

# Kromatografske tehnike i metode u analizi lijekova

---

**Bezjak, Tea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:384710>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-08**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Tea Bezjak

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Primjena kromatografskih tehnika i metoda u analizi lijekova**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. NIVES GALIĆ

Zagreb, 2020.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

10. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

25. rujna 2020.

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PEGLED.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Lijekovi .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Kromatografija.....</b>	<b>3</b>
2.3.1. <i>Tekućinska kromatografija.....</i>	<i>4</i>
2.3.2. <i>Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....</i>	<i>4</i>
<b>2.4. Spektrometrija masa.....</b>	<b>5</b>
2.4.1. <i>Elektroaspršenje.....</i>	<i>6</i>
2.4.2. <i>Kvadrupolni analizator mase.....</i>	<i>7</i>
2.4.3. <i>Tandemna spektrometrija masa.....</i>	<i>7</i>
<b>2.5. Analiza farmaceutika.....</b>	<b>8</b>
2.5.1. <i>Prikupljanje i priprema uzorka.....</i>	<i>8</i>
2.5.2. <i>LC-MS/MS analiza.....</i>	<i>10</i>
<b>2.6. Zaključak.....</b>	<b>12</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XIII</b>



---

## § Sažetak

Lijekovi su spojevi koji se primjenjuju u humanoj i veterinarskoj medicini. Posljedica sve veće konzumacije lijekova je njihova rastuća prisutnost u okolišu, te su stoga razvijene različite tehnike i metode analize za njihovu identifikaciju i kvantitativno određivanje. Postupci analize lijekova u uzorcima iz okoliša obuhvaćaju odabir reprezentativnog uzorka, njegovu pripravu za kromatografsko razdvajanje te naposljetku detekciju. Da bi se uspješno analizirali lijekovi prisutni u niskim koncentracijama potrebne su vrlo selektivne i osjetljive metode analize. Analitički postupak često uključuje ekstrakciju na čvrstoj fazi nakon koje slijedi kromatografsko odjeljivanje. Za separaciju farmaceutika farmaceutika različitih polarnosti primjenjuje se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, a detekcija se provodi tandemnom spektrometrijom masa. U navedenom spregnutom sustavu kao tehnika ionizacije najčešće se koristi elektroraspršenje, a nastali ioni analiziraju se trostrukim kvadrupolom.

---



---

---

## § 1. UVOD

Farmaceutici su biološki aktivni spojevi koji se primjenjuju za liječenje i sprječavanje bolesti ljudi i životinja. Posljednjih godina sve više pozornosti usmjerava se na istraživanja posljedica prisutnosti lijekova u okolišu. Ustanovljena je potencijalna opasnost akumulacije navedenih spojeva u ekosustavu te se stoga lijekovi smatraju novom vrstom zagađivala.<sup>1</sup>

Nakon konzumacije lijekovi i njihovi metaboliti dopijevaju u ekosustav izlučivanjem, a njihova rastuća prisutnost zabilježena je ponajviše u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, površinskim i podzemnim vodama, tlu i sedimentima. Kako su medicinske tvari djelotvorne u niskim koncentracijama, svaka pojavnost lijekova u ekosustavu predstavlja opasnost od njegovog neželjenog djelovanja. Nadalje, biotičkom i abiotičkom razgradnjom lijekova nastaju razgradni produkti s promijenjenim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ovakvi derivati potencijalno mogu biti toksičniji od ishodnih spojeva.<sup>2</sup>

U ovome radu navedene su i opisane kromatografske tehnike i metode u analizi lijekova. Postupak analize obuhvaća pripremu uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi, nakon koje slijedi izdvajanje tekućinskom kromatografijom te detekcija tandemnom spektrometrijom masa. Primijenjene metode osjetljive su i selektivne te je njima bilo moguće odrediti niske koncentracije lijekova u prikupljenim kompleksnim uzorcima iz okoliša.

---

## § 2. LITERATURNI PEGLED

### 2.1. Lijekovi

Lijekovi su kemijski spojevi koji utječu na organizam čovjeka i njegove procese s ciljem dijagnoze, liječenja ili prevencije bolesti. Složene su molekule s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima i biološkim učincima. Nakon konzumacije, njihove aktivne supstance prolaze kroz metaboličke procese u organizmu. Metabolički produkti izlučuju se iz organizma te kanalizacijskim sustavima prenose u postrojenja za otpadne vode gdje podliježu dodatnim transformacijama. Nekompletnom obradom, lijekovi i njihovi transformacijski produkti dopijevaju u okoliš. Farmaceutski produkti detektirani su u podzemnim vodama, pitkoj vodi, tlu i sedimentima.<sup>2</sup> Farmaceutici u vodenim ekosustavima detektirani su u rasponu veličina od nanograma do mikrograma po litri.<sup>1</sup>

Koliko dugo će farmaceutici biti vezani za tlo i sedimente te kakva im je sklonost razgradnji ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Ukoliko podliježu ionizaciji, ovisno o pH u kojem se nalaze, mogu egzistirati kao neutralne ili nabijene vrste. Svojstva lijekova određuju njihovu fotostabilnost, adsorpcijski kapacitet, brzinu i ispiranja u vodene ekosustave.<sup>3</sup> Jednom prisutni u okolišu farmaceutici podliježu biotičkoj i abiotičkoj razgradnji. Biotički procesi razgradnje uključuju razgradnju farmaceutika pod utjecajem bakterija, dok su abiotički procesi razgradnje hidroliza i fotoliza. Efekti farmaceutika u vodenim sustavima mogu dovesti do endokrinih poremećaja, genotoksičnosti i porasta otpornosti patogenih bakterija na antibiotike. Stoga se sve više ističe problem prisutnosti lijekova u okolišu i to ponajviše skupina lijekova poput analgetika, antibiotika, steroidnih hormona, lipidnih regulatora, beta-blokatora i citostatika.<sup>2</sup>

Budući da su lijekovi i njihovi metaboliti u okolišu prisutni u niskim koncentracijama potrebne su osjetljive metode za njihovu detekciju i analizu. Većina analiza lijekova u uzorcima iz okoliša, zbog svoje kompleksnosti i prisutnosti različitih interferirajućih elemenata, zahtjeva korak ekstrakcije, koja znatno utječe na preciznost i točnost analize. Ekstrakcijom na čvrstoj fazi omogućeno je ukoncentriravanje niskih koncentracija analita iz vodenih uzoraka. Tehnika je prikladna za ekstrakciju farmaceutika različitih polarnosti.<sup>4</sup> Nadalje, kako postoji mnoštvo različitih lijekova koji se međusobno razlikuju po strukturi i biološkoj aktivnosti potrebne su

metode kojima se mogu međusobno odvojiti i identificirati. U tu svrhu koristi se vezani sustav tekućinska kromatografija-tandemna spektrometrija masa.

## 2.2. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija je analitička separacijska tehnika koja se temelji na različitoj razdiobi spojeva između dviju faza koje se ne miješaju. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) najpogodnija je za izolaciju, ukoncentriravanje analita te uklanjanje nepoželjnih tvari iz uzoraka pri analizi farmaceutika u složenim uzorcima kao što su primjerice uzorci iz okoliša ili biološki uzorci. Izdvajanje spojeva temelji se na njihovoj različitoj polarnosti i topljivosti u određenom otapalu. Postupak ekstrakcije započinje kondicioniranjem stacionarne faze u kojem se sorbens solvatira otapalom (najčešće voda ili metanol) za efektivniju interakciju čvrste faze s analitom od interesa. U slijedećem koraku uzorak se propušta kroz kolonicu napunjenu sorbensom pri čemu se analit s većim afinitetom za čvrstu fazu veže na sorbens, dok interferirajuće prolaze kroz kolonicu bez zadržavanja. Vezane molekule analita eluiraju se s kolonice propuštanjem malih količina odgovarajućeg otapala. Ovom tehnikom uklanjaju se različite soli i organske molekule, čime se uzorak pročišćava, a analit ukoncentrirava. Nadalje, nakon postupka SPE, otapalo se može upariti te zamijeniti otapalom koje je prikladnije za nadolazeći korak u kromatografskoj analizi.<sup>5</sup> Izbor sorbensa ovisi o vrsti analita. Za ekstrakciju farmaceutika iz vodenih uzoraka najčešće se koristi Oasis HLB sorbens kojim je moguća ekstrakcija kiselih, neutralnih i bazičnih analita u širokom rasponu pH-vrijednosti.<sup>3</sup>

## 2.3. Kromatografija

Kromatografija je separacijska tehnika kojom se sastojci smjese odvajaju na temelju njihove različite raspodjele između dviju faza koje se ne miješaju. Ovisno o tome je li pokretna faza plin, tekućina ili fluid pri superkričnim uvjetima razlikujemo tekućinsku, plinsku i fluidnu kromatografiju pri superkričnim uvjetima. Nepokretna faza može biti krutina ili selektivna tekućina. Kromatografsko odvajanje analita posljedica je različite raspodjele sastojaka smjese tijekom prolaska uzorka topivog u pokretnoj fazi kroz kolonu sa stacionarnom fazom. Stoga se prema mehanizmu odvajanja sastojaka razlikuju adsorpcijska, razdjelna, ionsko-izmjenjivačka, afinitetna i kromatografija isključenjem. Adsorpcijska kromatografija temelji se na odvajanju

komponenti zbog različite adsorpcije na čvrstoj fazi, a razdjelna na temelju selektivne raspodjele tvari između dvije faze. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija razdvaja sastojke temeljem ionske interakcije nabijenih tvari iz uzorka sa stacionarnom fazom. Afinitetna kromatografija temelji se na specifičnim interakcijama sastojaka i stacionarne faze. Kromatografijom isključenjem sastojci smjese odjeljuju se na temelju razlike u veličini čestica zbog čega se neke molekule dulje zadržavaju u porama nepokretne faze, dok neke prolaze kolonom bez zadržavanja.<sup>6,7</sup>

### 2.3.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je metoda separacije u kojoj se kao pokretna faza koristi otapalo ili smjesa otapala. Odvajanje se temelji na različitom afinitetu sastojaka smjese prema stacionarnoj i mobilnoj fazi. Ovisno o tome je li nepokretna faza smještena u koloni ili nanosena na ravnu podlogu, razlikuju se kolonska i plošna kromatografija. U kolonskoj kromatografiji mobilna faza pod utjecajem gravitacije ili tlaka prolazi kroz stacionarnu fazu u koloni. Razlikujemo izokratno eluiranje, u kojem je sastav mobilne faze konstantan tijekom kromatografskog razdvajanja, te gradijentno eluiranje u kojem se sastav mobilne faze tijekom analize mijenja. Nakon izlaska iz kromatografske kolone eluirane molekule se detektiraju prikladnim detektorom. Grafički prikaz ovisnosti odziva detektora o vremenu naziva se kromatogram. Identifikacija spoja određuje se položajem pika na vremenskoj skali, a iz površine ispod pika određuje se količina pojedinog sastojka.<sup>8</sup>

### 2.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

U tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti mobilna faza je tekućina propuštena kroz kolonu pod visokim tlakom kako bi se osigurao konstantan protok, a stacionarna faza smještena u koloni otporna je na primijenjeni tlak.<sup>9</sup> Vrijeme zadržavanja spojeva na koloni ovisi o jakosti vezanja na stacionarnu fazu te o topljivosti u mobilnoj fazi.<sup>6</sup> Odvajanje farmaceutika najčešće se izvodi kromatografijom obrnutih faza u kojoj je mobilna faza polarnija od stacionarne, stoga se prvo eluiraju polarnije molekule. Kolone su punjene kemijski inertnim materijalnom veličine čestica od 3 do 5  $\mu\text{m}$ .<sup>7</sup> Kao nepolarna faza najčešće se koristi kemijski modificirani silikagel i to s  $\text{C}_{18}$  alkilnim grupama vezanim za njegovu površinu.<sup>9</sup> Tijekom kromatografskog procesa dolazi jačeg zadržavanja hidrofobnih molekula te bržeg prolaska hidrofilnih molekula. Naposljetku, smanjenjem polarnosti mobilne faze eluirati će s kolone hidrofobne molekule.

Sastavni dijelovi tekućinskog kromatografa su pumpa, injektor, kromatografska kolona, detektor i писаč. Visoki tlak mobilne faze postignut je korištenjem sustava pumpi. Između njih i kromatografske kolone nalazi se injektor pomoću kojeg se određeni volumen uzorka injektira na kolonu koja je najvažniji dio cijelog sustava.<sup>9</sup> Također vrlo važan dio je detektor te o njegovom odabiru ovisi uspješnost analize. Postoje različite tehnike detekcije separiranih molekula. Najčešće korišteni detektori u HPLC temelje se na apsorpciji ultraljubičaste i vidljive svjetlosti.<sup>8</sup> U takvim detektorima snop svjetlosti propušta se kroz otopinu, a mjeri se apsorbirana svjetlost pri jednoj ili pri različitim valnim duljinama u rasponu od 190 do 600 nm.<sup>6</sup> Takav način detekcije koristan je za kvantitativne analize uzoraka s većom koncentracijom analita. Međutim, za analizu farmaceutika u uzorcima prikupljenih iz okoliša (ili biološkim uzorcima) u kojima su prisutne vrlo niske koncentracije analita, potrebne su vrlo osjetljive i selektivne metode analize. Stoga se kao detektori primjenjuju spektrometri masa. Spektrometar masa u spregnutome sustavu LC-MS primjer je osjetljivog i selektivnog detektora kojim je moguće identificirati i kvantitativno odrediti analite prisutne u uzorku u pikogramskim količinama. Selektivnost se očituje u sposobnosti identifikacije željene tvari bez interferencija ostalih spojeva u uzorku. Prednosti spektrometra masa su mogućnost razlikovanja spojeva sa sličnim vremenom zadržavanja kao i kvalitativna i kvantitativna analiza spojeva razdvojenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.<sup>9</sup>

Uzorci prikupljeni iz okoliša često sadrže ionizirane vrste koje se slabo zadržavaju na koloni. Kako bi se reducirao stupanj ionizacije analita koriste se puferi. U vezanome sustavu LC-MS koriste se lako hlapljivi puferi poput amonijeva acetata, formijata i karbonata koji ne smetaju identifikaciji analita spektrometrom masa.<sup>7</sup>

## 2.4. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika kojom se određuju spojevi na temelju njihovog omjera mase i naboja. Postupak obuhvaća ionizaciju uzorka odgovarajućom metodom ionizacije, odvajanje nastalih iona na temelju različitog omjera  $m/z$  te detekciju iona. Spektar masa pokazuje ovisnost relativnog intenziteta signala o omjeru mase i naboja. U spektru je najintenzivniji pik izražen kao 100%, a svi ostali signali prikazani su kao postotak u odnosu na njega. Prednosti spektrometra masa u odnosu na ostale detektore je mogućnost potpune

---

identifikacije analita jer se na temelju spektra masa može zaključiti o strukturi i točnoj masi sastojka.<sup>10</sup>

Spektrometar masa sastoji se od sustava za uvođenje uzorka, prostora za ionizaciju, analizatora masa te detektora. Nakon ionizacije molekula, nastali ioni odlaze u analizator gdje se odvajaju na temelju omjera mase i naboja.<sup>7</sup>

Tehnike ionizacije koje se primjenjuju su kemijska ionizacija, ionizacija elektronima, ionizacija brzim elektronima, matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, te ionizacijske metode pri atmosferskome tlaku kao što su termoraspršenje, elektroraspršenje i kemijska ionizacija pri atmosferskome tlaku. Postoje određene nekompatibilnosti između tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masenog spektrometra. Naime, mobilna faza koja se koristi u HPLC analizi pumpa se kroz kolonu pod tlakom različitim od onog pri kojem operira maseni spektrometar. Stoga nije moguće direktno prebaciti eluat s kolone u spektrometar masa. Za povezivanje ovih dviju tehnika u analizi farmaceutika najčešće se primjenjuju tehnike ionizacije pri atmosferskome tlaku: elektroraspršenje (engl. *Electrospray Ionization*) i kemijska ionizacija pri atmosferskome tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).<sup>9</sup>

#### 2.4.1. Elektroraspršenje

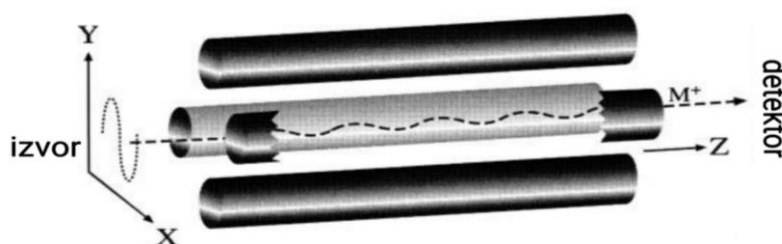
Elektroraspršenje je ionizacijska tehnika koja obuhvaća nastanak aerosola visoko nabijenih kapljica, uklanjanje otapala isparavanjem te izbacivanje iona iz nabijenih kapljica. Otapalo u kojem su otopljeni uzorci propušta se kroz metalnu kapilaru pri atmosferskome tlaku i uz primjenu visokog napona. Ovisno o primijenjenom naponu i kolektorskoj elektrodi razlikuje se pozitivna ili negativna ionizacija.<sup>11</sup> Tok tekućine se raspršuje u visoko nabijene kapljice koje putuju prema kolektorskoj elektrodi. Potom se raspršene kapljice desolvatiraju prolaskom kroz struju plina za sušenje, najčešće dušika. Evaporacijom otapala, kapljice se kontinuirano smanjuju u veličini do trenutka u kojem površinska raspodjela iona postaje prevelika. Elektrostatsko odbijanje nadvladava kohezivne sile te ioni bivaju izbačeni s površine kapljice. Nastali ioni prolaze kroz otvor s visokim vauumom i odlaze u analizator.<sup>8,11,12</sup>

Elektroraspršenje spada u blage tehnike ionizacije koje uzrokuju malu fragmentaciju molekula analita,<sup>9</sup> a izrazito je pogodna za analizu polarnih, nepolarnih i termički labilnih spojeva. Stoga je elektroraspršenje najčešća tehnika ionizacije u analizi uzoraka farmaceutika zbog visoke osjetljivosti i reproducibilnosti.<sup>3</sup>

---

### 2.4.2. Kvadrupolni analizator mase

Analizatori masa u spektrometriji masa služe za razdvajanje i odabir iona specifičnog omjera  $m/z$ . Različiti analizatori povezuju se s različitim tehnikama ionizacije i detekcije, a u vezanim sustavima LC-MS/MS najčešće se primjenjuje kvadrupolni analizator masa. Kvadrupolni analizator mase sastoji se od četiri paralelno postavljene cilindrične elektrode koje se nalaze između izvora iona i detektora. Primjenom istosmjernog i izmjeničnog napona ioni počinju oscilirati u ravnini okomitoj na smjer elektroda (slika 1.). Oscilirajućom kretnjom ioni specifičnog omjera  $m/z$  će dospjeti do detektora prateći stabilnu putanju kroz elektrode. Ioni koji osciliraju s velikim amplitudama sudaraju se s elektrodama te neutraliziraju. Kontroliranjem primijenjenog električnog polja filtriraju se ioni samo određenog omjera  $m/z$ . Mijenjanjem vrijednosti istosmjernog i izmjeničnog napona uz održavanje njihovog konstantnog omjera razdvajaju se ioni različitih omjera  $m/z$ .<sup>7,12</sup>



Slika 1. Kretanje iona kvadrupolnim analizatorom mase<sup>12</sup>

Prednosti kvadrupolnog analizatora su prihvatljiva cijena i velika brzina snimanja pa je stoga prikladan detektor u spregnutim sustavima.<sup>9</sup>

### 2.4.3. Tandemna spektrometrija masa

Tandemna spektrometrija masa MS/MS odnosi se na različit broj tehnika koje uključuju dvije faze analize. U prvoj fazi se izolira ion prekursor i podvrgava fragmentiranju na neutralni fragment i produkt ion. U drugoj fazi sekundarni maseni spektrometar analizira produkt ione.<sup>15</sup> Trostruki kvadrupolni analizator najčešće je korišten analizator u tandemnoj spektrometriji masa. Sastoji se od tri u nizu postavljena kvadrupolna analizatora. Prvi ( $Q_1$ ) i treći ( $Q_3$ ) funkcioniraju kao filteri masa propuštajući ione s točnom određenim omjerom  $m/z$ . Na drugi



analizator ( $Q_2$ ) primijenjen je samo izmjenični napon te djeluje kao kolizijska ćelija. U tom prostoru dolazi do sudarom-potpomognute fragmentacije iona (engl. *Collision Induced Dissociation*, CID). Nisko energijskim sudarima iona s atomima inertnog plina poput argona ili ksenona ioni su ekscitirani u viša energijska stanja, nakon čega fragmentiraju aktivirani ioni. Filtriranje nastalih produkata prema određenim vrijednostima  $m/z$  odvija se u  $Q_3$ . Za aktivaciju sudarom u MS/MS instrumentima kolizijska ćelija je postavljena između dva analizatora masa.<sup>7,12</sup>

U tandemnoj spektrometriji masa postoje četiri načina snimanja. Snimanje iona produkta (engl. *Product Ion Scan*) odnosi se na odabir iona prekursora određenog omjera  $m/z$  i određivanje svih iona nastalih fragmentacijom u kolizijskoj ćeliji. Snimanjem prekursor iona (engl. *Precursor Ion Scan*) detektiraju se svi prekursor ioni iz kojih nastaju fragmentiranjem ioni određene vrijednosti  $m/z$ . Pri snimanju neutralnog gubitka (engl. *Neutral Loss Scan*) odabire se neutralni fragment te detektiraju sve fragmentacije koje su dovele do gubitka tog neutralnog fragmenta. Selektivno praćenje reakcije (engl. *Selected Reaction Monitoring*) temelji se na odabiru određenih reakcija fragmentacije. Ioni točno određenog omjera  $m/z$  filtrirani prvim masenim spektrometrom detektirani su samo ako daju fragment specifičnog omjera  $m/z$ . Time je znatno povećana osjetljivost analize.<sup>7,10</sup>

## 2.5. Analiza farmaceutika

Analiza farmaceutika iz otpadnih voda započinje prikupljanjem uzoraka nakon čega slijedi priprema uzorka pogodnim ekstrakcijskim metodama. Glavni dio analize obuhvaća odvajanje i identifikaciju sastojaka vezanim sustavom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti - tandemna spektrometrija masa. Na kraju se dobiveni podatci analiziraju i statistički obrađuju.

### 2.5.1. Prikupljanje i priprema uzorka

Glavni cilj prikupljanja uzorka je prikupiti reprezentativan uzorak okoliša. Odabir pogrešnog reprezentativnog uzorka utječe na podatke same analize, stoga je važno pronaći prigodne strategije u prikupljanju uzorka. Za analizu farmaceutika iz otpadnih voda često se koristi kompozitno uzorkovanje. Kompozitno uzorkovanje je prikupljanje serije uzoraka iz okolišnog područja u pravilnim intervalima tijekom određenog vremenskog perioda.<sup>13</sup> Nakon što su uzorci prikupljeni iz okoliša potrebno ih je pravilno pohraniti. Naime, pohrana pri visokim

---

temperaturama i izloženost sunčevom zračenju ubrzala bi biotičku degradaciju farmaceutika. Kako bi se sačuvao integritet prikupljenih uzoraka potrebno ih je pohraniti u jantarnim bocama pri 4 °C i obraditi unutar 24 sata.<sup>3</sup>

Priprema uzorka odnosi se na pretvorbu uzorka okoliša u uzorak prikladan za analizu. Za pripremu najčešće se primjenjuje tehnika ekstrakcije na čvrstoj fazi. Time se uklanjaju interferencije iz kompleksnih matrica, ukoncentrirava analit i priprema za nadolazeći korak kromatografske analize. Prije same ekstrakcije potrebno je provesti centrifugiranje i filtraciju za uklanjanje krutih interferencija koje bi mogle začepiti kolonice prilikom ekstrakcije na čvrstoj fazi.<sup>14</sup>

Tijekom LC-MS/MS analize farmaceutika prikupljenih iz kompleksnih uzoraka poput otpadnih voda može doći do povišenja ili smanjenja intenziteta signala zbog efekta matrice. (engl. *Matrix Effect*). Određeni farmaceutici mogu se vezati za organske komponente iz matrice koje nisu uklonjene u pripremi uzorka što uzrokuje slabljenje signala analita.<sup>9,14</sup>

Izbor sorbensa ovisi o njegovim mogućim interakcijama s funkcionalnim skupinama farmaceutika. Za uspješnost navedenih interakcija važno je poznavati  $pK_a$  vrijednosti analita. Kako većina farmaceutika ima pozitivno i/ili negativno nabijene funkcionalne skupine, optimiranjem pH otopine uzorka ostvaruju se potrebne interakcije odabranog sorbensa i analita.<sup>3</sup> Najčešće primjenjivani sorbens je Oasis HLB, kopolimer lipofilnog divinilbenzena i hidrofilnog N-vinil pirolidina. Prednost u odnosu na modificirane silikagele poput Strata-X je bolji analitički povrat i ekstrakcija kiselih, neutralnih i bazičnih spojeva iz kompleksnih matrica pri neutralnome pH.<sup>3,14,15</sup>

Prije same ekstrakcije potrebno je provesti korak kondicioniranja s manje ili više polarnim otapalima poput acetona, metanola ili vode. Također, za ekstrakciju farmaceutika s kiselim funkcionalnim skupinama potrebno je namjestiti pH ispod  $pK_a$  vrijednosti kiselog analita za osiguravanje maksimalnog vezanja na kolonu. Optimiranje pH obično se izvodi zakiseljavanjem sumpornom ili klorovodičnom kiselinom te korištenjem pufera poput amonijeva acetata. Kolone se eluiraju polarnim otapalom, najčešće s tri alikvota metanola. Volumen eluata uparava se u struji dušika, a suhi ostatak analita se otapa u otapalu prikladnom za idući korak kromatografske analize.<sup>14</sup>

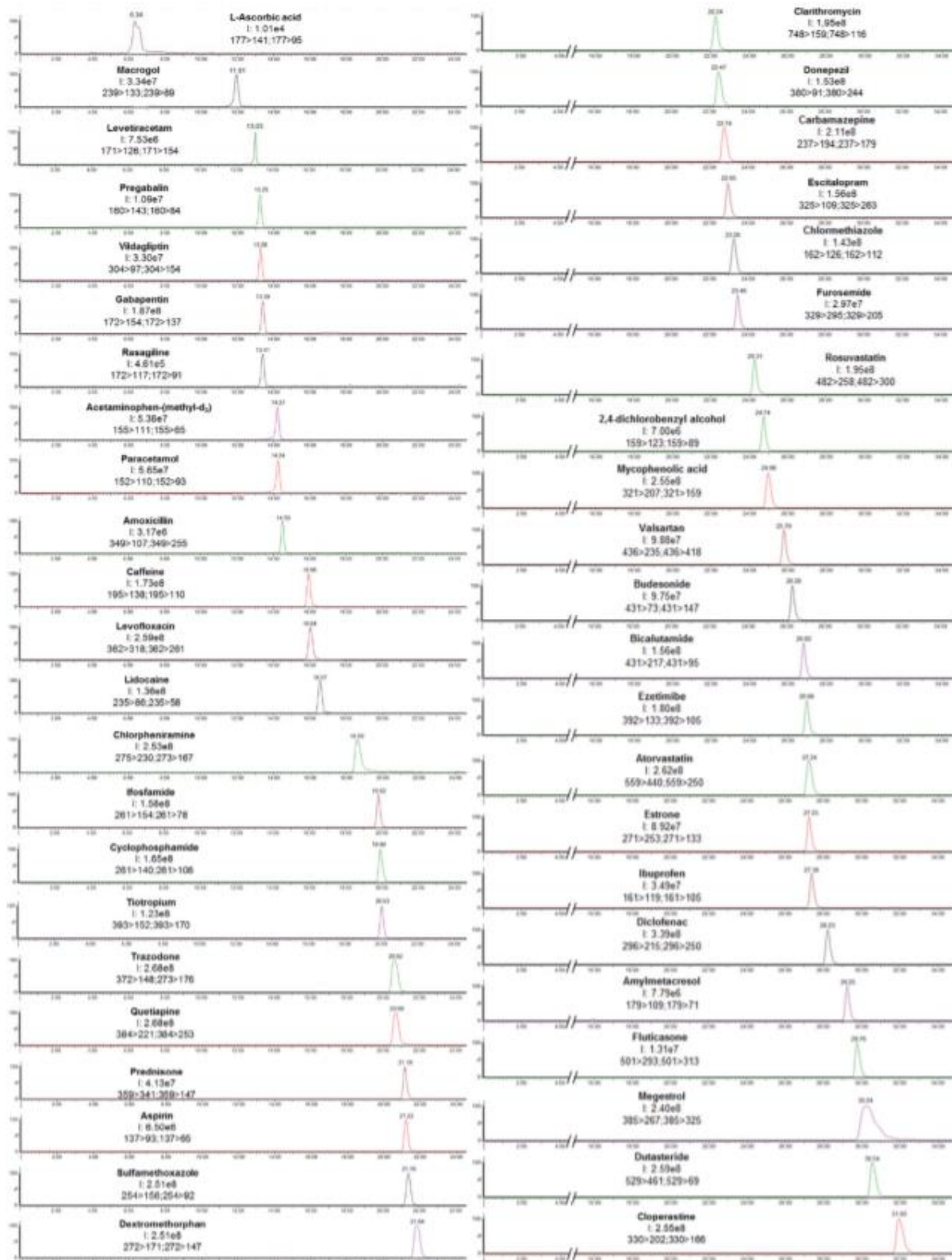
### 2.5.2. LC-MS/MS analiza

Farmaceutici su analizirani pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spojene na trostruki kvadrupolni detektor. Kolone za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti obrnutih faza sadrže nepolarnu stacionarnu fazu, kemijski modificiranog silikagela s  $C_{18}$  alkinim skupinama. Vrijeme zadržavanja spojeva na koloni ovisi o jakosti interakcija sa stacionarnom fazom te o polarnosti mobilne faze. Za uspješnost kromatografskog odvajanja kiselih farmaceutika važan je pH mobilne faze. Pri visokim pH vrijednostima mobilne faze kiseli farmaceutici su u potpunosti disocirani te se slabo zadržavaju na kolonama obrnutih faza. Stoga za vezanje na kolonu i jasan signal, pH mobilne faze trebao bi biti barem dvije pH jedinice niži od  $pK_a$  vrijednosti analita. Za odvajanja neutralnih i kiselih farmaceutika kao mobilna faza primjenjuju se vodene otopine metanola ili acetonitrila zbog niske viskoznosti i visokog tlaka para.<sup>14</sup>

U vezanome sustavu LC-MS/MS elektroraspršenje je najčešća ionizacijska tehnika, a kao analizator trostruki kvadrupol. Za analizu neutralnih farmaceutika odabire se snimanje u pozitivnom načinu rada (ESI+) pri čemu je najintenzivniji signal u spektru masa signal protoniranog iona  $[M + H]^+$ . Farmaceutici poput aspirina ili furosemda, zahvaljujući karboksilnim skupinama daju intenzivniji signal za deprotonirani molekularni ion  $[M - H]^-$  u negativnom načinu rada (ESI-).<sup>14,16</sup>

Nadalje, prvi kvadrupol djeluje kao filter masa propuštajući molekularni ion s točno određenom vrijednošću  $m/z$ , dok se svi ostali ioni s različitim omjerom  $m/z$  uklanjaju. Sudarom iona s inertnim molekulama plina u kolizijskoj ćeliji nastaju ioni produkti koji se potom odjeljuju prema vrijednostima  $m/z$  u trećem kvadrupolu i prenose do detektorske ploče. U analizi farmaceutika promatraju se dva najintenzivnija prijelaza iz prekursor iona u produkt ione. Prvi prijelaz služi za kvantitativne svrhe, a sekundarni kao potvrda prisutnosti ciljnog spoja u uzorku.<sup>12,14,16</sup>

Naposljetku, identifikacija farmaceutika utvrđuje se na temelju vremena zadržavanja spojeva na kromatografskoj koloni i podataka dobivenih MS/MS detekcijom. Primjer LC-MS/MS separacije 44 različitih farmaceutika prikupljenih iz otpadnih voda doma za starije osobe prikazano je na kromatogramima na slici 2. Farmaceutici su identificirani pomoću vremena zadržavanja i dva iona produkta za svaki analit.<sup>16</sup>



Slika 2. LC-MS/MS analiza 44 farmaceutika u otpadnoj vodi<sup>16</sup>

## 2.6. Zaključak

U ovome radu dan je pregled kromatografskih tehnika i metoda primijenjenih u analizi lijekova u uzorcima prikupljenim u okolišu. Kako bi se spriječili negativni učinci lijekova i njihovih metabolita na okoliš i život u njemu potrebno je implementirati kvalitetne metode analize kojima će se uspješno detektirati njihova prisutnosti. Analitička izvedba tekućinske kromatografije spregnute s tandemnom spektrometrijom masa osigurava osjetljivu, selektivnu i poboljšanu identifikaciju farmaceutika. Za uspješno kvantitativno i kvalitativno određivanje potrebno je učinkovito obraditi uzorak prije same kromatografske analize. Efikasno pročišćavanje i ukoncentriravanje analita moguće je tehnikom ekstrakcije na čvrstoj fazi. Navede metode i tehnike analize dobar su primjer određivanja lijekova u uzorcima okoliša što doprinosi njihovom kontinuiranom praćenju u ekosustavima.

---

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. M. Periša, S. Babić, *Kem. Ind.* **65** (2016) 471–482.
  2. A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta, *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007) 1225–1228.
  3. M. Seifrtová., L. Nováková, C. Lino, A. Pena, P. Solich, *Anal. Chim. Acta* **649** (2009) 158–179.
  4. D. M. Pavlović, S. Babić, A.J.M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, *Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 1062–1075.
  5. D. S. Aga, *Phate of Pharmaceuticals in the Environment and in the Water System*, CRC Press, Boca Ranton, 2008, str. 86–90.
  6. V. Petrović-Peroković, D. Kidemet, R. Odžak, D. Parat, I. Primožić, V. Šimunić, *Praktikum iz organske kemije*, Interna skripta, Zavod za organsku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2004, str. 6–7.
  7. W.M.A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Ranton, 2006, str.1,5,8,11,23,32–35.
  8. D. A. Skoog, D. M. West, *Principles of Instrumental Analysis 2<sup>nd</sup> ed*, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1980, str. 667–668, 670, 691,694.
  9. R.E. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Huddersfield, 2003, str.8, 10, 15, 34,41,46–47,51,213.
  10. E. de Hoffmann, V. S. Dewar, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 2013, str.1-3,5,191–193.
  11. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina Fluminensis* **45** (2009) 218–232.
  12. C. Ho, C. Lam, M. Chan, R. Cheung, L. Law, L. Lit, K. Ng, M. Suen, H.Tai, *Clin. Biochem. Rev.* **24** (2003) 3–12.
  13. J. Namiesnik, P. Szefer, *Analytical Measurements in Aquatic Environments*, CRC Press, London, 2010, str.2–3.
  14. M. Petrovic, D. Barcelo, S. Perez, *Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle: Occurrence and Transformation in the Environment*, Elsevier, Amsterdam, 2007, str.82, 138–141, 145–148.
-

15. T. Kosjek, E. Heath, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **30** (2011) 1065-1087.
16. C. Gómez-Canela, T. Sala-Comorera, V. Pueyo, C. Barata, S. Lacorte, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **168** (2019) 55–63.