnije glukuronidi 6-HOnphBu-OH i 6-HOnphBu=O. S druge strane, korištenjem mobilne faze A bez dodatka enzima utvrđen je metabolit 6-hidroksi-2-naftiloctena kiselina (6-HNA), a uz dodatak enzima  $\beta$ -glukuronidaze utvrđen je metabolit 6-MeOnphBu-OH.

Odabir metode tekućinske kromatografije korištene u radovima se pokazao kao dobar za određivanje nabumetona i njegovih metabolita.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. [Nabumetone: therapeutic use and safety profile in the management of osteoarthritis and rheumatoid arthritis - PubMed \(nih.gov\)](#) , 24. listopada 2022.
2. N. Sethi, A. Anand, K. K. Chandrul, G. Jain, K. S. Srinivas, *J. Chromatogr. Sci.*, **50** (2012) 85–90.
3. E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, M. Nishida, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23** (2000) 917–925
4. M. Nobilis, M. Holcapek, L. Kolárová, J. Kopecký, M. Kuneš, Z. Svoboda, J. Kvetina, *J. Chromatogr. A*, **1031** (2004) 229–236
5. K. Kobylinska, M. Barlinska, M. Kobylinska, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32** (2003) 323-328
6. [Schematic diagram of the High Performance Liquid Chromatography \(HPLC\)... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#), 12. srpnja 2022.
7. [download \(rsc.org\)](#), 10. srpnja 2022.
8. D. A. Skoog, D. M. West, *Principles of Instrumental Analysis 7<sup>th</sup> ed*, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1980, str. 769–780
9. W.M.A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Ranton, 2006, str. 18-27