

# Enantiomerna analiza farmakoloških aktivnih spojeva tekućinskom kromatografijom

---

Dupelj, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:522170>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Matea Dupelj

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ENANTIOMERNA ANALIZA FARMAKOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA TEKUĆINSKOM KROMATOGRFIJOM**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić

Zagreb, 2021.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. lipnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

16. srpnja 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Nives Galić

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Kromatografija.....	2
2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC .....	5
2.3. Lijekovi .....	14
2.4. Kiralna rezolucija .....	16
2.5. Analiza farmaceutika u otpadnim vodama pomoću LC-MS/MS .....	22
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXIX



## § Sažetak

Lijekovi su danas zbog svakodnevne upotrebe iznimno zastupljeni u okolišu, posebno u otpadnim i riječnim vodama. Većina lijekova se proizvodi kao optički čiste tvari dok se mali broj proizvodi kao racemična smjesa. Kako bi se lijekovi mogli sintetizirati kao optički čiste tvari te kvantitativno i kvalitativno odrediti njihova zastupljenost u okolišu potrebno je razviti analitičke metode koje mogu separirati enantiomere. Jedna od danas često korištenih metoda jest kiralna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *chiral high performance liquid chromatography*, cHPLC). Metoda se temelji na odjeljivanju sastojaka smjese između stacionarne (nepokretne) faze, u ovom slučaju malih krutih čestica, najčešće silikagela, i mobilne faze koja se u kolonu ubrizgava pod viskom tlakom. Za identifikaciju odijeljenih sastojaka smjese, tj. kiralnih lijekova koristi se spregnuti sustav kiralne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrije masa, LC-MS.





## § 1. UVOD

Kromatografija, primarno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), koristi se za brzu i efikasnu separaciju i analizu kompleksnih smjesa organskih i anorganskih tvari. Primjenjuje se u farmaciji, biokemiji, biomedicini te analizi hrane, kozmetike i uzoraka iz okoliša. Odiyeljeni sastojci smjese detektiraju se najčešće UV-Vis apsorpcijskom spektrofotometrijom ili nekim drugim detektorom koji mjeri svojstvo analita ili promjenu u svojsvu pokretne faze. Danas se široko primjenjuju i spregnuti sustavi, npr. vezani sustav tekućinska kromatografija – spektrometrija masa (engl. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*, LC-MS) koja igra veliku ulogu u analitici zbog brze separacije sastojaka, velike rezolucije te identifikacije velikog broja različitih spojeva, uključujući lijekove.<sup>1</sup>

Lijekovi se mogu jednostavno opisati kao kemijski spojevi koji utječu na organizam i njegove procese.<sup>2</sup> Lijekovi se danas prodaju kao racemati i kao optički čisti enantiomeri. Pojedine enantiomerne forme mogu imati značajno različita farmakodinamička i farmakokinetička svojstva. Zbog toga je potrebno razviti metode kiralne separacije i analize racemičnih lijekova u farmaceutskoj industriji i medicini kako bi se eliminirali nepoželjni efekti pojedinih enantiomernih formi.<sup>3</sup> Klasične kromatografske metode ne mogu razlikovati enantiomere zbog identičnih fizikalnih i kemijskih svojstava te su potrebne kiralne analitičke tehnike.<sup>4</sup> Od svih kromatografskih tehnika, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je prepoznata kao brza, moćna i efikasna tehnika za analizu i preparaciju optički čistih enantiomera.<sup>5</sup>

Danas se velika pažnja posvećuje problemu ogromnih količina lijekova i kozmetičkih produkata u okolišu. Naime, lijekovi i njihovi metaboliti na kraju završavaju u kanalizaciji. Zbog otpadnih voda dolazi do akumulacije lijekova u okolišu budući da tehnologija pročišćavanja nije namijenjena za pročišćavanje malih molekula prisutnih u niskoj koncentraciji.<sup>6</sup>

U ovom radu opisana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti te njezine različite izvedbe i primjene. Također su opisani lijekovi, s naglaskom na kiralnim lijekovima i različitim djelovanjima pojedinih enantiomernih formi. Na kraju je opisana kiralna tekućinska kromatografija kao bitna metoda separacije enantiomera te primjena LC-MS metode u analizi kiralnih lijekova u otpadnim vodama i rijekama.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kromatografija

Kromatografija je analitička, separacijska metoda kod koje se komponente uzorka raspodjeljuju između dvije faze, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne).<sup>1</sup> Stacionarna faza je najčešće čvrsta tvar ili tekućina nanešena na nosač, a nalazi se u koloni ili na ravnoj plohi. Mobilna faza može biti tekućina, plin ili superkritični fluid, a prolazi kroz ili uzduž nepokretne faze te sa sobom nosi sastojke smjese koji se odjeljuju.<sup>7</sup> Tijekom kromatografskog procesa sastojci smjese raspodjeljuju se između te dvije faze uz uspostavljanje ravnoteže. Konstanta ravnoteže, u ovom slučaju razdjeljenja, za pojedini sastojak ovisi o topljivosti tog sastojka u mobilnoj fazi (tekućini ili fluidu) te o afinitetu prema stacionarnoj fazi, što znači da se komponente odjeljuju jedna od druge na temelju relativnog afiniteta prema tim fazama. Različite metode kromatografije mogu se klasificirati na temelju agregatnog stanja pokretne faze, procesa koji dominiraju pri odvajanju, izvedbenim tehnikama, odnosno izvodi li se odjeljivanje na koloni ili ravnoj plohi. Postoje tri vrste kromatografija ovisno o agregatnom stanju pokretne faze: plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC), tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) te fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC).<sup>1</sup> Plinska i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima izvode se u koloni dok se tekućinska kromatografija može izvoditi u koloni i na ravnoj plohi. U plinskoj kromatografiji uzorak se u injektoru prevodi u plinsku fazu i uvodi u kolonu.<sup>7</sup> Upravo zbog toga, plinska kromatografija ima ograničenu primjenu na tvari (organske i anorganske) čiji je tlak para veći od 10 Pa. To pokriva otprilike 20% organskih tvari koje se mogu analizirati plinskom kromatografijom, a da se pri tome kemijski ne promijene. Ostalih 80% može se analizirati tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, HPLC.<sup>1</sup>

Kromatografskim metodama tvari se mogu analizirati kvalitativno i kvantitativno. Kvalitativna analiza temelji se na mjerenju vremena zadržavanja sastojka (vrijeme koje prođe od nanošenja uzorka na kolonu do detektiranja određenog sastojka na detektoru) i usporedbom s vremenima zadržavanja standarda. Takva analiza je ograničena, posebno ako se radi o analizi složenih smjesa. Međutim, danas se kao detektori koriste infracrveni spektrofotometar i znatno češće spektrometar masa, a takve spregnute tehnike mogu

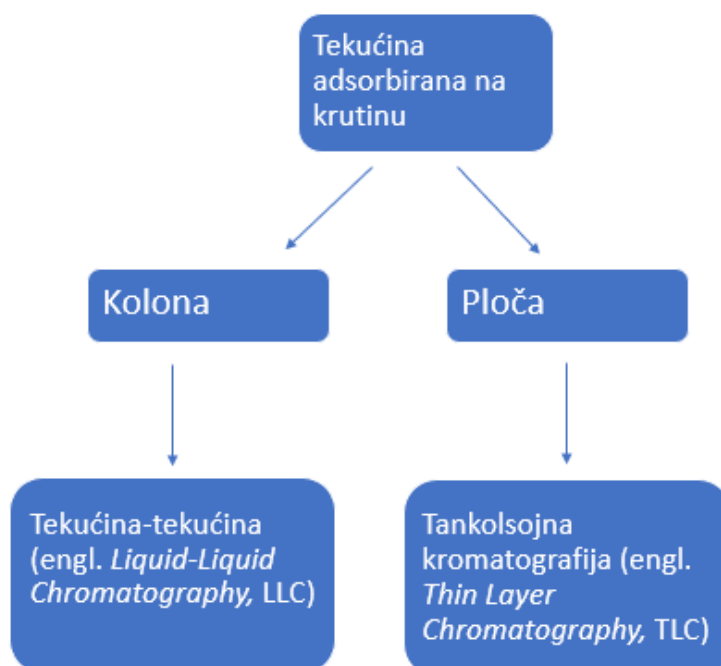
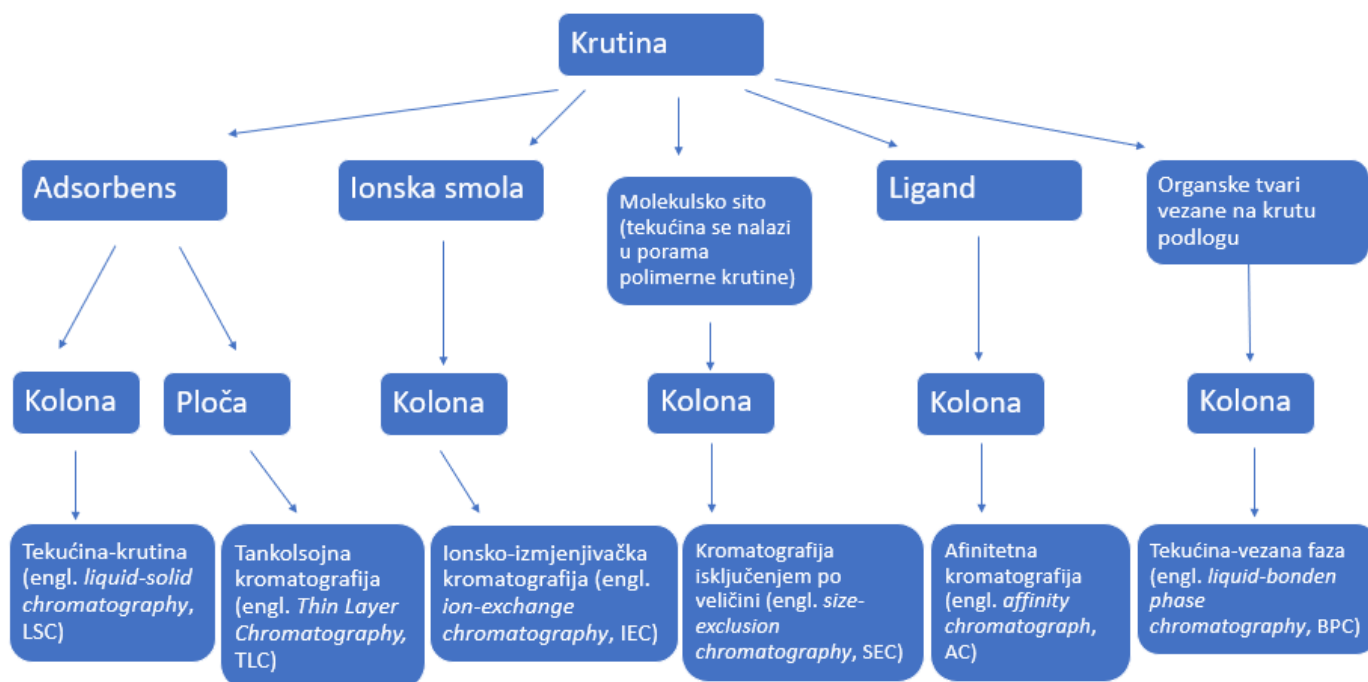
identificirati veliki broja različitih tvari. Kvantitativna analiza temelji se na usporedbi visine pika ili površine ispod pika određenog sastojka s visinom (površinom) pika standarda. Ukoliko su uvjeti zadovoljavajući i dobro kontrolirani, oba parametra su linearno proporcionalna koncentraciji tvari.<sup>7</sup>

### 2.1.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je vrsta kromatografije kod koje je mobilna faza tekućina. Klasična tekućinska kromatografija izvodi se u staklenim kolonama promjera od 10 do 50 mm te dužine od 50 do 500 cm. Stacionarna faza sastoji se od čvrstih čestica promjera od 150 do 200  $\mu\text{m}$ .<sup>7</sup> Uzorak se nanosi na vrh kolone te se ispiru dodatkom otapala, tj. mobilne faze. Sastojci smjese i pokretna faza kroz kolonu putuju pod utjecajem gravitacije. Na kraju kolone skupljaju se frakcije, otapalo (mobilna faza) se ukloni, najčešće isparavanjem, a zaostala krutina se analizira.<sup>8</sup> Protok u najboljem slučaju iznosi par desetina mililitra po minuti te je takva analiza dugotrajna.<sup>7</sup>

Sredinom 40-ih godina 20. stoljeća razvijena je papirna kromatografija. Kolonu je u ovom slučaju zamijenio papir, odnosno ravna ploha na koju je nanosena stacionarna faza. Uzorak se nanosi na dno pločice te se ona stavlja u posudu s mobilnom fazom. Sastojci smjese, zajedno s otapalom putuju prema gore, suprotno od smjera gravitacije zbog utjecaja kapilarne sile. Prednost takve kromatografije u odnosu na kolonsku jest to što je je praktičnija, jeftinija, može se više uzoraka razdvajati i analizirati istovremeno te je detekcija jednostavnija (kolorimetrijska).<sup>8</sup>

Kasnih 60-ih godina 20. stoljeća razvijena je nova tehnologija za izradu krutih čestica promjera od 5 do 10  $\mu\text{m}$ .<sup>7</sup> To je bilo bitno jer je protok mobilne faze povezan s veličinom čestica. Međutim upotreba tako malih čestica zahtijeva i upotrebu visokog tlaka kako bi se mobilna faza mogla kretati kroz kolonu.<sup>9</sup> Tehnika tekućinska kromatografija u kojoj je veličina čestica nepokretne faze od 5 do 10  $\mu\text{m}$  naziva se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC. Klasična tekućinska kromatografija danas se koristi u preparativne svrhe.<sup>7</sup> Na slikama 1 i 2 prikazana je klasifikacija tekućinske kromatografije prema vrsti stacionarne faze i načinu izvođenja.

Slika 1. Klasifikacija tekućinske kromatografije s tekućom nepokretnom fazom.<sup>1,7</sup>Slika 2. Klasifikacija tekućinske kromatografije s krutinom kao stacionarnom fazom.<sup>1,7</sup>

## 2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti danas je jedna od najkorisnijih i najupotrebljivijih analitičkih tehnika za razdavanje sastojaka smjese.<sup>7</sup> Usporedbom s ostalim analitičkim metodama ima univerzalnu primjenu (vrlo mali broj uzoraka nije moguće analizirati tom tehnikom), vrlo veliku preciznost (do  $\pm 0,5\%$ ), a komercijalna dostupnost velikog broja raznovrsnih instrumenata i kolona omogućava analizu velikog broja različitih spojeva. Zbog gore navedenih razloga velika većina laboratorija opremljena je s jednim ili više instrumenata za HPLC.<sup>9</sup> HPLC se najčešće primjenjuje za separaciju i kvantifikaciju pojedinih sastojaka smjese, za analizu tragova nečistoća u čistim tvarima te za izolaciju čistih tvari za sintetičke ili identifikacijske svrhe.<sup>1</sup> Na slici 3 prikazan je tipičan HPLC uređaj.



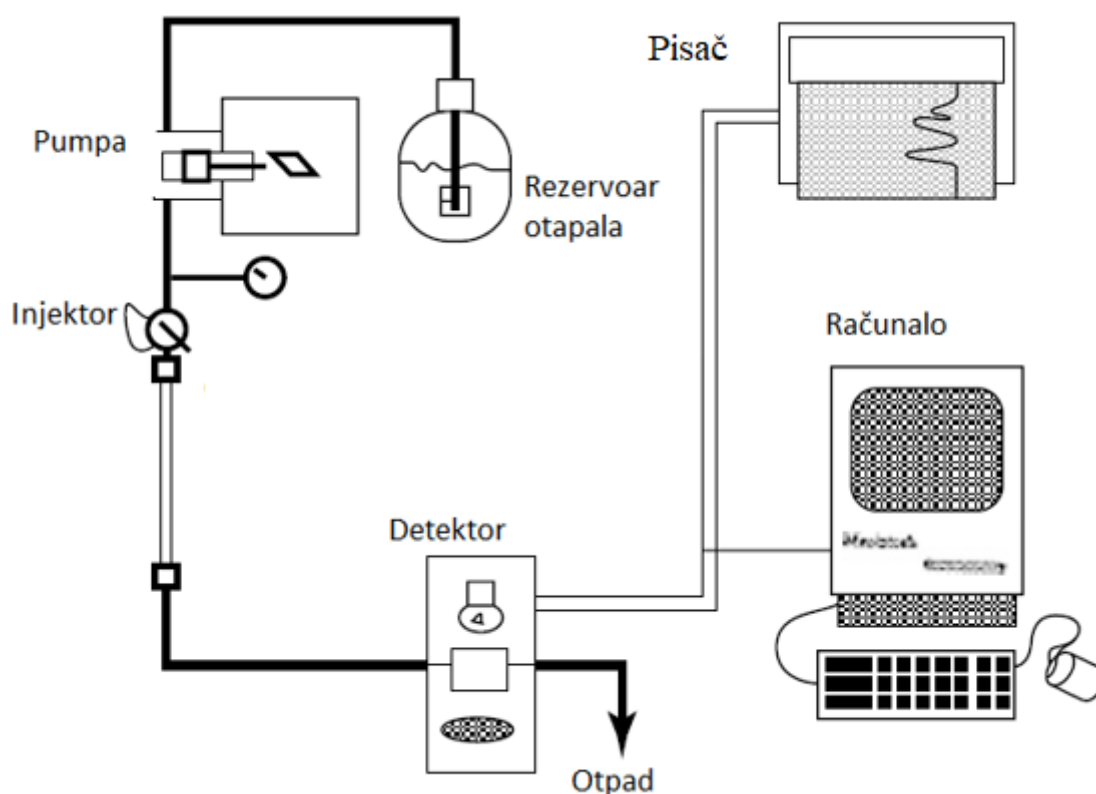
Slika 3. HPLC uređaj<sup>10</sup>

Plinska kromatografija je također tehnika visoke djelotvornosti, međutim najveća razlika u odnosu na HPLC jest to što se plinskom kromatografijom mogu analizirati samo tvari koje su lako hlapljive ili koje se mogu prevesti u plinsku fazu bez da se kemijski promijene, dok se HPLC-om mogu analizirati tvari koji se termički nestabilne i teško hlapljive.<sup>7,11</sup> Difuzijski koeficijent tvari u mobilnoj fazi je veći kod GC nego kod HPLC zbog veće viskoznosti tekućine što rezultira time da je ona sporija tehnika odjeljivanja. Međutim, stlačivost mobilne faze je kod tekućinske kromatografije zanemarivo mala, dok kod plinske to nije slučaj. To znači da je protok mobilne faze kod tekućinske kromatografije stalan kroz cijelu kolonu što je izuzetno bitno za postizanje optimalnih uvjeta odjeljivanja kroz cijelu kolonu.<sup>11</sup>

### *2.2.1. Instrumenti i postupak*

Stacionarna faza u kolonama za HPLC sastoji se od vrlo malih čestica, najčešće silikagela, promjera od 3 do 10  $\mu\text{m}$ . Da bi se postigla zadovoljavajuća brzina, mobilna faza se mora injektirati u kolonu pod velikim tlakom od nekoliko stotina atmosfera. Kao posljedica tih tlakova, instrumenti za HPLC su puno sofisticiraniji, a time i skuplji od onih koji se koriste kod drugih vrsta kromatografije.<sup>7</sup>

Osnovni dijelovi HPLC instrumenta su: rezervoar otapala, pumpa, injektor, kolona, detektor, pisac i računalo (Slika 4). Najčešće se još koriste dodatna otapala, ventili, predkolone te dodatni filteri.<sup>1</sup>



Slika 4. Shematski prikaz osnovnih dijelova HPLC uređaja.<sup>1</sup>

Za razliku od GC gdje je mobilna faza (MP) inertna, kod HPLC se ona aktivno natječe s stacionarnom fazom za sastojke smjese. S obzirom da do separacije dolazi između tih dviju faza, sastav mobilne faze je veoma važan te često zahtijeva smjesu tekućina.<sup>1</sup> Moderni HPLC uređaj ima jedan ili više (najčešće do 4) staklenih rezervoara ili rezervoara od nehrđajućeg čelika od kojih svaki može primiti najmanje 500 mL otapala. Više rezervoara se upotrebljava kako bi se mogla pripremiti mobilna faza koja se sastoji od smjese različitih tekućina. Volumeni pojedinih tekućina reguliraju se odgovarajućim ventilima. Pri izokratnom eluiranju sastav MP ostaje isti tijekom kromatografskog procesa, dok se kod gradijentnog eluiranja sastav MP mijenja kontinuirano ili korak po korak. To se postiže korištenjem ventila koji propuštaju tekućinu pri različitim brzinama.<sup>1,7</sup> Kvaliteta i čistoća MP je izrazito važna, osobito kod tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa. Ftalati i druge nečistoće često uzrokuju probleme te je mobilnu fazu prije upotrebe potrebno profilirati preko filter papira od 0,2 do 0,4  $\mu\text{m}$ . Problem predstavljaju i otopljeni plinovi jer oni stvaraju mjehuriće u pumpi i kapilarama te ih je potrebno ukloniti, na primjer zagrijavanjem ili upotrebom mjehurića inertnog plina netopljivog u vodi (*sparing*).<sup>7,8</sup> Otapala koja se koriste



najčešće su: voda, vodene otopine pufera, acetonitril, tetrahidrofur, metanol, kloroform, heksan, metilklorid te suspenzije tekućina koje se međusobno ne miješaju.<sup>1</sup>

Pripremljena mobilna faza dostavlja se na početak kolone pomoću visokotlačne pumpe.<sup>1</sup> Takva pumpa mora izdržati i generirati tlakove od 350 pa sve do 500 bara kako bi preciznost i točnost protoka MP bila zadovoljavajuća za bilo koju odabranu brzinu. Brzine pokretne faze su najčešće u rasponu od 0,1 mL/min do 10 mL/min. Pumpa također treba biti otporna na koroziju (upotrebljavaju se različita otapala), praktična za korištenje te ostvariti ujednačeni pritisak bez promjena.<sup>7,11</sup> Danas se najčešće koriste dva tipa pumpi: HPLC pumpa tipa šprice (engl. *screw-driven syringe pump*) i povratna pumpa (engl. *reciprocating pump*). Prvi tip proizvodi ujednačeni protok koji je dobro kontroliran, međutim ima mali kapacitet (250 mL) i nije pogodan kada se moraju mijenjati otapala. Drugi tip se češće upotrebljava, a sastoji se od malog cilindra koji se puni i prazni pomoću klipa. Zbog takvog mehanizma pumpanja dolazi do pojave pulsa koji se mora prigušiti. Prednost takve pumpe su veliki tlakovi, mogućnost gradijentnog eluiranja i konstantni protok. U upotrebi su i pneumatske pumpe koje koriste komprimirani plin za postizanje velikog tlaka. One su jeftine, jednostavne, ograničenog kapaciteta, a protok ovisi o viskoznosti MP te nisu pogodne za gradijentno eluiranje.<sup>7</sup>

Ubrizgivač, tj. injektor (injektorski ventil) služi za uvođenje uzorka u kolonu. Najčešće korištena metoda ubrizgavanja temelji se na petljama za uzorak (engl. *sampling loops*). Petlje su često sastavni dio uređaja za tekućinsku kromatografiju, promjenljivog su volumena pa je moguće mijenjati veličinu uzorka od 5 do 500  $\mu\text{L}$ . Dok se petlje puni uzorkom, MP se pumpa kroz drugi otvor. Kada se taj otvor otvori prema petlji s uzorkom, uzorak se ispere s petlje mobilnom fazom i uvede u kolonu. Uobičajeni ubrizgani volumen iznosi od 1 do 100  $\mu\text{L}$ .<sup>1,7</sup> Sam uzorak se najčešće priprema tako da se 10  $\mu\text{g}$  uzorka otopi u prikladnom otapalu tako da masena koncentracija iznosi od 0,1 do 100 mg/mL.<sup>1</sup>

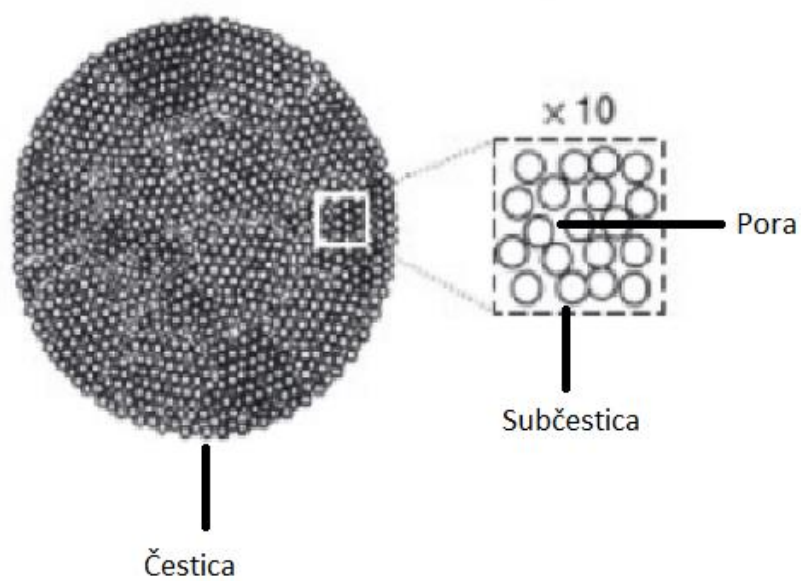
Kolone za HPLC (Slika 5) se najčešće rade od nehrđajućeg čelika, iako se upotrebljavaju i staklene kolone (kada se radi pri nižim tlakovima). Najčešće su duge od 10 do 30 cm, promjera od 4 do 10 mm. Kolona je napunjena s malim, sfernim česticama veličine od 5 do 10  $\mu\text{m}$ . Te su čestice najčešće porozna silika koja se dobiva aglomeracijom submikronskih silika čestica pod uvjetima u kojima nastaju veće uniformne čestice željene veličine (Slika 6).<sup>7,9</sup> Svaka čestica ima pore, najčešće veličine 10 nm. U unutrašnjosti svake pore nalazi se stacionarna faza (ukoliko se radi o razdjelnoj kromatografiji, Slika 7).<sup>9</sup>

Razlučivanje kolone se poboljšava sa smanjenjem veličine čestica. Danas najmanja veličina čestica iznosi 2  $\mu\text{m}$ . Smanjenje veličine čestica uvjetuje primjenu još višeg tlaka kako bi brzina pokretne faze ostala ista. Ta tehnika zove se tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultrahigh performance liquid chromatography*, UHPLC), a predstavlja limit današnje tehnologije.<sup>1</sup>

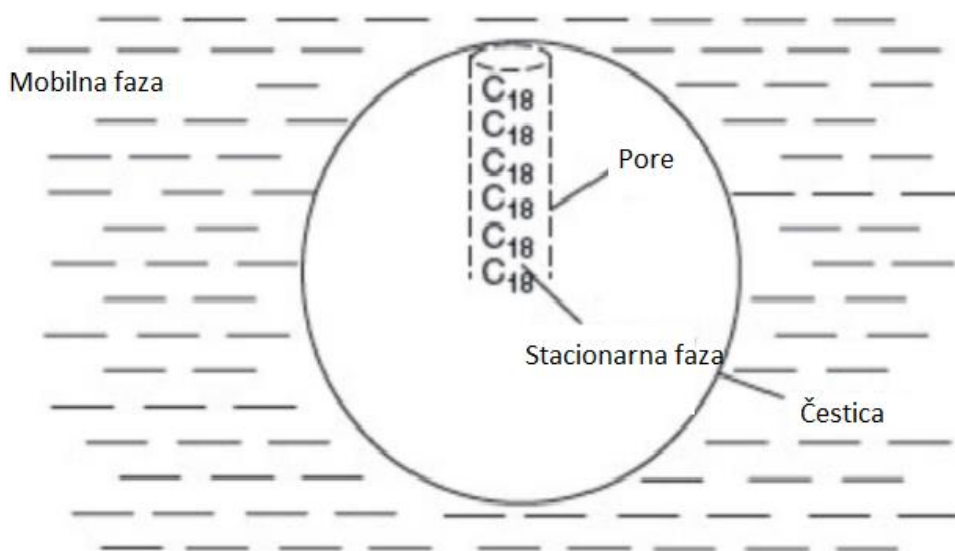
Danas su u upotrebi i mikrokolone koje su duge od 3 do 7,5 cm, promjera od 1 do 4,6 mm i čestice veličine od 3 do 5  $\mu\text{m}$ . Takve kolone koriste minimalno otapala što je jako bitno jer su visoko čista otapala skupa za upotrebu i odlaganje.<sup>7</sup> Kolone koje su duge od 30 do 50 mm se koriste u bioanalizi. Najnovija tehnologija jest izrada mikro i nano kapilara veličine od 0,05 do 0,5 mm koje se spoje zajedno u kolonu. Takve kolone imaju izrazito veliku efikasnost te se često koriste kod LC-MS metoda pri analizi proteina i bioloških molekula.<sup>8</sup> Često se ispred analitičke kolone stavlja predkolona, zaštitna kolona (engl. *guard column*) koja uklanja nečistoće iz otapala te tako produžuje vijek trajanja analitičke kolone.<sup>7</sup>



Slika 5. Kolona za HPLC<sup>12</sup>



Slika 6. Čestica kojom se puni kolona za tekućinsku kromatografiju. Ona se sastoji od subčestica između kojih se nalaze pore.<sup>9</sup>



Slika 7. Shema unutrašnjosti kolone za tekućinsku kromatografiju.<sup>9</sup>

Detektor mjeri neko fizičko svojstvo sastojaka smjese koji su se odijelili na koloni i prevodi ga u električni signal. Odziv detektora može biti proporcionalan koncentraciji sastojka ili može biti osjetljiv na maseni protok.<sup>8</sup> Detektor mora imati veliku osjetljivost i predvidljiv odgovor, mora biti neosjetljiv na promjene temperature, ne smije pridonositi pojavi dodatnih pikova na kromatogramu, mora biti jednostavan za korištenje i mora davati odgovor koji se povećava linearno s količinom tvari. Trenutačno ne postoji niti jedan detektor koji bi zadovoljio sve gore navedene uvjete. Kod HPLC-a detektor se smješta odmah iza kolone kako bi se smanjilo širenje pika. Eluat (mobilna faza zajedno sa sastojkom smjese) se dovodi u detektorsku ćeliju, a nakon detekcije mobilna faza se odvodi u otpad.<sup>9</sup> Najčešće korišteni detektori su oni koji se temelje na apsorpciji vidljivog i ultraljubičastog zračenja. To su fotometri i spektrofotometri.<sup>7</sup> Koriste se zato jer puno organskih spojeva apsorbira u području od 190 do 700 nm. Tvari koje ne apsorbiraju zračenje mogu se prikladnom reakcijom prevesti u kromofore i analizirati tekućinskom kromatografijom uz UV/Vis detektor. U upotrebi su tri vrste UV/VIS detektora. Prvi je najjednostavniji, radi na samo jednoj valnoj duljini od 254 ili 280 nm, jer puno organskih molekula apsorbira u tom području. Sljedeći tip detektora može snimati pri odabranim valnim duljinama dok treći tip detektora, fotodiodni detektor istovremeno snima spektar pri svim valnim duljinama. Često se koristi i detektor koji mjeri promjenu indeksa loma otapala zbog prisutnosti analita. To je univerzalni detektor što znači da reagira na skoro sve analite. Koriste se još i detektori koji se temelje na fluorescenciji, provodnosti, lomu svijetlosti, optičkoj aktivnosti, fotoionizaciji i tako dalje.<sup>1,7</sup>

### 2.2.2. Adsorpcijska kromatografija

Adsorpcijska kromatografija je najstarija metoda tekućinske kromatografije. Tako se zove zato što se separacija temelji na različitoj adsorpciji sastojaka na stacionarnu fazu. Stacionarna faza je polarna te je najčešće napravljena od silikagela ili aloksa (aluminijevog oksida). Silikagel se preferira jer ima veći kapacitet i veći raspon upotrebljivih formi.<sup>1,7</sup> Mobilna faza je nepolarna ili slabo polarna te se najčešće sastoji od nižih alkana pomiješanih s kloroformom ili izopropanolom. U pravilu se polarnije molekule jače adsorbiraju na stacionarnu fazu te se time eluiraju iz kolone nakon nepolarnih molekula.<sup>7</sup> S obzirom da se ta vrsta kromatografije u početku najviše koristila dobila je ime kromatografija normalnih faza, u kojoj je nepokretna faza polarnija od pokretne. Danas se najčešće koristi za separaciju nepolarnih, u vodi netopljivih spojeva s molarnim masama manjim od 5000. Prednost ove

kromatografije jest to što se mogu separirati izomeri iz njihove smjese. Usprkos tome, ona se danas ne upotrebljava često.<sup>1,7</sup>

### 2.2.3. Razdjelna kromatografija i kromatografija obrnutih faza

Razdjelna kromatografija je najupotrebljivija od svih vrsta tekućinskih kromatografija visoke djelotvornosti. Ona se može podijeliti na specifične metode obzirom na agregatna stanja pojedinih faza: tekućina-tekućina (engl. *liquid-liquid chromatography*, LLC) i tekućina-vezana faza (engl. *liquid-bonden phase chromatography*, BPC) u kojoj selektivna tukućina vezana na kruti nosač.<sup>1</sup> U početku se koristila isključivo LLC tehnika kod koje se selektivna tekućina adsorbirana na kruti nosač. Međutim, u toj kromatografiji selektivna tekućina podložna je fizičkim i kemijskim promjenama, odnosno uklanja se sa nosača djelovanjem mobilne faze te se ne može provoditi gradijentno eluiranje. Zato se danas najviše upotrebljava tehnika BPC kod koje je stacionarna faza kovalentno vezana na kruti nosač, a time i puno stabilnija.<sup>1,7</sup> Kruti nosač je najčešće silikagel na koji su vezane razne funkcionalne skupine poput amino i cijano skupine te alkili (metil, oktamil, oktadekanil) ili fenili.<sup>1</sup>

Danas se u oko tri četvrtine svih odjeljivanja HPLC-om koristi BPC sa nepolarnom stacionarnom fazom i polarnom mobilnom fazom. Takav tip kromatografije naziva se kromatografija obrnutih faza (engl. *reversed-phase chromatography*, RPC), odnosno kromatografija u kojoj je stacionarna faza manje polarna od mobilne faze. Stacionarna faza je najčešće ugljikohidrat ili modificiran nepolaran silikagel, dok se kao mobilna faza koristi voda, metanol, tetrahidrofuran ili njihova smjesa. Interakcije između analita i mobilne faze su najvažnije kod ove metode jer su puno jače nego Van der Waalsove interakcije između analita i stacionarne faze. Polarne molekule slabije se zadržavaju na nepokretnoj fazi od nepolarnih te prve eluiraju iz smjese.<sup>1,7,8</sup> Prednost ove metode jest to što je efikasnija od drugih te su dostupne kolone različitih dimenzija, veličina čestica, vrsta stacionarnih faza itd. Također otapala koja se koriste su manje zapaljiva i toksična i više kompatibilna s UV detekcijom ispod 230 nm.<sup>9</sup> Njezina primjena je raznolika poput analize antibiotka, proteina, lipida, aditiva, antioksidansa, sulfaktanata, umjetnih boja, pesticida, droga, otrova, alkohola, žučnih soli, urina i tako dalje.<sup>7</sup>

#### 2.2.4. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija (IEC)

Stacionarna faza u ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji (engl. *ion-exchange chromatography*, IEC) je sintetski modificirana smola, u vodi netopljiv polimer velike molekulske mase. Polimer je najčešće polistiren-divinilbenzen dok se rjeđe koristi silikagel. Na takve polimere kemijski se vežu nabijene funkcionalne skupine. Za analizu aniona koriste se anionski izmjenjivači koji na smoli imaju vezane kationske funkcionalne skupine, najčešće amin (primarni za jaku bazu, a sekundarni i tercijarni za slabu). Za analizu kationa koriste se kationski izmjenjivači koji na smoli imaju vezane negativno nabijene funkcionalne skupine, sulfonsku kiselinu za jaku kiseline i karboksilne kiseline za slabu kiselinu.<sup>1,7</sup> Odjeljivanje se temelji na izmjeni iona iz uzorka (mobilne faze) s ionima vezanim na stacionarnu fazu. Ovisno o naboju i jačini vezanja na stacionarnu fazu ovisi retencijsko vrijeme pojedinog iona.<sup>7</sup> Ioni koji se jako vežu zadnji se eluiraju iz kolone promjenom ionske jakosti ili pH mobilne faze. Ovakav tip kromatografije najčešće se upotrebljava za odjeljivanje anorganskih iona, topljivih organskih kiselina i baza malih molekulskih masa te ionskih kelata i organometalnih spojeva.<sup>8</sup>

#### 2.2.5. Kromatografija isključenjem po veličini (SEC)

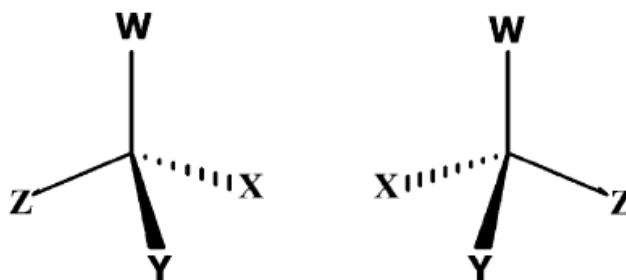
Kromatografija isključenjem po veličini (engl. *size-exclusion chromatography*, SEC) je metoda tekućinske kromatografije u kojoj se sastojci smjese odjeljuju na temelju razlike u veličini. Stacionarna faza je porozni silikagel ili neki drugi polimer poput poliakrilamida ili dekstrana. Tipične veličine pora variraju od 6 do 100 nm, ovisno o stacionarnoj fazi i u nekim slučajevima koncentraciji korištenog polimera. Ako se razdvajaju analiti topljivi u vodi metoda se naziva filtracija na gelu. Gel-propusnom kromatografijom analiziraju se spojevi slabo topljivi u vodi. Molekule koje su prevelike da bi ušle u pore najkraće putuju kroz kolonu i prve izlaze s kolone. S druge strane, manje molekule ulaze u pore, duže putuju i kasnije izlaze s kolone, odnosno odgovarajući kromatografski pikovi se kasnije pojavljuju u kromatogramu. Osim za odjeljivanje tvari, ova tehnika se koristi i za određivanje molekulske mase tvari. Mjerenjem vremena zadržavanja standarada konstruira se baždarni dijagram (ovisnost molekulske mase standarada o vremenu zadržavanja) te se iz njega očita vrijednost molekulske mase uzorka.<sup>1,7</sup>

## 2.3. Lijekovi

Lijek je prema definiciji iz Zakona o lijekovima svaka tvar ili kombinacija tvari sa svojstvima liječenja ili sprječavanja bolesti kod ljudi ili svaka tvar ili kombinacija tvari koja se može upotrijebiti ili primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za postavljanje medicinske dijagnoze. Lijekovi mogu biti ljudskog podrijetla (proizvodi iz ljuske krvi), životinjskog podrijetla (mikroorganizmi, toksini, dijelovi organa), biljnog podrijetla (dijelovi biljaka, ekstrakti) te kemijskog podrijetla (sintetski ili prirodni kemijski spojevi).<sup>13</sup>

### 2.3.1. Kiralni lijekovi

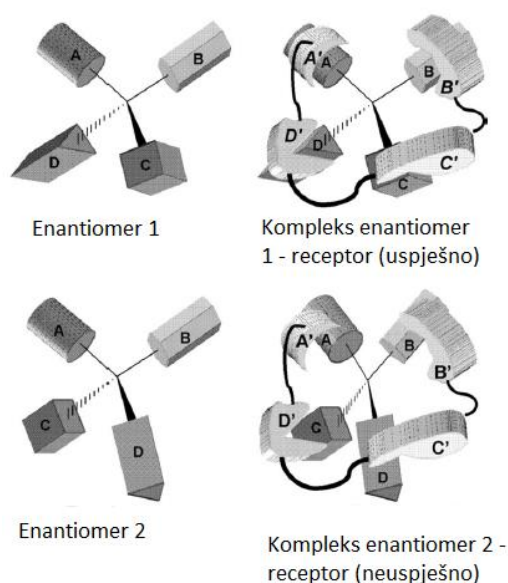
Izomeri su molekule koje imaju istu molekulsku formulu, ali različito povezane atome (konstitucijski) ili različit razmještaj atoma u prostoru (stereoizomeri). Stereoizomeri se dalje dijele na konfiguracijske i konformacijske. U konfiguracijske spadaju kiralni lijekovi. Kiralna molekula ima asimetrični atom (kiralni centar), najčešće ugljik iako može biti sumpor, fosfor i dušik, koji na sebe ima vezane različite supstituente.<sup>3,14</sup> Ona nema unutarnju ravninu simetrije te se ne može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom.<sup>15</sup> Takve molekule imaju više mogućih razmještaja atoma u prostoru koji se međusobno ne mogu preklopiti (Slika 8). Dijastereomeri su stereoizomeri koji imaju više kiralnih centara te oni nisu međusobno zrcalni. S druge strane enantiomeri su stereoizomeri koji jesu zrcalni. Enantiomeri imaju jednaka fizikalna i kemijska svojstva, osim u reakciji s kiralnim molekulama. Jedino po čemu se razlikuju jest smjer zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti, ali ne i iznos.<sup>3,14</sup> Optička aktivnost utvrđuje se pomoću polarimetra ili cirkularnog dikroizma. Prostorni raspored se najčešće određuje nuklearnom magnetskom rezonancom ili difrakcijom X-zraka.<sup>3</sup>



Slika 8. Kiralna molekula s dva različita prostorna rasporeda atoma koji se međusobno ne mogu preklopiti. Sva četiri supstituenta su različita.<sup>8</sup>

Biološki sustavi su također kiralni sustavi, oni raspoznaju dva enantiomera kao dvije različite tvari. Svi proteini, enzimi, nukleozidi i ugljikohidrati su kiralne molekule. Sekundarne strukture proteina uključuju desnu zavojnicu. Također je i konfiguracija DNA desna zavojnica. Međutim, biološke molekule za razliku od sintetskih kiralnih tvari koje su najčešće racemat (udio oba enantiomera je jednak), najčešće sadrže samo jednu enantiomernu formu. Na primjer, sve aminokiseline su L-izomeri, a svi šećeri su u D-formi. Upravo zbog tog svojstva biološkog sustava da se ponaša kao kiralni selektor racemične smjese, zasebni enantiomeri najčešće poprimaju drugačija biokemijska i fizičko-kemijska svojstva, što znači da biološki sustav drugačije metabolizira svaki pojedinačni enantiomer, odnosno različiti enantiomeri imaju različite farmakološke aktivnosti.<sup>3,14</sup> Na primjer, jedna enantiomerna forma može imati terapijske učinke, dok druga može imati toksičan učinak. Većina lijekova spada u kiralne molekule te njihove enantiomernе forme drugačije reagiraju s kiralnim molekulama koje se nalaze u živim sustavima. Svaki enantiomer se prema tome razlikuje po svojim farmakološkim, farmokinetičkim, metaboličkim, toksičnim, imunološkim svojstvima.<sup>3</sup>

Na Slici 9 prikazano je kako se enantiomeri određenog lijeka vežu za receptor. Enantiomer 1 uspješno se veže na receptor jer se postiže prostorna i katalitička komplementarnost. Enantiomer 2 ne može ostvariti uspješnu interakciju zato što se nikako ne može postići prostorna komplementarnost bez obzira kako se molekula enantiomera rotira u prostoru.<sup>3,14</sup>



Slika 9. Prikaz dva enantiomera iste tvari u reakciji s istim receptorom.<sup>14</sup>



Devedesetih godina 20. stoljeća počela se obraćati pozornost na takvu prirodu bioloških sustava i lijekova te na potencijalnu toksičnost pojedinog enantiomera. Zbog toga su se trebale razviti odgovarajuće metode analize i provesti studije toksičnosti pojedinih enantiomera i njihov utjecaj na biološke sustave. Zbog mogućeg štetnog djelovanja pojedinog enantiomera smanjena je proizvodnja i općenito sinteza lijekova kao racemičnih smjesa. Danas u komercijalnoj upotrebi dominiraju akiralni lijekovi ili lijekovi koji su proizvedeni u samo jednoj enantiomernoj formi.<sup>14</sup> Problem upotrebe kiralnih lijekova jest to što optički čisti enantiomer u *in vivo* sustavu djelovanjem enzima može podlijeći racemizaciji pa nastaje racemična smjesa koja može biti toksična.<sup>3</sup> Još uvijek se za neke bolesti koriste racemične smjese lijekova zato što je učinkovitost racemata jednaka ili veća nego kod zasebnog enantiomera.<sup>16</sup> Danas se kiralni lijekovi sintetiziraju i proizvode na dva načina. Prvi je takozvani „chiral switch“ (promjena kiralnosti), a drugi način je *de novo* sinteza optički čistih enantiomera. Prvi način podrazumijeva proizvodnju optički čistog enantiomera iz već poznatog racemičnog lijeka ili smjese diastereomera po čemu je ta metoda i dobila ime. Za drugu metodu, tj. za razvoj novih lijekova u optički čistoj formi koriste se tri načina. Prvi je upotreba prirodnih tvari koje su same po sebi optički čiste, drugi je da se upotrebljava stereoselektivna sinteza, a treći način je da se sintetizira racemična smjesa koja se onda razdvoji postupkom koji se naziva kiralna rezolucija.<sup>16</sup> Upravo zbog današnjih načina proizvodnje lijekova je bilo potrebno razviti tehnike odjeljivanja enantiomera.

#### 2.4. Kiralna rezolucija

Kiralna rezolucija (kiralna separacija) je postupak koji se koristi za razdvajanje dva enantiomera iz racemične smjese u farmaceutskoj industriji i kliničkoj analizi. Danas u industriji postoje dva glavna pristupa kiralne rezolucije: klasične metode i moderna tehnologija. Od klasičnih metoda najviše se koristi metoda separacije pomoći diastereomerne soli. Metoda se bazira na reakciji racemične smjese s optički čistom tvari. Tako nastaju dva diastereomera koja imaju različita fizikalna i kemijska svojstva te se lako mogu separirati nekom pogodnom analitičkom metodom među kojima je i akiralna tekućinska kromatografija. U praksi se još koristi i enzimatska ili kinetička rezolucija kod koje se separacija postiže biološkim procesima kod kojih se jedna enantiomerna forma uništava. Od modernih metoda najčešće se koristi kiralna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (cHPLC).<sup>3</sup>

### 2.4.1. Kiralna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (cHPLC)

Prvotno su se za odjeljivanje enantiomera koristile plinska kromatografija, papirna kromatografija, kapilarna elektroforeza, tekućinska kromatografija i elektrokinetička kromatografija. Međutim, enantioselektivna (kiralna) tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti pokazala se kao najbolja te se danas najviše primjenjuje. Prednost cHPLC-a jest to što je brza, visoko efikasna i selektivna, moćna te se može koristiti i za preparaciju i analizu kiralnih lijekova.<sup>5</sup>

U kiralnoj tekućinskoj kromatografiji postoje dvije tehnike izvođenja: indirektna i direktna. Indirektna uključuje kemijsku pretvorbu enantiomera pomoću optički čistog kiralnog reagensa za pretvorbu (engl. *chiral derivatization reagent*, CDR) pri čemu nastaju dva diastereomera koji se mogu razdvojiti klasičnom kromatografijom obrnutih faza.<sup>3,16</sup> Uspješnost ove metode ovisi o dostupnosti stabilnih i optički čistih CDR-ova te o prisutnosti prikladnih funkcionalnih grupa na enantiomeru kako bi se enantiomer i reagens mogli kovalentno vezati.<sup>4</sup> Ova metoda rijetko se koristi u industriji, međutim često se koristi u analizama zbog velike osjetljivosti ili u slučajevima kada ne postoje odgovarajući kiralne stacionarne faze.<sup>3,4</sup>

U direktnoj metodi koristi se kiralni selektor u kiralnoj stacionarnoj fazi (engl. *chiral stationary phase*, CSP) ili u mobilnoj fazi (engl. *chiral mobil phase additives*, CMPA).<sup>3</sup> Direktna metoda bazira se na stvaranju prijelaznog diastereomernog kompleksa, a ne kovalentnog kompleksa kao kod indirektna metode.<sup>4</sup> Svi selektori imaju kiralne površine s kojima enantiomeri reagiraju te nastaju prijelazni kompleksi čije energije ovise o enantiomeru (razlika između energija može iznositi malih 0,025 kJ/mol<sup>15</sup>). Takav mehanizam prepoznavanja je poznat pod nazivom ključ-brava. Energije se razlikuju zato što svaka enantiomerna forma drugačije paše u strukturu kiralnog selektora. Posljedično, dva enantiomera se mogu odvojiti jer imaju drugačije vrijeme eluiranja s kolone. Osim razlike u interakcijama na vrijeme eluiranja utječe i sastav mobilne faze (pH, ionska jakost, polarnost), dužina i veličina kolone te temperatura.<sup>3</sup> U tablici 1 sumirane su prednosti i nedostaci indirektna i direktne kiralne kromatografije.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci indirektne i direktne metode cHPLC-a<sup>3-5,16</sup>

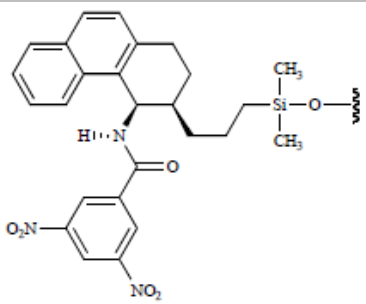
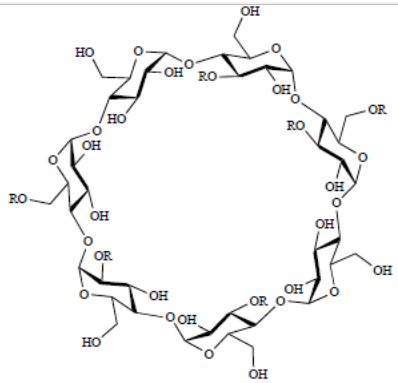
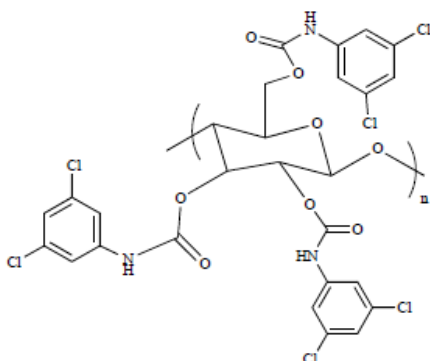
Metoda	Prednosti	Nedostaci
Indirektna (CDR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- jeftinija od ostalih</li> <li>- koriste se klasične kolone (GC, kromatografija s normalnim i obrnutim fazama) i uvjeti kao kod običnog HPLC-a pa je fleksibilnija</li> <li>- postoji puno CDR-ova koji su jeftiniji nego reagensi kod direktne metode</li> <li>- različiti stupnjevi selektivnosti se postižu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- dugo vrijeme analize koja uključuje pripremu i kasniju analizu dobivenih diastereomera</li> <li>- neprikladnost jer je potrebno iz diastereomera dobiti optički čisti enantiomer</li> <li>- može doći do racemizacije korištenog CDR-a, odnosno pogrešnih rezultati</li> <li>- treba paziti na optičku čistoću korištenih CDR-ova</li> </ul>
Direktna s kiralnom stacionarnom fazom (CSP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- postoji puno komercijalno dostupnih kolona</li> <li>- lako za izvođenje</li> <li>- predvidljiv mehanizam nastanka prijelaznog kompleksa</li> <li>- ne nastaje diastereomer iz kojeg treba izolirati čisti enantiomer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- komercijalno dostupne kolone su skupe</li> <li>- u nekim slučajevima korištena kolona može odvojiti samo par enantiomera</li> <li>- teško je odabrati pogodan CSP</li> </ul>
Direktna s CMPA-om	<ul style="list-style-type: none"> <li>- koriste se jeftinije kolone</li> <li>- postoji puno CMPA-ova</li> <li>- postižu se različiti stupnjevi selektivnosti</li> <li>- ne nastaje diastereomer iz kojeg treba izolirati čisti enantiomer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CMPA-ovi su često skupi</li> <li>- komplicirano izvođenje</li> <li>- nepogodno za preparativne svrhe jer se CMPA mora ukloniti iz eluata</li> </ul>

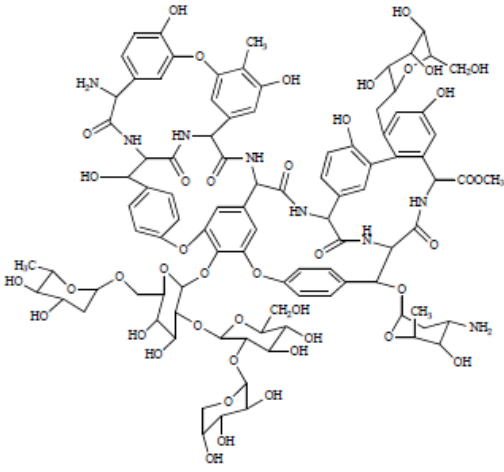
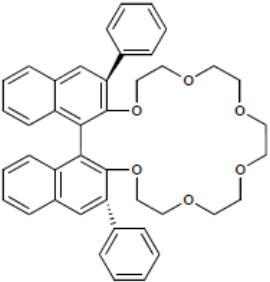
### 2.4.2. HPLC s kiralnom stacionarnom fazom

HPLC s kiralnom stacionarnom fazom danas se često upotrebljava u farmaceutskoj industriji te se vrlo efikasno koristi u analitičke i preparativne svrhe.<sup>5</sup> Danas je ta metoda dosta razvijena i sofisticirana tako da se mogu odvojiti stereoizomeri s više kiralnih centara, za razliku od prije kada je bilo moguće razdvojiti stereoizomere samo s jednim kiralnim centrom.<sup>5,15</sup> Također je moguće istovremeno odjeljivanje više kiralnih molekula i njihovih metabolita, sintetičkih nečistoća i produkata razgradnje. Kiralne molekule koje se odjeljuju mogu biti velikog raspona molekulskim masa, mogu imati različite funkcionalne skupine i različite vrste kiralnih centara. Koriste se kiralne stacionarne faze za HPLC-CSP normalnih i obrnutih fazama. Kromatografija normalnih faza bolja je za preparativne svrhe kada je analit slabo topljiv ili nestabilan u vodenim otopinama. U kromatografiji obrnutih faza skraćeno je vrijeme analize, postižu se oštriji pikovi i bolji omjer signala i šuma te dolazi do bolje imitacije stereoselektivne interakcije između lijeka i receptora. Ovakva kromatografija je također više kompatibilna s LC-MS analizom.<sup>15</sup>

Srce HPLC-CPS je kolona punjena s kiralnom stacionarnom fazom koja se sastoji od kiralnog selektora i inertnog nosača na koji se selektor kovalentno veže.<sup>5,15</sup> Sedamdesetih godina 20. stoljeća prva CSP kolona je sadržavala poliakrilamid. Takva stacionarna faza uspješno je korištena za separaciju enantiomera lijekova. Osamdesetih godina 20. stoljeća pripravljene su komercijalno dostupne CSP kolone u kojima je stacionarna faza bila četkastog oblika.<sup>15</sup> Danas su komercijalno dostupne različite CSP kolone.<sup>5</sup> Zapravo se svaka kiralna tvar može koristiti kao kiralni selektor kod HPLC-a, ako nekovalentno i enantioselektivno reagira s kiralnom molekulom. Najčešće se koriste ciklodekstrini, polisaharidi (celuloza, amiloza), proteini, makrociklički antibiotici, kruna eteri te CSP tipa četke (Tablica 2).<sup>3,5</sup> U upotrebi su i ionske vrste, kiralne ionske tekućine te prirodne tvari.<sup>5</sup> Za CSP baziranu na polisaharidima se smatra da je najbolja jer je gotovo univerzalna. Može reagirati s jako puno analita te je kompatibilna s raznim mobilnim fazama. Danas se najčešće koristi novi tip polisaharida, fenilkarbamati koji imaju i elektron-donirajuću i elektron-odvlačeću skupinu.<sup>15</sup>

Tablica 2. Najčešće korištene komercijalno dostupne kiralne stacionarne faze<sup>5</sup>

Tip CSP-a	Karakteristike	Struktura	Analiti koji se odjeljuju
Tip četke	Kiralna separacija se temelji na principu "interakcija tri točke"		Kiseline, amini, alkoholi, esteri, amidi, sulfoksidi, alkaloidi, ciklički ketoni
Ciklo-dekstrini	Hidroksilne skupine u šupljini rade vodikove veze s polarnim grupama analita		Aminokiseline, amini, alkoholi, amidi, kruna eteri, policiklički aromatski ugljikohidrati, laktoni
Polisaharidi	Enantiomeri grade vodikove veze s karbamatom		Kiseline, aminokiseline, amini, alkoholi, amidi, esteri, sulfoksidi, laktami, laktoni, ciklički ketoni
Protein-bazirani	Proteini imaju puno kiralnih centara te se vežu s enantiomerima preko hidrofobnih, elektrostatskih interakcija i vodikovih veza		Kiseline, amini, alkoholi, amidi, sulfoksidi, ciklički i aromatski lijekovi, nestereoidni protuupalni lijekovi, peptidi

Tip CSP-a	Karakteristike	Struktura	Analiti koji se separiraju
Makro-ciklički antibiotici	Sadrže puno kiralnih centara i šupljina u koje analit ulazi i veže se		Kiseline, aminokiseline, amini, amidi, esteri, sulfoksidi, aminoalkoholi
Kruna eteri	Tvore inkluzijske komplekse		Aminokiseline, amini, alkoholi, kruna eteri, policiklički aromatski ugljikohidrati

Makrociklički antibiotici počeli su se koristiti kao kiralni selektori sredinom 90-ih godina 20. stoljeća te su danas postali najčešće korišteni kiralni selektori.<sup>5,17</sup> Takvi selektori imaju veliki broj stereogenih centara i funkcionalnih skupina (aromatske, hidroksilne, amini, karboksilne, amidi itd.) koje ostvaruju višestruke interakcije s kiralnim molekulama.<sup>5,17</sup> Struktura im uključuje okosnicu oblika košare koja se sastoji od tri ili četiri fuzionirana makrociklička prstena. Interakcije koje se ostvaruju s enantiomerima su vodikove veze,  $\pi - \pi$  interakcije, inkluzijsko kompleksiranje, dipolne interakcije, steričke interakcije te ionske interakcije. Makrociklički glikopeptidni antibiotici mogu se koristiti i u kromatografiji normalnih i obrnutih faza.<sup>17</sup> Danas se najčešće upotrebljavaju antibiotici rifamicin B i SV, avoparcin, teikoplanin, ristocetin A i vankomicin.<sup>5</sup>

Niti jedna kiralna stacionarna faza se ne smatra univerzalnom pa je potrebno odabrati pravu kolonu za zadanu analizu što je u većinu slučajeva teško. Odabir se najčešće bazira na empirijskim podacima i iskustvu. Međutim poznavanje i razumijevanje mehanizma po kojem selektor razlikuje pojedine enantiomerne forme može uvelike pomoći pri odabiru.<sup>3</sup> Danas se

intermolekularne interakcije između kiralnog selektora i enantiomera mogu izračunati pomoću kvantne mehanike, molekularne mehanike ili molekularne dinamike. Molekularno modeliranje je praktični alat za procjenu kompleksnih interakcija koje se događaju kada se analit kreće kroz kolonu te nam omogućava detaljne informacije o tome kako se kromatografija događa. Zbog toga se mogu predvidjeti rezultati pojedine kromatografske metode pa je puno lakše odlučiti koja je stacionarna faza najbolja za danu analizu.<sup>5</sup>

Inertni nosač je također bitan za učinkovitost HPLC-CSP-a analize. Komercijalno dostupne kolone najčešće sadržavaju porozne čestice silikagela iako se koriste i druge organske i anorganske tvari te monolitski silikagel (brza separacija enantiomera). Primjenjuju se kolone različitih veličina. Promjer kolone varira od par desetaka mikrometra do par desetaka centimetra. Korištenje manjih kolona ima značajne prednosti koje uključuju manje trošenje stacionarne i mobilne faze koja sa sobom povlači i manje ekološke probleme pri zbrinjavanju otpada, a potrebna je i manja količina uzorka. Njihovom upotrebom postiže se kraće vrijeme analize i dobivaju oštriji pikovi.<sup>15</sup>

## 2.5. Analiza farmaceutika u otpadnim vodama pomoću LC-MS/MS

Nakon konzumacije većina lijekova (ljudskih i veterinarskih) i njihovih metabolita završi u otpadnim vodama gdje se mogu zadržati i do godinu dana.<sup>14,17</sup> Sudbine lijekova su tada različite: mogu se razgraditi pod djelovanjem mikroorganizama poput aspirina; mogu iz vode završiti u tlu gdje utječu na pH i sastav tla ili mogu završiti u rijekama, morima i oceanima gdje utječu na morski život.<sup>18</sup>

### 2.5.1. Prikupljanje i priprema uzoraka

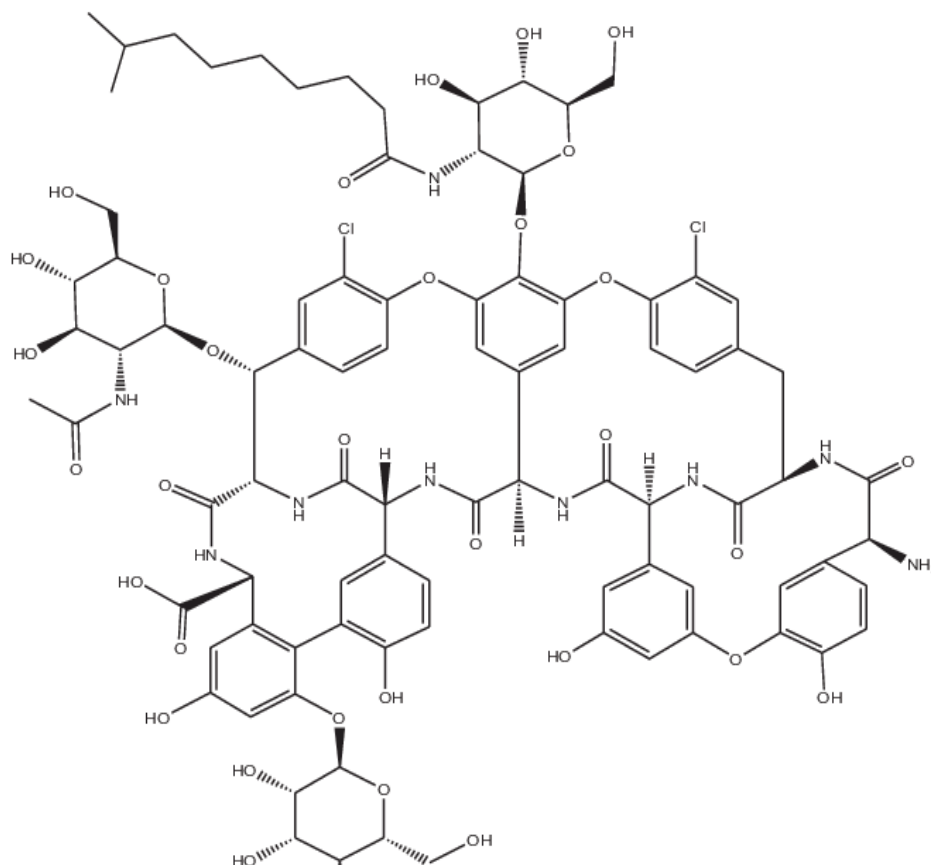
Cilj analize opisane u radu Dolores Camacho-Muñoz bio je odrediti i kvantificirati 16 veterinarskih i ljudskih kiralnih lijekova u okolišu (pročišćene i nepročišćene otpadne vode i rijeke). Ciljani lijekovi odabrani su na temelju velike upotrebe te mogućnosti kiralne inverzije tijekom bioloških procesa. Uzorci voda skupljeni su u rujnu 2015. godine u jugozapadnoj Engleskoj te čuvani u polietilenskim bocama na temperaturi od 4 °C i analizirani odmah po dolasku u laboratorij. Lijekovi su izolirani iz uzoraka pomoću ekstrakcije na čvrstoj fazi.<sup>17</sup> To je jednostavna i često korištena metoda za pročišćavanje i ukoncentriravanje uzoraka. Princip djelovanja je sličan kao i kod tekućinske kromatografije. Odjeljivanje se temelji na razdiobi

komponenti uzorka između krute (ekstrakcijske) faze i tekuće faze.<sup>15</sup> Za ove analize korištene su Visiprep SPE Vacuum Manifold i Oasis HLB-MAX patrone. Kolone su isprane s metanolom i metanolom s dodanom 2%-tnom mravljom kiselinom. Dobiveni eluati su spojeni i upareni do suhog.<sup>17</sup>

### 2.5.2. Analiza

Pripremljeni uzorci analizirani se pomoću kiralne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s obrnutim fazama spregnute s tandemnom spektrometrijom masa kao detektorom. Mobilna faza sastojala se od 70% vodene otopine amonijeva acetata koncentracije  $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 7) i 30% metanola. Kao kiralni selektor korišten je makrociklički glikopeptidni antibiotik, teikoplanin. Teikoplanin se često koristi jer ulazi u interakcije s velikim brojem analita te ima veliku sposobnost razlikovanja pojedinih enantiomernih formi što ga čini idealnim za LC-MS metode. Njegova struktura (Slika 10) uključuje heptapeptidni aglikon, sedam aromatskih prstena i tri šećerna dijela. Ukupno ima 23 kiralna centra koji okružuju četiri šupljine te sadrži karboksilne skupine i amine. Zbog te specifične strukture on je idealan za separaciju aminokiselina, karboksilnih kiselina, fenola, malih peptida, aromata i cikličkih aromata te alifatskih amina.

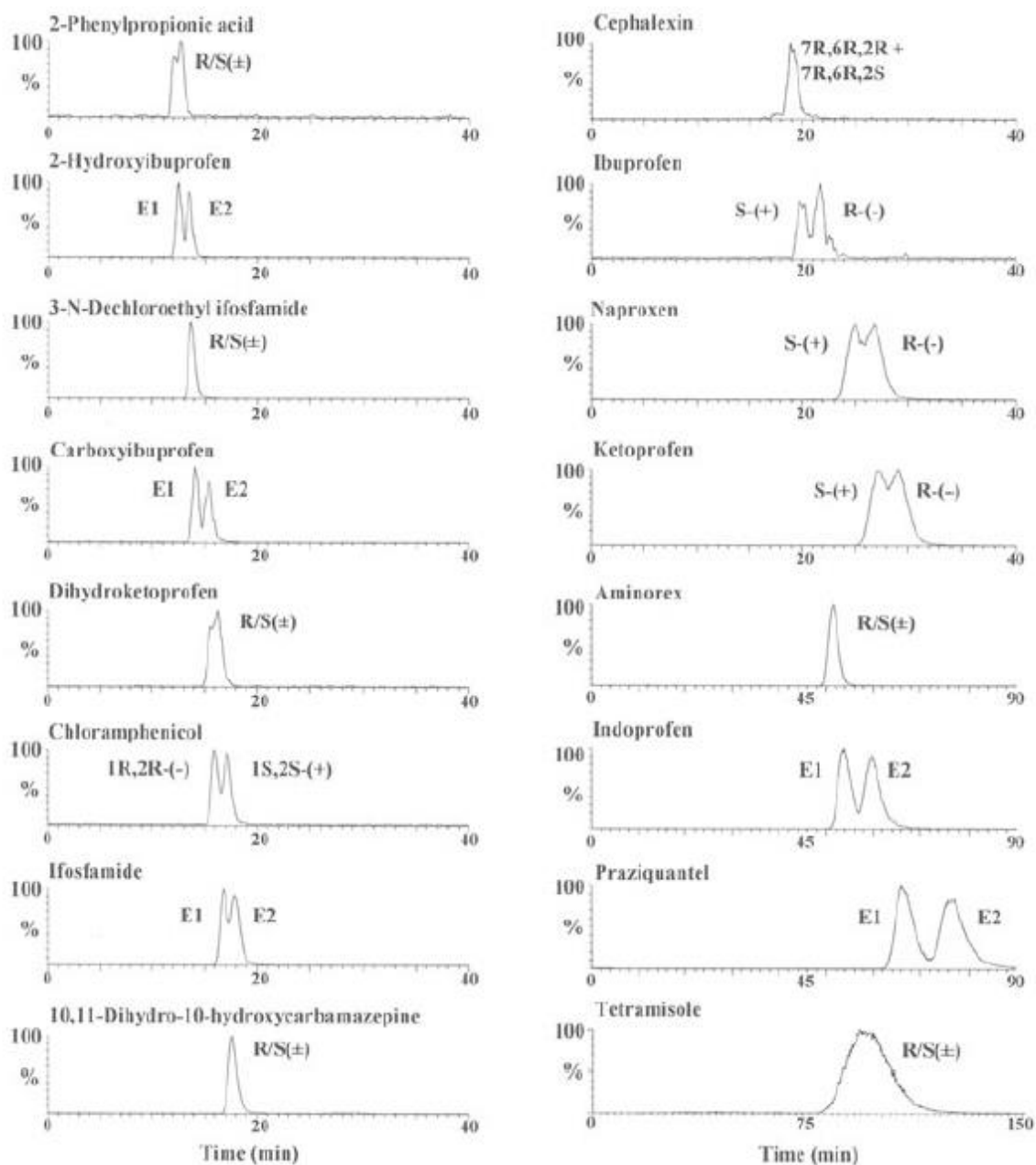


Slika 10. Strukturna formula teikoplanina<sup>19</sup>

Trostruki kvadrupolni spektrometar masa (QqQ) koristi se za kvantifikaciju kiralnih lijekova. U spektrometru masa nastaju ioni analita u plinskoj fazi koji se odvajaju na temelju njihovih omjera mase i naboja,  $m/z$ . Spektar masa prikazuje ovisnost relativne zastupljenosti (intenziteta) pojedinih iona o omjeru  $m/z$ . Vezanim sustavom LC-MS postiže se izvrsna selektivnost što je jako bitno za ovakav tip analize. Prvi korak u spektrometriji masa je ionizacija uzorka. Postoje razne tehnike ionizacije poput kemijske ionizacije, termoraspršenja, ionizacije elektronima ili poljem i tako dalje. U ovoj analizi upotrijebljena je ionizacija pri atmosferskom tlaku, točnije elektoraspršenje.<sup>8</sup> Takva ionizacija uključuje nebulizaciju tekućine u aerosol koji se sastoji od visoko nabijenih kapljica.<sup>20</sup> Ionizacija započinje primjenom električnog polja, u ovoj analizi napon na kapilari iznosio je 3 kV u pozitivnom načinu snimanja (ESI+), odnosno 1,7 kV u negativnom načinu rada (ESI-).<sup>17,20</sup>

### 2.5.3. Rezultati

Prethodno opisanom metodom razdvojene su enantiomerne forme 9 od 16 traženih kiralnih lijekova. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 11. Djelomično odjeljivanje je postignuto za karboksiibuprofen, kloramfenikol, 2-hidroksiibuprofen, ibuprofen, ifosfamid, infoprofen, ketoprofen, naproksen i prazikvantel. Samo jedna pik je uočen za aminoreks, cefaleksin, 3-N-dekloroetilfosfamid, dihidroketoiproduen, 10,11-dihidro,10-hidroksikarbamazepin, 2-fenilpropionsku kiselinu i tetramisol što ukazuje da kiralna rezolucija za te spojeve nije postignuta pod navedenim uvjetima.<sup>17</sup>



Slika 11. Kromatogrami 16 kiralnih lijekova dobiveni LC-MS/MS metodom.<sup>17</sup>

Kvantitativni podatci za nepročišćene i pročišćene otpadne vode te rijeke prikazani su na slici 12. Ibuprofen se prodaje kao racemična smjesa, ali se u nepročišćenim vodama pojavljuje samo S-(+)- enantiomer što znači da R-(-)- enantiomer podliježe kiralnoj inverziji tijekom metabolizma.<sup>17</sup>

Tablica 3. Koncentracije lijekova (srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija) u nepročišćenoj i pročišćenoj otpadnoj vodi te rijekama. MDL (engl. *method detection limit*), granica detekcija metode; MQL (engl. *method quantification limit*), granica kvantifikacije metode.<sup>17</sup>

	<b>Pročišćena voda (<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>) (n = 3)</b>	<b>Nepročišćena voda (<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>) (n = 3)</b>	<b>Rijeke (<math>\mu\text{g l}^{-1}</math>) (n = 3)</b>
<b>R/S (<math>\pm</math>) Aminoreks</b>	< MDL	<MDL	<MDL
<b>Karboksi-ibuprofen E1</b>	0,35 $\pm$ 0,01	<MDL	<MDL
<b>Karboksi-ibuprofen E2</b>	0,07 $\pm$ 0,01	<MDL	<MDL
<b>6R,7R,2R-cefaleksin + 7R,7R,2S-ceflakesin</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>1R,2R-(-)-kloramfenikol</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>1S,2S-(-)-kloramfenikol</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>1R,2R-(-)-kloramfenikol baza</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>R/S (<math>\pm</math>)-3-N- dekloroetilfosfamid</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>(+)-griseofulvin</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>R/S (<math>\pm</math>)-10,11-dihidro-10- hidroksikarbamazepin</b>	<MQL	<MDL	<MQL
<b>R/S (<math>\pm</math>)- dihidroksiketoprofen</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>S-(+)-O- desmetilnaproksen</b>	0,23 $\pm$ 0,05	<MDL	<MDL
<b>1R,2S-(-)-florfenikol</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>2-hidroksiibuprofen E1</b>	0,178 $\pm$ 0,001	<MDL	<MDL
<b>2-hidroksiibuprofen E2</b>	0,056 $\pm$ 0,002	<MDL	<MDL
<b>S-(+)-ibuprofen</b>	0,35 $\pm$ 0,09	<MDL	<MDL

	Pročišćena voda ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (n = 3)	Nepročišćena voda ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (n = 3)	Rijeke ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (n = 3)
<b>R-(-)-ibuprofen</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>Ifosfamid E1</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>Ifosfamid E2</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>Indoprofen E1</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>Indoprofen E2</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>S-(+)-ketoprofen</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>R-(-)-ketoprofen</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>S-(+)-naproksen</b>	0,37 ± 0,05	<MDL	<MDL
<b>R-(-)-naproksen</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>R/S (±)-2-fenilpropionska kiselina</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>Prazikvantel E1</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>Prazikvantel E2</b>	<MDL	<MDL	<MDL
<b>R/S (±)-tetramisol</b>	<MDL	<MDL	<MDL

## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Miller, *Chromatography*, u knjizi *Encyclopedia of Applied Physics*, 2009.
2. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-za-pacijente/lijekovi/opcenito-o-lijekovima> (datum pristupa 27. svibnja 2021.)
3. L. A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.*, **2(2)** (2006) 85-100.
4. W. H. Porter, *Pure and Appl. Chem.*, **63** (1991) 1119-1122.
5. Y. Zhang, S. Yao, H. Zeng, H. Song, *Curr. Pharm. Anal.*, **6** (2010) 114-130.
6. A. R. L. Ribeiro, A. S. Maia, C. Ribeiro, M. E. Tiritan, *Trends. Analyt. Chem.*, **124** (2020) 1-12.
7. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Fundamentals Of Analytical Chemistry 7th Edition*, Harcourt College Publisher, Orlando, 1997, str. 660-661, 682-683, 686, 701, 703-707.
8. W. M. A. Niessen, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry 3rd Edition*, Taylor and Francis Group, New York, 2006, str. 4-9, 23.
9. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography 3rd Edition*, John Wiley and Sons, New Jersey, 2010, str. 1-2, 20-21, 148, 253-254.
10. M. W. Dong, *Separation Science and Technology Volume 6*, Elsevier B.V, San Diego, 2005, str. 50.
11. V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography 5th Edition*, John Wiley and Sons, New Jersey, 2010, str. 1, 5, 39.
12. <https://www.genetec.se/en/produkter/kolonner/hplc-kolonner/ymc-carotenoid-hplc-column-c30-5-m-250-mm-x-4-6-mm> (datum pristupa 29. svibnja 2021.)
13. <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/> (datum pristupa 27. svibnja 2021.)
14. S. A. Smith, *Toxicol. Sci.*, **101(1)** (2009) 4-30.
15. S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, M. L. Riekkola, *Liquid Chromatography Applications 2nd Edition*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 2017, str. 13, 70-75.
16. A. Calcaterra, I. D Acuarica, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **147** (2018) 323-340.
17. D. Camacho-Munoz, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Mass. Spectrom.*, **52** (2017) 94-108.
18. S. E. Jorgensen, B. Halling-Sorensen, *Chemosphere* **40** (2000) 691-699.

19. J. Movaffagh, A. Ghodsi, B. S. F. Bazzaz, S. Tabassi, *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* **8(1)** (2013) 27-33.
20. W. M. A. Niessen, A. P. Tinke, *J. Chromatogr. A* **703** (1995) 37-57.