

Analiza lijekova i bioaktivnih molekula

Badenić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:217:456587>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Ana Badenić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

ANALIZA LIJEKOVA I BIOAKTIVNIH MOLEKULA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2024.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

22. kolovoza 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. KROMATOLOGRAFIJA	2
2.1. Vrste kromatografije	2
§ 3. SPEKTROSKOPIJA NMR	4
3.1. LC-NMR	5
§ 4. SPEKTROMETRIJA MASA	7
4.1. LC-MS.....	11
§ 5. ANALIZA ONEČIŠĆENJA LIJEKOVA	13
5.1. Vrste onečišćenja lijekova	13
5.2. LC-NMR u analizi nečistoća lijekova.....	14
5.3. LC-MS u analizi nečistoća lijekova	16
§ 6. ZAKLJUČAK	20
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	XXI

§ Sažetak

Lijekovi, bilo prirodni ili sintetski, postali su neizostavan dio svakodnevnog života, a njihov razvoj posljednjih godina bilježi značajan rast. Korištenjem različitih analitičkih tehnika, moguće je prikupiti podatke o prisutnim onečišćenjima, nusproizvodima ili međuproduktima u lijekovima. Identifikacija i razumijevanje tih onečišćenja već u ranim fazama istraživanja ključno je jer može pomoći u objašnjavanju nuspojava i potencijalne toksičnosti, kao i u rasvjetljavanju mehanizama sinteze lijeka. U modernoj analitičkoj kemiji sve je češća primjena spregnutih sustava, koji omogućuju detaljniju i precizniju analizu farmaceutskih spojeva.

U farmaceutskoj industriji, identifikacija i kvantifikacija nečistoća u lijekovima ključni su aspekti osiguranja kvalitete, sigurnosti i učinkovitosti proizvoda. U ovom radu istražuje se primjena kombiniranih analitičkih metoda tekućinske kromatografije u sprezi s nuklearnom magnetskom rezonancijom (LC-NMR) i spektrometrijom masa (LC-MS) za analizu nečistoća u lijekovima. Integracija ovih dviju analitičkih metoda omogućava detaljno istraživanje lijekova, optimizaciju proizvodnih procesa i usklađivanje sa strogim regulatornim zahtjevima. Ovaj rad naglašava važnost metoda LC-NMR i LC-MS u modernoj farmaceutskoj analizi te doprinosi boljem razumijevanju ovih metoda i njihove važnosti u razvoju lijekova.

§ 1. UVOD

Analiza lijekova i bioaktivnih molekula predstavlja ključni aspekt farmaceutske kemije i biomedicinskih istraživanja. Precizno identificiranje, karakterizacija i kvantifikacija ovih spojeva neophodni su za razvoj novih terapeutika, optimizaciju postojećih lijekova te razumijevanje njihovih mehanizama djelovanja. Među brojnim analitičkim tehnikama koje su razvijene u tu svrhu, tekućinska kromatografija spregnuta s nuklearnom magnetskom rezonancijom (LC-NMR) i tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) izdvajaju se kao izuzetno moćne i komplementarne metode. LC-NMR omogućava separaciju i strukturalnu analizu spojeva u kompleksnim smjesama, pružajući detaljne informacije o molekulskim strukturama na temelju njihovih spektara NMR. Ova tehnika je posebno korisna za određivanje strukturnih detalja i identifikaciju nepoznatih metabolita, što je od velike važnosti u farmakološkim studijama i istraživanju metabolizma lijekova. S druge strane, LC-MS kombinira visoku razlučivost tekućinske kromatografije s visokom osjetljivošću i selektivnošću spektrometrije masa. Ova metoda je izuzetno korisna za kvantifikaciju analita na vrlo niskim koncentracijama te za identifikaciju i potvrdu strukturnih informacija putem njihovih spektara masa. LC-MS je stoga vrlo bitna tehnika u procesima kontrole kvalitete, identifikacije nečistoća te u razvoju novih lijekova.¹

Kombinacija tehnika LC-NMR i LC-MS omogućava vrlo detaljnu analizu bioaktivnih molekula, pružajući kako kvalitativne tako i kvantitativne informacije. Ovaj rad će se fokusirati na metodologiju i primjenu ovih tehnika u analizi lijekova i bioaktivnih molekula, ističući njihove prednosti, izazove i ključne primjere iz recentne literature. Kroz detaljan pregled i analizu, rad će doprinijeti boljem razumijevanju ovih naprednih analitičkih pristupa u suvremenoj farmaceutskoj znanosti.

§ 2. KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je analitička metoda odjeljivanja komponenti smjese na temelju interakcije s mobilnom i stacionarnom fazom. Mobilna faza je faza koja se kreće kroz stacionarnu i sadrži komponente smjese. Može biti gel, tekućina ili plin. Stacionarna faza je faza u kojoj se odvija odjeljivanje i koja ostaje nepromijenjena. Može biti superkritična tekućina, tekućina ili plin. Komponente smjese odjeljuju se na temelju različite brzine putovanja kroz stacionarnu fazu što ovisi o kemijskim svojstvima komponenti i njihovim interakcijama s fazama. Kromatografija je široko rasprostranjena analitička metoda koja se koristi u mnogim granama industrije kao što su farmaceutska, kemijska, naftna te u biokemijskim, medicinskim, forenzičkim i mnogim drugim istraživanjima.²

2.1. Vrste kromatografije

Vrste kromatografije mogu se klasificirati prema agregatnom stanju mobilne faze. Plinska kromatografija je vrsta kromatografije u kojoj je mobilna faza plinoviti fluid ili drugim nazivom plin nosilac. Plinska kromatografija (GC) može se podijeliti još u dvije podvrste ovisno o agregatnom stanju stacionarne faze pa tako postoje plinovito-kruta kromatografija (GSC) i plinovito-tekuća kromatografija (GLC). Najčešće korišteni plinovi kao plin nosač su helij, vodik i dušik zbog njihove inertnosti, odnosno vrlo slabe interakcije s otopljenim tvarima. Poseban problem ovom tipu kromatografije predstavljaju vrlo hlapive tekućine. Pojavljuju se na kromatogramu vrlo rano kao dobro razdvojeni pik , dok su pikovi nisko hlapivih tekućina vrlo široki i zanemarivi. Problem je riješen promjenom temperature tijekom odjeljivanja. Pri nižim temperaturama izlaze razdvojene hlapive tekućine te se zatim podiže temperatura da bi se razdvojile i detektirale na kromatogramu tekućine niske hlapivosti.

Tekućinska kromatografija (LC) kao mobilnu fazu koristi tekućinu. Tekuće-kruta kromatografija (LSC) koristi krutinu kao stacionarnu fazu, a glavni mehanizam razdvajanja je adsorpcija. Najčešće se kao stacionarna faza koriste silikatni ili polimerni materijal. Za mobilnu fazu koristi se nepolarno ili slabo polarno otapalo za bolje odjeljivanje. Tekućinsko-tekućinska kromatografija (LLC) koristi tekućinu kao pokretnu i kao mobilnu fazu. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) koristi male čestice s molekulama vezanim za

njihovu površinu kako bi se stvorio film koji ima svojstva slična tekućini. Problem kod tekućinske kromatografije stvaraju uzorci koji sadrže jako i slabo zadržana otapala. Taj problem je riješen analogno plinskoj kromatografiji promjenom temperature tijekom kromatografije.

Osim klasifikacije po agregatnom stanju mobilne faze, kromatografija se može klasificirati i prema fizikalno-kemijskim svojstvima poput adsorpcije, topljivosti, vrelištu i slično.

Za analzu bioloških makromolekula koriste se afinitetna kromatografija, kromatografija na ionskim izmjenjivačima i gel-filtracijska kromatografija. Afinitetna kromatografija temelji se na različitim afinitetima molekule prema različitim manjim molekulama. Kromatografija na ionskim izmjenjivačima temelji se na različitim nabojima molekula u sustavu. Ako je stacionarna faza pozitivno nabijena, pozitivno nabijene molekule će brže prolaziti dok će se negativne zadržavati. Gel-filtracijska kromatografija temelji se na razlici u veličini molekula. Kolona kroz koju uzorak prolazi punjena je poroznim gelom kroz koji tvari veće mase brže prolaze, a tvari manje mase sporije prolaze jer ulaze u pore gela te im je put kroz gel sporiji.³ Podjela upotrebe određene vrste kromatografije prema fizikalno-kemijskim svojstvima uzorka prikazana je na Slici 1.

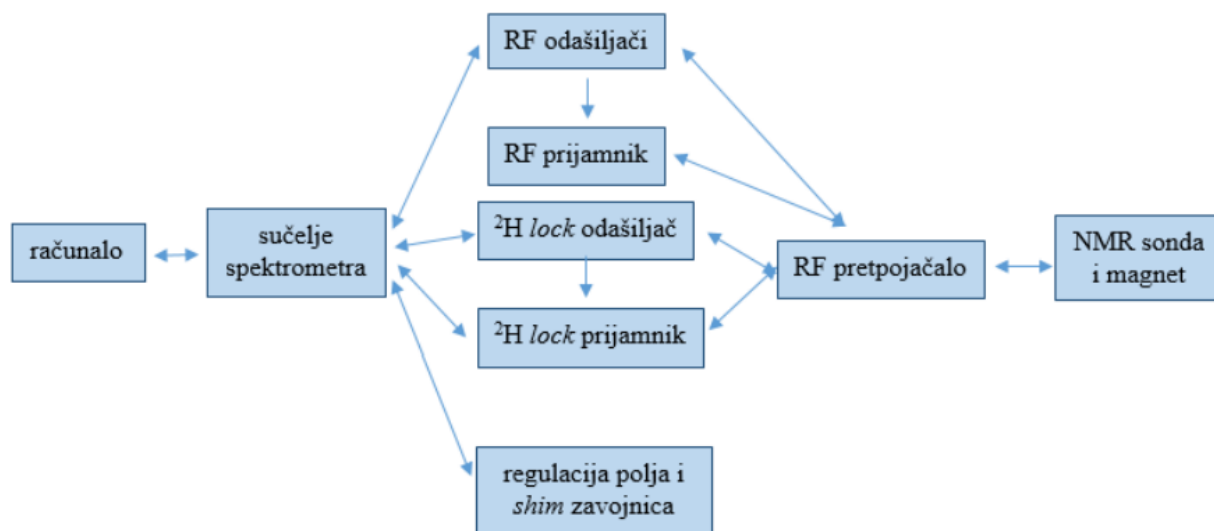
svojstvo analita	mobilna faza: plin (plinska kromatografija)	mobilna faza: tekućina (tekućinska kromatografija)
vrelište	Sve vrste GC	—
adsorpcija	GSC	LSC
topljivost	GLC	LLC
oblik molekule	GSC s molekul. sitima	gelna kromatografija afinitetna kromatografija
reverzibilna kemijska reakcija	GLC uz tvorbu kompleksa	kromatografija ionske izmjene

Slika 1. Vrsta kromatografije prikladna za određeno fizikalno-kemijsko svojstvo uzorka(analita)

§ 3. SPEKTROSKOPIJA NMR

Nuklearna magnetna rezonancija ili NMR vrlo je moćna spektroskopska metoda koja se temelji na interakciji između elektromagnetskog zračenja i spinova atomskih jezgara. Elektromagnetno zračenje je dvojne prirode, odnosno opisuje se kao struja fotona i kao val. Zbog navedene dvojne prirode, mogu se objasniti apsorpcija, emisija i raspršenje zračenja. Energija fotona proporcionalna je frekvenciji (ν), a obrnuto proporcionalna valnoj duljini (λ).

Subatomske čestice (protoni, elektroni i neutroni) posjeduju spin koji je kvantno-mehanička osobina povezana s magnetskim momentom. U nekim atomima ukupni spin jezgre može biti nula pa nema signala NMR, a u nekim atomima kao što su ^1H , ^{13}C , ^{31}P jezgra posjeduje ukupni spin različit od nule i takve jezgre imaju signale u spektru. Ako su i broj protona i broj neutrona u jezgri parni brojevi, jezgra ima spin nula; ako je zbroj broja protona i neutrona neparan, tada jezgra ima polucijeli broj spina; ako su i broj protona i broj neutrona neparni, jezgra ima cjelobrojni spin. Spektroskopijom NMR proučavaju se jezgre čiji spinovi su različiti od nule. Kada su atomi izloženi jakom vanjskom magnetnom polju, njihovi nuklearni spinovi imaju orijentaciju. Stanje spina orijentirano paralelno s vanjskim poljem ima nižu energiju od one u odsutnosti vanjskog polja, a stanje spina orijentacije suprotne vanjskom magnetnom polju imaju veću energiju u odnosu na energiju u odsutnosti vanjskog polja. Primjenom radio frekventnih pulseva, moguće je izbaciti ove spinove iz njihovog ravnotežnog stanja, što dovodi do emisije radio frekventnih signala vraćanjem u ravnotežno stanje. Ovi signali se detektiraju i analiziraju te se na temelju njih dobivaju informacije o kemijskom okruženju atomskih jezgara. Dijelovi spektrometra su: supravodljivi magnet, sonda sa cjevčicom za uzorak, zavojnice i elektronika za povezivanje spektrometra NMR i računala. Na Slici 2. prikazana je shema spektrometra.



Slika 2. shematski prikaz dijelova spektrometra NMR.

Prvi korak u snimanju spektra NMR je priprema uzorka. Uzorak se otapa u deuteriranom otapalu (npr. CDCl_3 , D_2O), a koncentracija uzorka iznosi nekoliko miligrama do nekoliko desetaka miligrama po mililitru otapala. Otopina se zatim stavlja u cijevčicu NMR, koja se zatim stavlja u magnet spektrometra. Supravodljivi magnet spektrometra generira homogeno magnetno polje koje mora biti stabilno tijekom snimanja spektra. Kratki radiofrekvencijski pulsevi primjenjuju se na uzorak čime jezgre prelazi iz nižeg u više energijsko stanje. Nakon pobude jezgre se vraćaju u niže energetske stanje čiji se signal bilježi. Na temelju snimljenih signala određuje se struktura molekule. Osnovna prednost spektroskopije NMR je ta što metoda nije destruktivna, odnosno uzorak se ne uništava tijekom analize te pruža detaljne informacije o strukturi i dinamici molekula. Omogućava identifikaciju različitih funkcijskih skupina i određivanje relativnog položaja atoma u molekuli, što je ključno za razumijevanje bioloških funkcija i interakcija.⁴

3.1. LC-NMR

LC-NMR je tehnika koja kombinira tekućinsku kromatografiju i spektroskopiju NMR. Tekućinska kromatografija je separacijska metoda koja služi za razdvajanje komponenti smjese na osnovu njihove interakcije s mobilnom i stacionarnom fazom. LC-NMR omogućava

direktno povezivanje kromatografskog sustava sa spektrometrom NMR što omogućava analizu izoliranih komponenti smjese bez potrebe za dodatnom pripremom uzorka.

Primjena metode LC-NMR naročito je korisna u proučavanju kompleksnih smjesa, kao što su prirodni proizvodi, metaboliti i farmaceutski preparati. Kombinacija visoke razlučivosti tekućinske kromatografije i detaljne strukturalne informacije NMR-a omogućava da se ovim spregnutim sustavom precizno identificiraju i karakteriziraju određene komponente od interesa, čak i u slučajevima kada su prisutne u vrlo niskim koncentracijama.

Sustav LC-NMR sastoji se od kromatografske jedinice koja se sastoji od pumpe, injektora, kolone i detektora. Nakon injektiranja u sustav LC, komponente se razdvajaju na osnovi kemijskih i fizičkih svojstava. Eluirana komponenta prenosi se u spektrometar NMR pomoću deuterirane mobilne faze koja minimizira interferenciju pozadinskog signala u NMR spektru. Ove dvije metode moguće je kombinirati na različite načine uključujući kontinuirani protok, zaustavljanje protoka i skupljanjem frakcija iz kolone koji se kasnije analiziraju NMR-om. Prve dvije metode su praktičnije, u metodi kontinuiranog protoka eluirane komponente se analiziraju u stvarnom vremenu dok prolaze kroz NMR ćeliju, a u metodi zaustavljenog protoka protok se zaustavlja kada komponenta od interesa uđe u ćeliju NMR omogućavajući produženo snimanje spektara za detaljniju analizu.

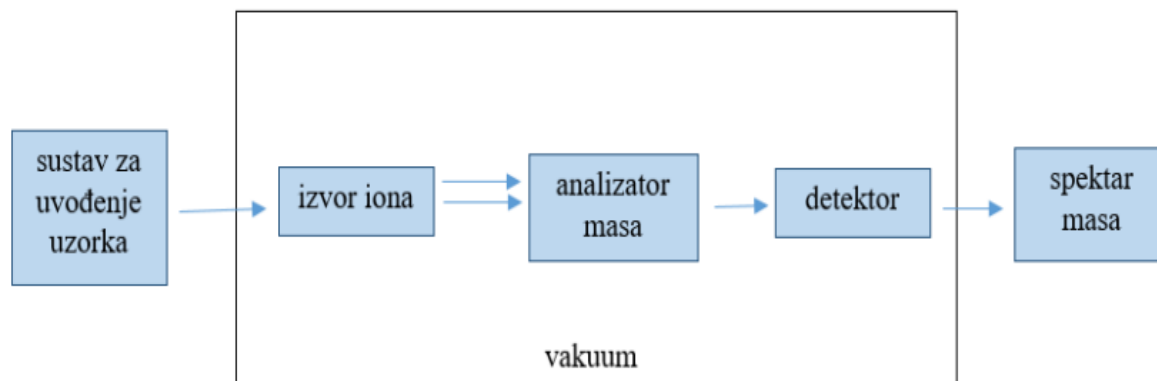
Jedna od glavnih prednosti metode LC-NMR je njena sposobnost pružanja neposrednih i detaljnih informacija o strukturi izoliranih komponenti iz smjesa. Također minimizira se potreba za dodatnom pripremom uzorka čime se smanjuje rizik od gubitka uzorka. Metoda je također i neinvazivna i ne destruktivna što ju čini idealnom za analizu osjetljivih uzoraka i uzoraka koji su dostupni u vrlo malim količinama.

Međutim, metoda ima i određena ograničenja. Visoki troškovi opreme i održavanja mogu biti prepreka za njenu širu primjenu. Također, spektroskopija NMR je manje osjetljiva metoda analize u odnosu na druge metode što može predstavljati problem u analizi komponenti prisutnih u vrlo niskim koncentracijama. Ipak, kontinuirani razvoj tehnologije i povećanje osjetljivosti NMR instrumenata obećavaju daljnje poboljšanje ove vrlo moćne analitičke metode.⁵

§ 4. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa analitička je metoda koja se koristi za određivanje mase i sastava molekula. Primjena ove metode analize prisutna je u mnogim disciplinama uključujući kemiju, biologiju, farmaciju i medicinu.

Princip rada spektrometra masa sastoji se od tri osnovne faze: ionizacije, odjeljivanju iona na osnovi njihovog omjera mase i naboja i detekcije. Dijelovi spektrometra masa su: sustav za uvođenje uzorka, izvor iona, analizator masa i detektor. Shema spektrometra masa prikazana je na Slici 3.



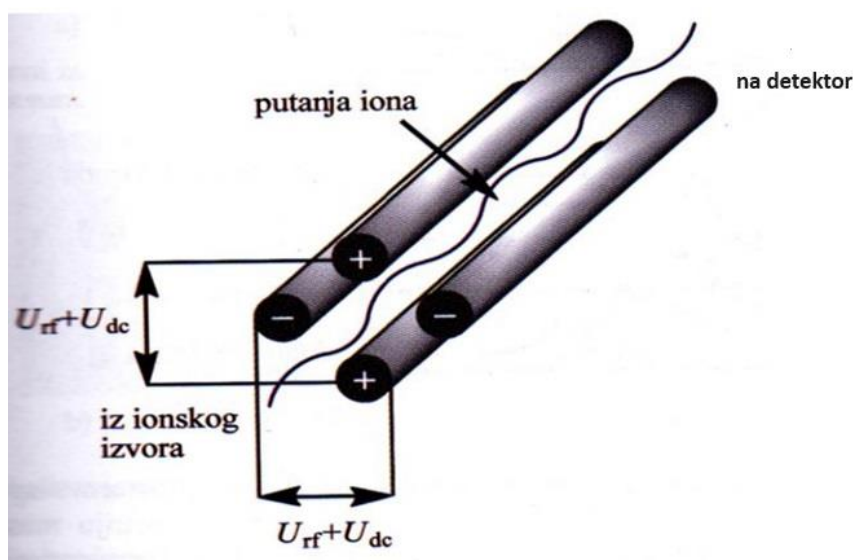
Slika 3. Shema dijelova spektrometra masa.

Prva faza ili faza ionizacije je faza u kojoj se molekule prevode u ione pomoću različitih tehnika, kao što su ionizacija brzim elektronima, kemijska ionizacija, ionizacija elektroraspršenjem i matricom potpomognuta laserska ionizacija. Elektronska ionizacija jedna je od najstarijih metoda ionizacije. Ova metoda je prigodna za analizu hlapljivih i termostabilnih molekula. Uzorak se u plinovitom stanju uvodi u ionizacijsku komoru spektrometra masa. U komori volframov ili renijev filament emitira elektrone, a napon između filameta i kolektorske elektrode ubrzava elektrone prema uzorku. Elektroni se zatim velikom brzinom sudaraju s molekulama uzorka te energija elektrona prelazi na molekulu što dovodi do izbijanja jednog ili više elektrona iz molekule uzorka te uzorak postaje pozitivno nabijen. Zbog velike unutarnje energije molekulskog iona dobivene sudarom, molekulski ion se može još i dodatno

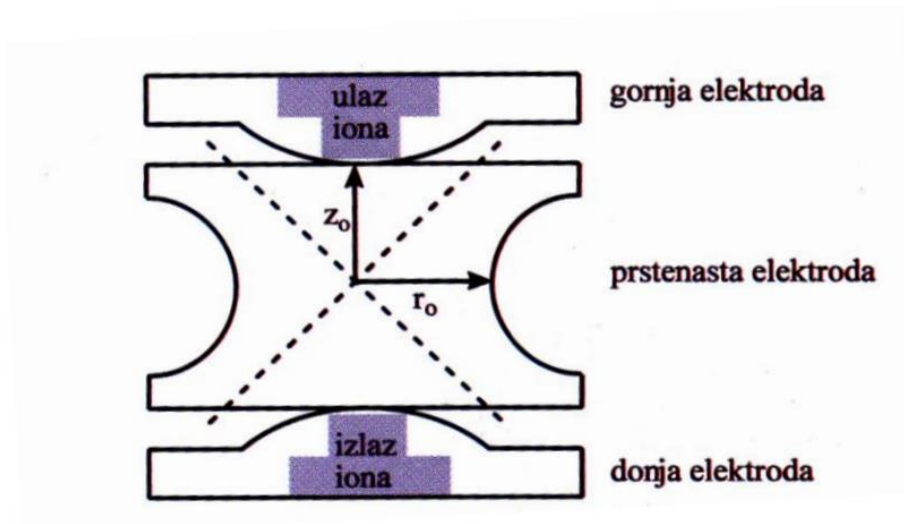
fragmentirati. Fragmentacija može biti korisna za identifikaciju molekule jer svaka molekula ima jedinstveni uzorak fragmentacije. Kemijska ionizacija je metoda ionizacije molekule u kojoj nastaje puno manje fragmenata u odnosu na ionizaciju brzim elektronima što je u nekim slučajevima poželjno. Napon koji se koristi u kemijskoj ionizaciji je niži od onoga korištenom u ionizaciji brzim elektronima pa se molekula ne raspada na fragmente. Ioni se stvaraju sudarom molekula uzorka s ioniziranim reaktantnim plinom. Često korišteni plinovi reagensi za uvođenje ionskog izvora su metan, amonijak ili izobutan. Ovaj plin se ionizira ionizacijom brzih elektrona u visoko vakuumskoj komori. Tako nastali ioni molekula reagensa imaju dovoljnu energiju za daljnju ionizaciju molekula uzorka, ali ne dovoljno veliku za njihovo fragmentiranje. Molekule iona plina reagensa sudaraju se s molekulama uzorka u plinovitoj fazi te im prenose naboj. Ionizacija elektroraspršenjem pogodna je za analizu polarnih molekula i biomolekula kao što su proteini, peptidi, nukleotidi i ostale. Uzorak se otapa u odgovarajućem otapalu koje je često smjesa vode i organskog otapala kao što su metanol ili acetonitril te može sadržavati i male količine kiseline kao na primjer mravlju kiselinu za poboljšanje ionizacije. Otopina uzorka se zatim pumpa kroz kapilaru visokonaponskog sustava te se na kraju kapilare primjenjuje visok napon od 3-6kV da bi se dobio fini sprej otopine uzorka. Ovakav sprej sastoji se od visokonabijenih kapljica. Kapljice se zatim uslijed velikog napona smanjuju uslijed odbijanja istih naboja unutar kapljice. Proces se ponavlja sve dok ne izađu molekule otapala i ne ostane samo uzorak u kapljicama. Takve kapljice zatim prolaze najčešće kroz topli plin kao što je dušik da bi se uklonio ostatak otapala te ostaju suhi, naelektrizirani ioni uzorka koji dalje idu u analizu u spektrometar masa. Matricom potpomognuta laserska ionizacija ili MALDI je široko rasprostranjena metoda za stvaranje intaktnih iona u plinovitoj fazi za analizu širokog spektra velikih, nehlapivih i termički nestabilnih spojeva kao što su proteini, oligonukleotidi i veliki anorganski spojevi. Prednost metode je što je priprema uzorka jednostavna te ima veliku toleranciju na kontaminaciju solima, puferima, deterdžentima i ostalim tvarima kao što su organska otapala, polimeri i lipidi. Uzorak se prvo otapa u otopini koja sadrži male organske molekule koji se naziva matrica. Te molekule moraju imati jaku apsorpciju na valnoj duljini lasera. Takva smjesa se suši prije analize te se uklanja svako otapalo koje se koristilo u pripremi smjese. Rezultat je nastajanje čvrste otopine kristala matrice pomiješanih s uzorkom. Molekule uzorka su ugrađene u matricu tako da su potpuno izolirane jedne od drugih. Daljnji proces se događa u uvjetima vakuuma unutar izvora spektra masa. Zračenje laserom uzrokuje brzo zagrijavanje kristala akumulacijom velike količine energije u kondenziranoj fazi pobuđivanjem

molekula matrice. Brzo zagrijavanje uzrokuje lokalnu sublimaciju kristala matrice te dijelovi površine kristala ekspandiraju u plinsku fazu, povlačeći sa sobom analit koji se tako nalazi u matričnom oblaku. Reakcije ionizacije mogu se dogoditi u bilo kojem trenutku tijekom procesa u vakuumu, ali još nije točno poznato kako se događa ionizacija. Najprihvaćeniji mehanizam stvaranja iona je mehanizam prijenosa protona u čvrstoj fazi prije desorpcije ili prijenos protona u oblaku koji se širi iz fotoioniziranih molekula matrice.⁶

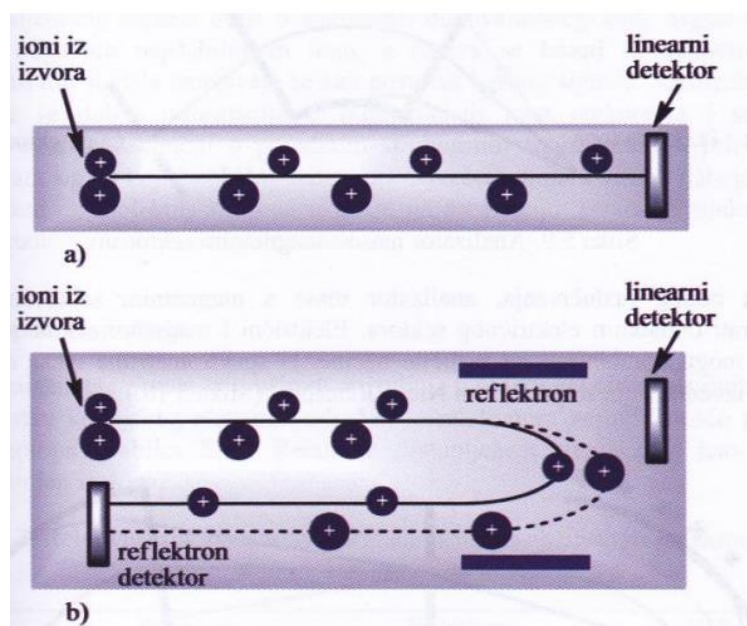
U fazi odjeljivanja ioni se ubrzavaju i razdvajaju u analizatoru masa na osnovu njihovog omjera mase i naboja. Ovisno o osjetljivosti, gornjoj granici omjera mase i naboja, razlučivanju i točnosti mjerenja bira se najpovoljniji analizator masa. Vrste analizatora masa su: kvadrupolni analizator mase, kvadrupolna stupica za ione, analizator mase vremena leta, analizator mase s magnetnim sektorom, orbitrap uz Fourierovu transformaciju i analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju. Kvadrupolni analizator mase ima najnižu gornju granicu omjera mase i naboja <3000 , najmanju razlučivost 2000-3000 i najmanju točnost mjerenja koja iznosi 0,1 dok analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju ima najveći raspon za gornju granicu omjera mase i naboja i razlučivosti s točnošću od 10^{-5} u.⁷ Najčešći analizatori masa prikazani su na slikama 4.- 7.



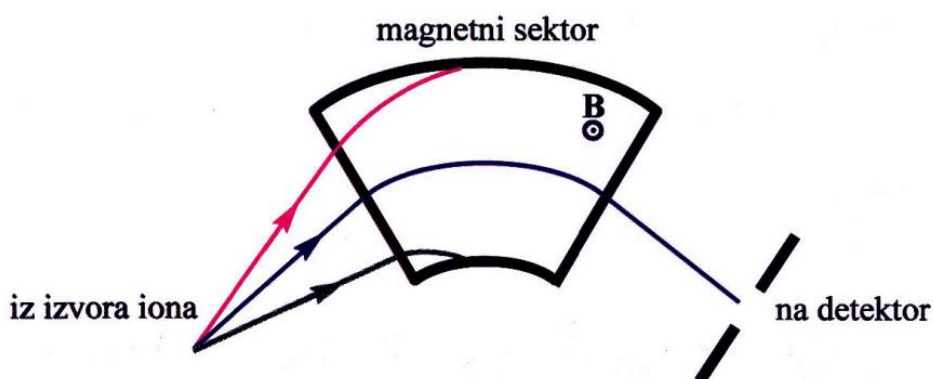
Slika 4. Kvadrupolni analizator mase.



Slika 5. Kvadrupolna stupica za ione.



Slika 6. Analizator mase vremena leta a) bez reflektiona, b) uz primjenu reflektiona.



Slika 7. Analizator mase s magnetnim selektorom.

U fazi detekcije razdvojeni ioni se detektiraju obično pomoću detektora kao što su elektronski multiplikator ili detektori sa pločom osjetljivom na ione koji stvaraju signal koji se dalje koristi za izradu spektra masa. Spektar masa prikazuje relativni intenzitet iona u funkciji omjera mase i naboja koji je karakterističan za određeni kemijski spoj što znači da pruža podatke o masi i strukturi analiziranog spoja. Stoga se spektrometrija masa koristi u identifikaciji i kvantifikaciji aktivnih sastojaka, određivanju nečistoća i metabolita u lijekovima kao i u mnogim drugim analizama.⁶

4.1. LC-MS

LC-MS metoda je metoda analize koja kombinira tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa te ova metoda omogućava analizu složenih uzoraka s velikom preciznošću zbog visoke separacijske moći tekućinske kromatografije uz visoku osjetljivost i specifičnost spektrometrije masa. Tekućinska kromatografija se može direktno povezati na spektrometar masa što ovu metodu čini još učinkovitijom, iako treba paziti pri odabiru pufera korištenog u tekućinskoj kromatografiji jer može utjecati na rezultate spektrometrije masa. Povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa malo je zahtjevnije nego sa NMR-om zbog toga što spektrometrija masa zahtjeva da uzorak bude u plinovitom stanju i ioniziran dok je u tekućinskoj kromatografiji uzorak u tekućem stanju. Spoj ovih dvaju uređaja omogućava trenutnu analizu svake komponente smjese koja izlazi iz kolone čime se dobiva informacija o masi i strukturi svake komponente smjese odijeljene kromatografijom. U Tablici 1. prikazane su vrste tekućinske kromatografije, tehnike ionizacije i analizatori masa prikladni za određeni uzorak.⁸

Tablica 1. Vrste tekućinske kromatografije, tehnike ionizacije i analizatori masa prikladni za određeni uzorak

UZORAK	KROMATOGRAFSKA METODA	TEHNIKA IONIZACIJE	ANALIZATOR MASA
proteini peptidi oligonukleotidi oligosaharidi	tekućinska kromatografija (LC)	ionizacija elektroraspršenjem (ESI), ionizacija brzim atomima (FAB), maricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)	analizator mase s magnetnim sektorom (B), kvadrupolni analizator mase (Q), analizator mase vremena leta (TOF)
polarni organski spojevi	plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija (LC)	kemijska ionizacija (CI), ionizacija elektroraspršenjem (ESI)	analizator mase s magnetnim sektorom (B), kvadrupolni analizator mase (Q)
nepolarni organski spojevi	plinska kromatografija (GC)	kemijska ionizacija (CI), ionizacija elektroraspršenjem (ESI)	analizator mase s magnetnim sektorom (B), kvadrupolni analizator mase (Q)
sintetički polimeri	/	maricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)	analizator mase s magnetnim sektorom (B), analizator mase vremena leta (TOF)

§ 5. ANALIZA ONEČIŠĆENJA LIJEKOVA

Kontrola i osiguranje kvalitete aktivnih te pomoćnih tvari u lijekovima glavni su cilj farmaceutske analize. Kontrola kvalitete lijekova analitičkim metodama ključna je za osiguranje njihove sigurnosti i djelotvornosti što je od velike važnosti za zaštitu zdravlja pacijenta. Međunarodna konferencija o harmonizaciji daje smjernice koje pokrivaju širok spektar tema u farmaceutskoj industriji od kojih je i kontrola kvalitete lijekova te za cilj ima usklađivanje smjernica i regulativa koji se primjenjuju diljem svijeta da bi se olakšao proces razvoja i proizvodnje lijekova te poboljšala njihova kvaliteta, sigurnost i učinkovitost.⁹ Pri pripravi lijeka mogu nastati onečišćenja koja mogu negativno utjecati na zdravlje čovjeka pa se moraju identificirati te ukloniti, a mogu nastati tijekom razgradnje ili reakcije aktivnog farmaceutskog sastojka (API) i drugih pomoćnih tvari ili mogu biti uneseni kao početna tvar. Njihova prisutnost može, čak i u malim količinama, utjecati na učinkovitost i sigurnost lijeka, pa je čistoća lijeka usko povezana sa njegovom kvalitetom. Nažalost, takva onečišćenja su neizbježna jer niti jedna kemijska reakcija nije potpuno selektivna, niti je bilo koji kemijski spoj potpuno stabilan u svim uvjetima. Stoga se prisutnost onečišćenja u određenim granicama koncentracije smatraju prihvatljivim. Identifikacija, kvantifikacija, kvalifikacija i kontrola onečišćenja ključan su korak u razvoju lijeka. Identifikacijom onečišćenja može se odrediti podrijetlo njegovog nastanka te prema tome se može pokušati smanjiti ili potpuno ukloniti prisutnost onečišćenja. Razvojem analitičkih metoda kao i njihovom osjetljivošću određivanje čistoće lijekova postalo je sve lakše i preciznije.

5.1. Vrste onečišćenja lijekova

Nečistoće (IMP-engl. *Impurities* i DP-engl. *Degradation products*) se klasificiraju na organske, anorganske i organske hlapive nečistoće te različiti polimorfni oblici. Organska onečišćenja nastaju tijekom procesa proizvodnje lijeka ili prilikom skladištenja ljekovite tvari ili farmaceutskog produkta. Mogu biti već identificirana ili neidentificirana, hlapiva ili nehlapiva, a mogu ući u lijek kao početna sirovina, međuprodukt, nusprodukt ili razgradni produkt, a rjeđe to mogu biti reagensi, ligandi i katalizatori koji mogu uzrokovati probleme. Anorganska onečišćenja mogu nastati iz različitih izvora i u različitim fazama proizvodnje. Najčešće su već poznata i identificirana, a obuhvaćaju reagense, ligande, katalizatore, anorganske soli i ostale

materijale poput silika gela, celuloze, drveni ugljen i teške metale. Hlapiva organska otapala su zaostale kemikalije koja se koriste u postupku proizvodnje, ili nastaju u samom procesu proizvodnje. Podijeljena su u tri skupine ovisno o potencijalnom riziku za ljudsko zdravlje. U prvu skupinu ubrajaju se otapala za koja je dokazano da imaju kancerogena svojstva ili postoje snažne sumnje na kancerogenost te otapala koja su opasna za okoliš. Druga skupina su otapala koja mogu dovesti do neurotoksičnosti, teratogenosti i drugih vrsta toksičnosti pa njihova upotreba treba biti ograničena. U treću skupinu spadaju otapala niske toksičnosti i malog rizika za ljudsko zdravlje. Ova otapala u niskim koncentracijama u lijekovima ne predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje.

Od posebne pozornosti je eventualno nastajanje kristalizacijskih onečišćenja. Svojstva lijeka ovise o njegovom kristalnom obliku te se provodi velika kontrola polimorfnih oblika. Polimorfi su različiti kristalni oblici iste čvrste tvari. Iako im je kemijski sastav isti, različit razmještaj atoma unutar kristala i različita konformacija molekula dovode do različitih fizikalnih svojstava polimorfa. Uz polimorfiju, kontroliraju se i stereokemijska onečišćenja. Receptori, enzimi i proteini su često selektivni za određene stereoizomere ili enantiomere stoga treba kontrolirati onečišćenje izomerima jer posljedice na organizam mogu biti razne potencijalno i toksične.¹⁰

5.2. LC-NMR u analizi nečistoća lijekova

Metoda LC-NMR je vrlo moćna u analizi nečistoća u lijekovima, ali postoje poteškoće koje mogu utjecati na točnost rezultata. Tri su glavna čimbenika odgovorna za takve poteškoće. Prvo je manja osjetljivost, odnosno razlika u količini uzorka potrebnog za dobivanje spektra NMR i one dostupne u piku LC. Drugo, pikovi LC su većeg volumena od LC-NMR ćelije tako da se ne koristi sav raspoloživi uzorak. Treće, širenje pikova u sustavu protoka može dovesti do toga da se cijeli pik ne koristi, iako se čini dovoljno uskim da bi mogao biti zarobljen u LC-NMR ćeliji.. Problem razlike u potrebnoj količini uzorka može se riješiti dodavanjem ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) između LC i NMR-a. Uvjet za ekstrakciju na čvrstoj fazi je taj da se željeni uzorak može dovoljno dugo zadržati na koloni SPE. Za stacionarnu fazu koriste se čestice silikagela ili aluminijeva oksida i slično. Onečišćenja lijekova kao i metaboliti lijekova i razgradni produkti lako se zadržavaju na koloni SPE. Pikovi dobiveni kromatografijom skladište se u kolone SPE. Kolone se zatim suše u struji dušika da bi se uklonilo otapalo. Prije

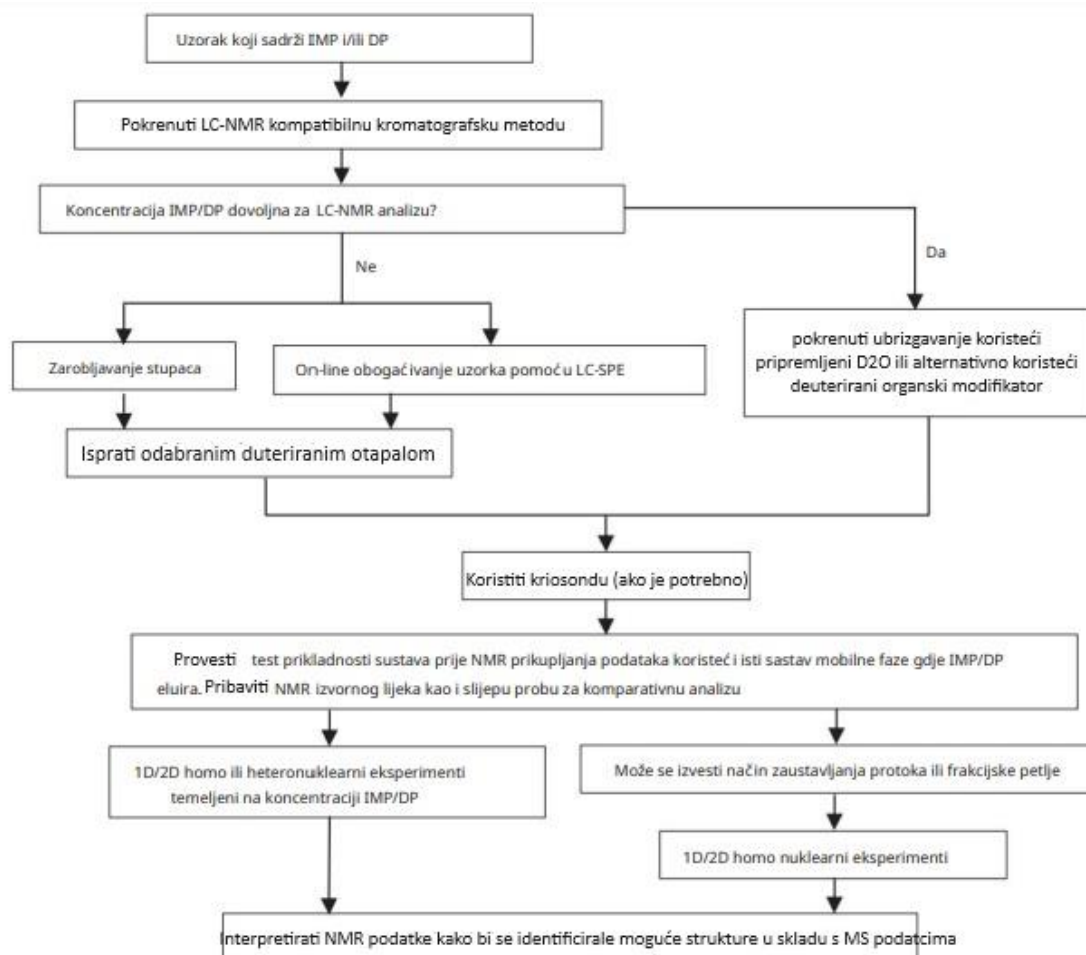
uvođenja u spektrometar NMR uzorak se ispiri s deuteriranim otapalom. Još jedna česta ograničenost sustava LC-NMR je nemogućnost detekcije ugljikovih atoma zbog niske koncentracije uzorka u eluentsu. Problem je riješen umetanjem sustava SPE u sustav LC-NMR kojim se ukoncentrirava uzorak te je moguće detektirati i ugljikove atome.

Uzorak se može pratiti kontinuiranim protokom tako da eluens dobiven kromatografijom ide u spektrometar pa se spektar dobiva kontinuirano i istovremeno s elucijom. Uzorak u takvom načinu analize mora biti koncentriraniji da bi se dobio kvalitetan spektar. Drugi način je zaustavljeni protok u kojem je kromatografija automatski zaustavljena čim je dobiven pik analita te se on dalje analizira u NMR-u. Kada se dobije spektar za dobiveni analit, kromatografija se nastavlja do dobivanja sljedećeg pika. Ova metoda je rasprostranjenija i više korištena zbog mogućnosti višestrukog analiziranja istog analita i pogodna je za detekciju i identifikaciju niskih koncentracija nečistoća u lijekovima.

Najniža koncentracija nečistoća u lijekovima pri kojoj se mogu prikupiti korisni podatci LC-NMR-om iznosi 0,06%, ali većina studija napravljena je pri koncentraciji od ~0,5%.¹¹ U mnogim slučajevima, struktura nečistoća u lijekovima temeljila se na podacima iz spektara ¹H i LC-COSY NMR koji su dodatno potkrijepljeni analizama LC-MS koje su rađene ili posebno ili korištenjem LC-NMR-MS sustava. Znanstvenici su radili na usavršavanju tehnike da bi se prevladala ograničenja i dobili što bolji i precizniji rezultati. U analizama izomera gdje LC-MS pokazuje istu masu i isti obrazac fragmentacije, LC-NMR koristi se kao zadnji korak za potvrdu njihovog identiteta.

Na slici 8. prikazana je shema za struktorno određivanje nečistoća koristeći tehniku LC-NMR. U prvom koraku izabire se LC-NMR kompatibilna kromatografska metoda koja se izvodi korištenjem nedeuterirane mobilne faze. Ako su koncentracije IMP-a i DP-a dovoljne za provođenje analize koristi se mobilna faza gdje je ili jedna komponenta deuterirana ili vodena komponenta i deuterirani organski modifikator. Ako koncentracije nisu dovoljne uzorak se ukoncentrirava ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Osjetljivost se dalje može povećati upotrebom krio-probe. Prije stavljanja pika u protočnu ćeliju i prikupljanja podataka provodi se test prikladnosti sustava korištenjem 0,5% CHCl₃ u CDCl₃. Paralelno se bilježe podatci za slijepu probu i roditeljski lijek za komparativnu analizu NMR podataka. U ovisnosti o koncentraciji

DP-a/IMP-a mogu se dobiti 1D ili 2D homo ili hetero-nuklearni spektri. Usporedbom promjena u kemijskim pomacima i povezivanju određuje se njihova struktura.¹²



Slika 8. Shema za strukturalno objašnjenje nečistoća koristeći tehniku LC-NMR.

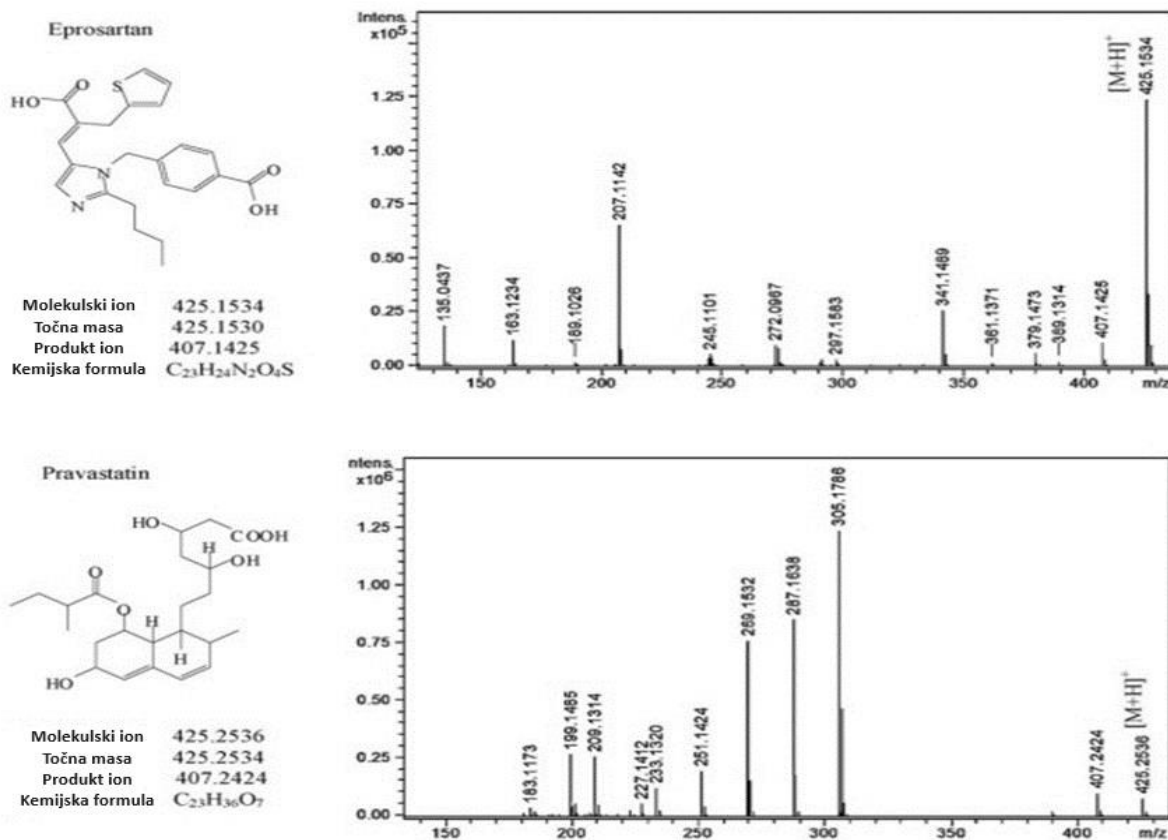
5.3. LC-MS u analizi nečistoća lijekova

Tehnika LC-MS je jedna od najmoćnijih tehnika za analizu nečistoća u lijekovima jer daje gotovo nedvosmisleno informacije o njihovoj strukturi bez upotrebe dodatnih metoda. Doživjela je najbržu i najvišu razinu napretka te je niz instrumenata za njegovo provođenje komercijalno dostupan:

- LC-MS (s pojedinačnim kvadrupolnim analizatorom masa)
- LC-MS (s trostrukim kvadrupolnim analizatorom masa)

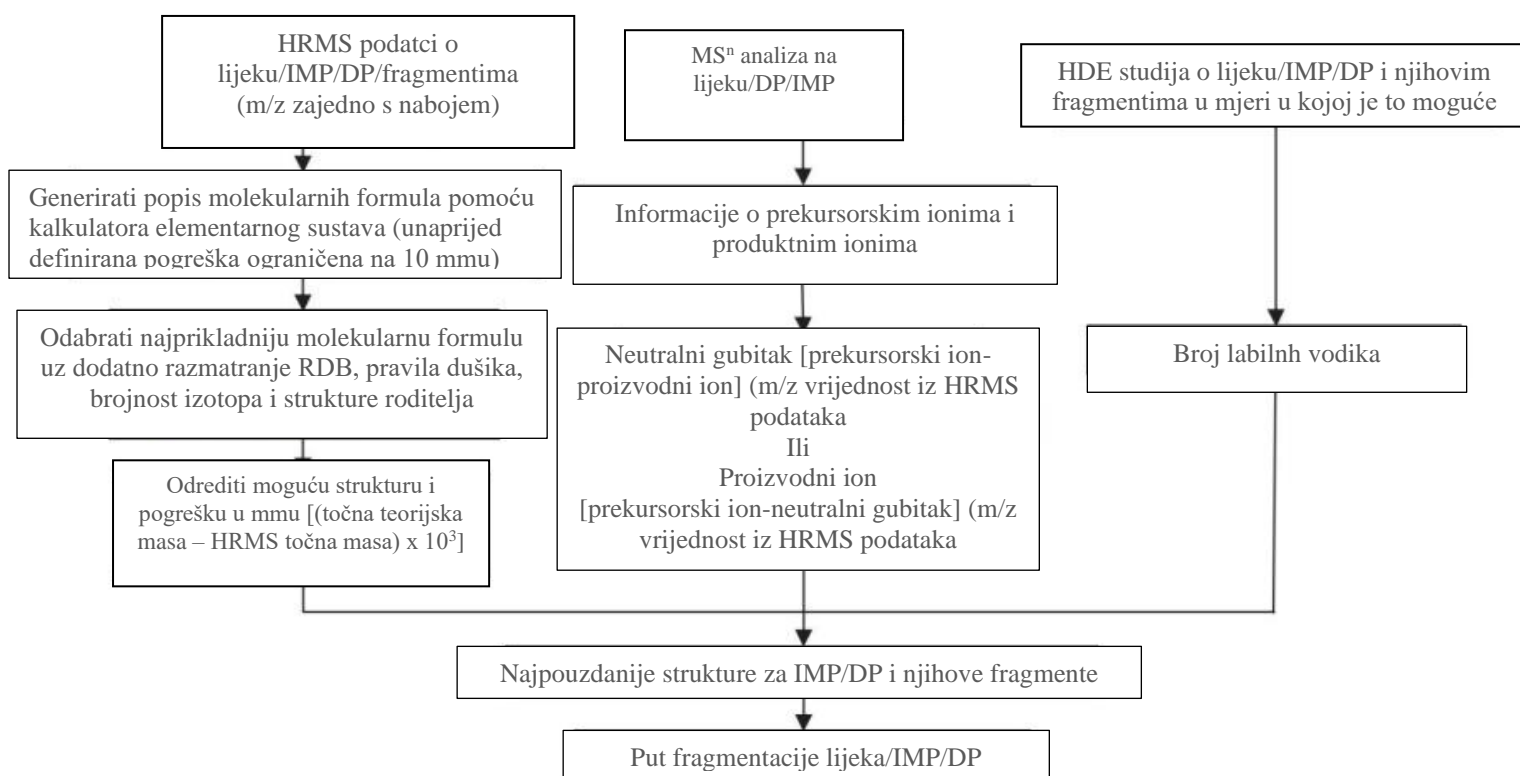
- LC-TOF
- LC-MS-TOF
- LC-MS_3DTRAP
- LC-MS-2DTRAP
- LC-Hybrid Trap TOF sustavi

Instrumenti se mogu koristiti zasebno ili kombinirati u ovisnosti o njihovoj korisnosti i informacijama koje su potrebne. U principu, tri su osnovne metode za dobivanje strukture IMP/DP-a, a to su: spektrometrija masa visoke rezolucije (HRMS), višestupanjska spektrometrija masa (MS^n), i spektrometrija masa s izmjenom vodika i deuterija (HDE-MS). Pojava tehnologije mjerenja vremena (TOF) za spektrometriju masa visoke rezolucije rezultirala je znatnim poboljšanjem razlučivosti i točnosti zbog mogućnosti pružanja točne mase na 4-6 decimala, što također pomaže u određivanju točnog sastava elemenata.¹³ Primjer tome su dva lijeka, eprosartan i pravastatin, s vrlo različitim strukturama, ali vrlo sličnim masama. Na temelju točne mase mogu se vrlo lako razlikovati, a dodatno iz usporedbe njihovih profila fragmentacije. Na Slici 9. prikazane su strukture, točne mase i profili fragmentacije.



Slika 9. Strukture eprosartana i pravastatina i profili njihove fragmentacije dobiveni spektrometrijom masa.

Višestupanjske spektrometrije masa pogotovo iza MS^2 (uglavnom se provode do MS^7) često daju bogate informacije o podrijetlu promatranih fragmenata iona i njihovoj daljnjoj sudbini. Korištenjem podataka MS^n lako se može odrediti uzorak fragmentacije lijeka kao i DP-a/IMP-a. Usporedbom dobivenih podataka lako se može predvidjeti točna struktura analita. Rezultatima dobivenim iz MS^n mogu se čak razlikovati i ioni istog omjera mase i naboja. HDE-MS daje informacije o broju izmjenjivih vodika u strukturi pa time i prisutnost funkcijskih skupina kao što su hidroksilna (-OH), amino (-NH ili -NH₂), tiolna (-SH), karboksilna (-COOH) skupina i druge. Također, koristi se u izboru najbolje moguće strukture među sličnim strukturama istog sastava elemenata i sličnog uzorka fragmentacije dobivenih analizama HRMS i MS^n .



Slika 10. Shema za određivanje strukture DP-a i IMP-a analizom LC-MS

Na slici 10. prikazana je shema za određivanje strukture nečistoća u lijekovima analizom LC-MS. HRMS podatci prikupljaju se tehnikom TOF, a pogreška za dobivene rezultate iznosi samo 1ppm. Prema dobivenim rezultatima određuje se molekulska formula i pritom se treba paziti da se koristi točna vrijednost naboja. Nakon određivanja molekulske formule određuje se moguća struktura uz dodatne podatke kao što su RDB, pravilo dušika, brojnost izotopa, struktura roditelja. RDB predstavlja broj prstenova i dvostrukih veza, a predviđaju se iz točnih podataka

o sastavu. Prema pravilu o dušiku, spoj čija je masa neparni broj može imati samo neparni broj dušikovih atoma, a ako je parni broj ili nema dušika ili ih ima paran broj. Nakon što su predviđene strukture fragmenata, podatci MSⁿ koriste se za prikazivanje povezanosti i odnosa između molekulskih iona i produkata. Snimanje spektara H/D izmjene izvodi se korištenjem D₂O u mobilnoj fazi. Iako ovaj pristup štedi na visokim troškovima deuteriranih otapala, dobivena djelomična izmjena treba se tumačiti s oprezom te usporediti s podacima dobivenim drugim metodama. Na temelju svih dobivenih podataka odredi se najprikladnija strukturna formula koja zadovoljava rezultate svih navedenih dobivenih rezultata. Objašnjenje strukture smatra se dovršenim ako se može opisati mehanizam za dobivanje određenog DP-a ili IMP-a. u glavnom bi to trebalo biti moguće kroz standardne kemijske reakcije ili mehanizme.¹²

§ 6. ZAKLJUČAK

Primjena tekućinske kromatografije spregnute s nuklearnom magnetnog rezonancom (LC-NMR) i tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (LC-MS) donosi značajne prednosti u analizi i karakterizaciji nečistoća u lijekovima. Ove metode omogućuju vrlo točnu analizu profila čistoće lijekova i daju strukturne informacije o nečistoćama koje su ključne za razumijevanje njihovog podrijetla i potencijalnog utjecaja na sigurnost i učinkovitost lijeka

Kombinacija metoda LC-NMR i LC-MS omogućava brzu i učinkovitu identifikaciju onečišćenja bez potrebe za njihovom prethodnom izolacijom što znatno ubrzava proces razvoja novih lijekova i osigurava visoku razinu kontrole kvalitete. Sprezanje ovih metoda analize omogućuje znanstvenicima i farmaceutima dublji uvid u složene kemijske procese koji mogu dovesti do nastanka nečistoća i optimizaciju procesa proizvodnje da bi se minimizirala prisutnost onečišćenja

Uporaba navedenih metoda ima ulogu i u usklađivanju sa regulatornim zahtjevima postavljenim za farmaceutsku industriju na globalnoj razini. Osiguravaju da lijekovi ispunjavaju najviše standarde sigurnosti i učinkovitosti čime se doprinosi zaštiti zdravlja pacijenata. Kako tehnologija napreduje, ove metode će postati još sofisticiranije i pristupačnije te će se kvaliteta i sigurnost još više poboljšati.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S.X. Peng, B. Borah, R. L. Dobson, orah, R. L. Dobson,, Y. D. Liu, S. Pikul, *Application of LC-NMR and LC-MS to the identification of degradation products of a protease inhibitor in dosage formulations*, J Pharm Biomed Anal, 1999., 75.-89.
2. O. Coskun, *Separation techniques: Chromatography*, 2016.
3. *Elution Chromatography*, 13. svibnja 2024., *Britannica*
<https://www.britannica.com/science/chromatography/Elution-chromatography> (datum pristupa (28. lipnja 2024.)
4. H. Gunther, *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 2013., Third edition
5. I. Habinovec, *Spregnute tehnike u analizi metabolite lijekova*, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
6. J. J. Pitt, *Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry*, Clin Biochem Rev., 2009., 19.-34.
7. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013. str. 78 – 88.
8. A. Tolonen, M. Turpeinen, O. Pelkonen, *Liquid chromatography-mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening*, Drug Discov. Today, 14 (2009), str. 120-133
9. S. R. Shah, M. A. Patel, M. V. Naik, P. Pradhan, U. Upadhyay, *Recent approaches of „impurity profiling“ in pharmaceutical analysis*: J Pharm Sci Res 2012., 3603–3617.
10. M. Sertić, *Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom*, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.,5.-10.
11. N. Mistry, I.M. Ismail, M.S. Smith, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *Characterization of impurities in bulk drug batches of fluticasone propionate using directly coupled HPLC-NMR spectroscopy and HPLC-MS*, J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (1997) 697–705.
12. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shah, *A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products*, J Pharm Biomed Anal, 2012., 148.-173.
13. K. Imatani, *Advances in Q-TOF LC/MS systems for pharma applications*, 2008., American Laboratory, 12.-16.