Razvoj UPLC metode za odjeljivanje enantiomera tetramizola

Poljak, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:361503

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Tea Poljak

Razvoj UPLC metode za odjeljivanje enantiomera tetramizola

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Industrijska farmacija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je u Plivi Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj pod stručnim vodstvom dr. sc. Biserke Cetine-Čižmek, znanstvene savjetnice.

Želim se zahvaliti mentorici dr. sc. Biserki Cetini-Čižmek na pruženoj prilici, povjerenju i stečenom iskustvu koje ću pamtiti. Veliko hvala dr. sc. Sanji Radman na velikom strpljenju, trudu, pomoći i prenesenom znanju tijekom izrade ovog rada. Hvala prof. dr. sc. Biljani Nigović koja nas je osim znanja učila i najvažnijim životnim vrijednostima koje će me voditi dalje kroz život. Hvala svim dragim prijateljima i kolegama koji su me podržavali, hrabrili i motivirali tijekom studiranja. Na kraju, najveće hvala cijeloj obitelji, najviše roditeljima, bez čije velike podrške, ljubavi i odricanja danas ne bih bila ovdje gdje jesam. Ukratko, hvala svima koji su me trpjeli i voljeli u trenucima kada je to bilo nemoguće.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Enantiomeri 1
1.2. Antihelmintici 4
1.3. Kromatografske metode odjeljivanja 6
1.3.1. Kromatografski parametri i kvantitativna analiza 8
1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 10
1.4.1. Stacionarna i mobilna faza 11
1.4.2. Tekućinski kromatograf 12
1.4.3. Primjena HPLC tehnike 13
1.4.4. Odjeljivanje enantiomera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti 13
1.4.5. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC) 14
1.5. Onečišćenja u lijekovima 15
1.5.1. Kontrola onečišćenja 16
1.5.2. Analiza onečišćenja 17
1.6. Validacija analitičke metode 18
2. OBRAZLOŽENJE TEME 19
3. MATERIJALI I METODE 20
3.1. Materijali 20
3.2. Metode 22
3.2.1. Priprema temeljne standardne otopine i razrijeđene otopine 22
3.2.2. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na kiralnim kolonama: ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 i Chiralpak IC-3 22
3.2.3. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnim kolonama (Phoroshell PFP i BEH C18) 23
3.2.4. Validacija optimalne metode 23
4. REZULTATI 25

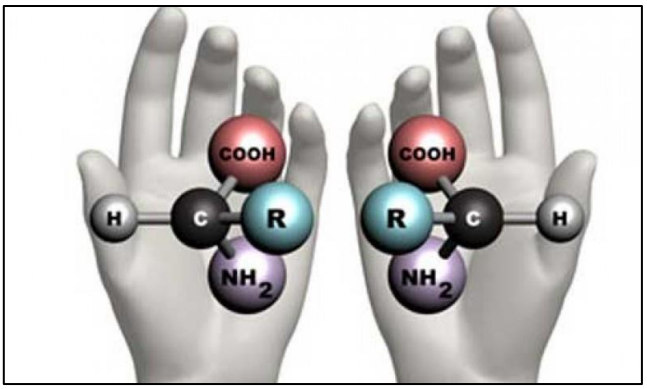
4.1. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na kiralnim kolonama: ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 i Chiralpak IC-3 25
4.2. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnim kolonama (Poroshell PFP i BEH C18) 29
4.3. Validacija optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 30
4.3.1. Linearnost 30
4.3.2. Točnost 31
4.3.3. Ponovljivost 32
4.3.4. Robusnost 32
4.3.5. Specifičnost 38
4.4. Validacija optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na Chiralpak IC-3 koloni 38
4.4.1. Linearnost 38
4.4.2. Točnost 40
4.4.3. Ponovljivost 40
4.4.4. Robusnost 40
4.4.5. Specifičnost 44
5. RASPRAVA 45
5.1. Priprema temeljne standardne otopine i razrijeđene otopine 45
5.2. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na kiralnim kolonama: ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 i Chiralpak IC-3 45
5.3. Testiranje optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnim kolonama (Poroshell PFP i BEH C18) 46
5.4. Validacija optimalne metode za odjeljivanje enantiomera 47
6. ZAKLJUČCI 50
7. LITERATURA 51
8. SAŽETAK/SUMMARY 54

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1. Enantiomeri

Od davnina mnogi su znanstvenici pokušavali razumjeti optičku aktivnost povezujući je sa stereoizomerijom (Pine, 1994). Stereoizomeri su spojevi koji imaju istu molekulsku formulu, isti raspored kovalentnih veza, ali različiti raspored atoma ili skupina u prostoru. Dijele se na konformacijske i konfiguracijske izomere, a konfiguracijski se opet dijele na optičke i geometrijske izomere. Enantiomeri, uz dijastereomere, pripadaju optičkim stereoizomerima. To su molekule koje se odnose kao predmet i njegova zrcalna slika te se međusobno ne mogu preklopiti. Nazivaju se i kiralnim molekulama jer se odnose kao desna i lijeva ruka (grč. *χειρ (cheir)* – ruka) (Šinko, 2005) (Slika 1).

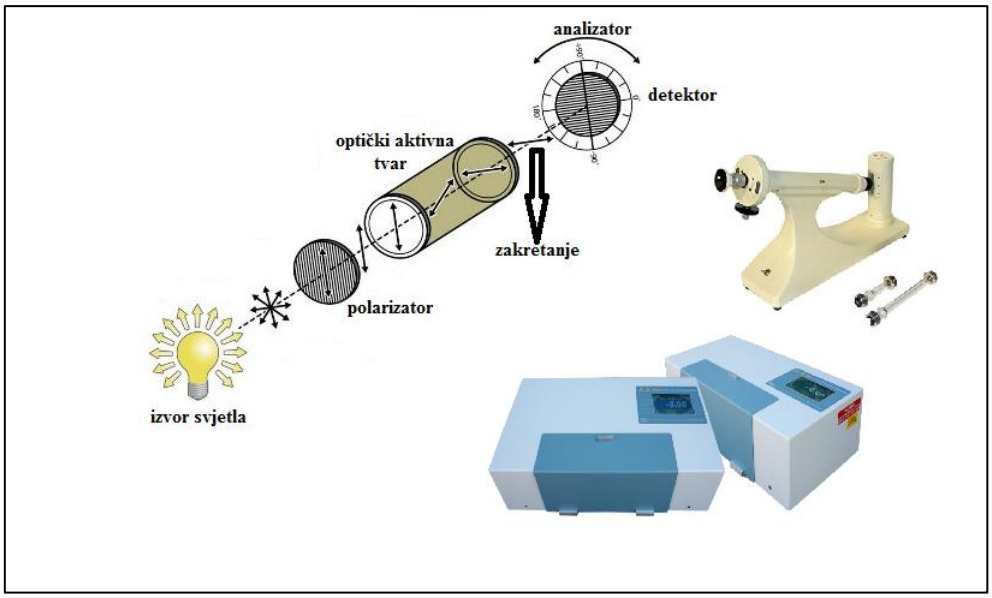


Slika 1. Prikaz zrcalnog odnosa enantiomera

Kiralna molekula posljedica je asimetrije, tj. odsutnosti bilo kojeg elementa simetrije molekule. Jedan od najlakših načina određivanja kiralnosti molekule jest pronalaženje kiralnog centra (atoma ugljika, dušika, fosfora, sumpora i drugih) na koji su vezana četiri različita supstituenta. Što je veći broj kiralnih centara, veći je i broj stereoizomera te tako najveći mogući broj stereoizomera iznosi 2^n, pri čemu n označava broj kiralnih centara (Šinko, 2005; Pine, 1994).

Francuski fizičar Jean-Baptiste Biot je 1815. godine prvi primijetio svojstvo enantiomera da zakreću ravninu polariziranog svjetla (Šinko, 2005). Polarimetrija se još i danas primjenjuje za razlikovanje enantiomera koja pridonosi nomenklaturi kiralnih spojeva. Otopina ispitivanog spoja stavi se u polarimetar, nakon prolaska polariziranog svjetla kroz otopinu mjeri se smjer zakretanja njegove ravnine – ako dođe do rotacije u smjeru kazaljke na satu, zaključujemo da je uzorak desnozakrećući te se označava s (+), a ako dođe do rotacije u

suprotnom smjeru, zaključujemo da se radi o lijevozakrećućem uzorku (-) (Pine, 1994) (Slika 2).



Slika 2. Dijelovi polarimetra i njegov izgled

Polarimetar s mogućnošću očitavanja na 0,01° koristi se za mjerenje kuta optičkog zakretanja. Kut optičkog zakretanja opisuje za koliko stupnjeva optički aktivna tekućina ili otopina optički aktivne tvari zakreće ravninu polarizacije svjetlosti valne duljine D-linije natrijeva spektra (λ=589,3 nm) pri temperaturi 20±0,5°C u sloju tekućine od 1 dm. Na temelju izmjerenog kuta optičkog zakretanja možemo izračunati specifično optičko zakretanje koje se definira kao kut zakretanja ravnine polarizacije svjetlosti valne duljine D-linije natrijeva spektra pri temperaturi 20±0,5°C, u sloju od 1 dm, otopine koja u 1 mL sadrži 1 g optički aktivne tvari. Specifično optičko zakretanje za optički aktivne tekućine računa se prema:

$$\alpha_D^{20} = \frac{\alpha}{l \times d_{20}}$$

a za otopine optički aktivnih tvari prema:

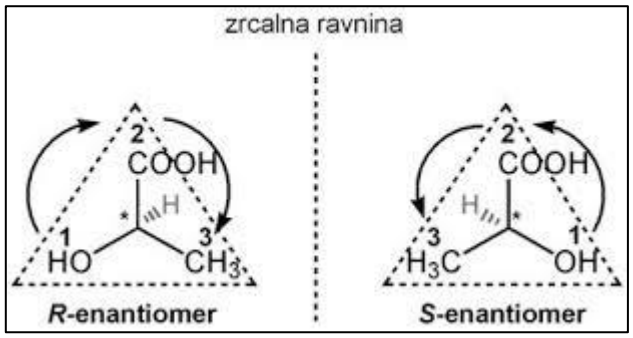
$$\alpha_D^{20} = \frac{1000\,\alpha}{l \times c}$$

pri čemu je α izmjereni kut optičkog zakretanja, l je debljina sloja (dm), d je relativna gustoća tekućine i c je koncentracija otopine (g/L) (Nigović, 2014a; Nigović i sur., 2014b).

Međutim, svi kiralni spojevi ne moraju nužno pokazivati optičku aktivnost. Ako kiralni spoj ne pokazuje optičku aktivnost jer predstavlja smjesu jednakih količina enantiomera, naziva se racemičnim i označava se (±). Određivanje specifičnog optičkog zakretanja koristi se u

ispitivanju čistoće kiralnih farmaceutskih sirovina, za potvrdu identiteta te određivanje sadržaja tvari (Pine, 1994; Nigović i sur., 2014b).

Drugi sustav nomenklature, Cahn–Ingold–Prelogova (CIP) nomenklatura, označava apsolutne strukture kiralnog centra oznakama konfiguracije R (lat. rectus – desno) i S (lat. sinister – lijevo) s obzirom na raspored prioritetnih skupina oko kiralnog, asimetričnog centra (Slika 3). Supstituenti se rangiraju prema atomskom broju atoma vezanog na kiralni centar te atomi većeg atomskog broja imaju viši prioritet. Ako dva supstituenta imaju isti prioritet, rangiraju se sljedeći atomi vezani na prvi atom dok se ne uoči razlika. Višestruke veze promatraju se kao odgovarajući broj jednostrukih veza s atomom istog atomskog broja.



Slika 3. CIP nomenklatura enantiomera mliječne kiseline

Godine 1847. francuski kemičar Louis Pasteur opazio je prvo spontano razdvajanje enantiomera prilikom kristalizacije jednog organskog spoja, natrijeva amonijeva tartarata. Fizički je odvojio „lijeve“ i „desne“ kristale i opazio je da zakreću ravninu polarizirane svjetlosti u različitom smjeru. Isti učinak na zakretanje polariziranog svjetla imala je otopina „lijevih“, odnosno „desnih“ kristala. Miješanjem iste količine „lijevih“ i „desnih“ kristala nastala je otopina koja nije pokazivala nikakvu optičku aktivnost. Pasteur je ovu pojavu pripisao nedostatku simetrije samih molekula vinske kiseline i nazvao je *dyssimétrie moléculaire* (Molčanov i Kojić-Prodić, 2007).

Godine 1874. Jacobus Henricus van't Hoff i Joseph Achille Le Bel neovisno jedan o drugome postavljaju teoriju podrijetla optičke aktivnosti na osnovi prostornog, trodimenzionalnog modela molekula (Šinko, 2005).

Uz polarimetriju su važne metode za analizu enantiomera cirkularni dikroizam (CD), rendgenska difrakcija (kristalografija) i kiralna kromatografija o kojoj će više govora biti u nastavku rada.

Danas gotovo svi lijekovi prirodnog porijekla imaju jedan ili više kiralnih centara, a oko 40% sintetičkih lijekova ima barem jedan kiralni centar. U terapiji se pretežito koriste racemati sintetičkih kiralnih lijekova zbog ekonomičnosti proizvodnje, iako kod metaboličkih reakcija kao i kod terapijskog i/ili toksičnog učinka lijeka do izražaja dolazi stereoselektivnost reakcije biotransformacije (Rendić i Medić-Šarić, 2013a). Primjer je lijek varfarin koji je racemična smjesa S-varfarina i R-varfarina, pri čemu je S-varfarin dva do pet puta djelotvorniji s obzirom na antikoagulativni učinak u odnosu na R-varfarin (www.almp.hr). Drugi primjer je lijek bikalutamid čiji gotovo sav antiandrogeni učinak potječe od R-enantiomera kojem je poluvrijeme eliminacije iz plazme oko tjedan dana (www.halmed.hr). U ljekovitoj tvari koja je racemat, polovina doze koja je terapijski neaktivna predstavlja nečistoću lijeka. Prema ICH smjernicama specifikacija lijekova treba sadržavati točan način određivanja enantiomernog sastava, određivanje enantiomerne čistoće lijekova te kliničko ispitivanje za svaki enantiomer. Sve je veća težnja za uvođenjem enantiomerno čistih oblika lijekova, ali i drugih biološki aktivnih spojeva (pesticidi, dodatci hrani, zaslađivači) jer su djelotvorniji od racemičnih smjesa, doza je reducirana, smanjena je toksičnost tvari te je pojednostavljeno praćenje djelovanja lijeka. Enantiomeri imaju ista fizička svojstva i ne daju se odvojiti uobičajenim laboratorijskim metodama, već se koriste separacijske ili sintetske metode – kokristalizacija s enantiomerno čistim reagensima, kromatografija s kiralnim stacionarnim fazama ili sinteze sa stereoselektivnim katalizatorima ili enzimskim kataliziranim reakcijama (Nigović, 2014a; Rendić, Medić-Šarić, 2013a; Šinko, 2005; Pine, 1994). Međutim, zbog visokih troškova pripreme enantiomerno čistih lijekova većina ih se ipak primjenjuje kao racemati. Primjer enantiomerno čistog lijeka je sintetski antibiotik iz skupine fluorokinolona levofloksacin koji je S-enantiomer racemične tvari ofloksacina (www.halmed.hr)

1.2. Antihelmintici

Helminti (grč. *έλμι(ν)ς*, genitiv *έλμινος (Helminthes)* - crv) (www.enciklopedija.hr) su višestanični organizmi, crijevni i filarijalni paraziti koji inficiraju velik broj ljudi i uzrokuju veći broj različitih bolesti. U većini slučajeva, posebice u zemljama u razvoju, glavni cilj liječenja jest kontrola infekcije. Potpuno odstranjivanje parazita može biti izazov kod određenih helmintičnih infekcija zbog ograničene djelotvornosti lijekova i ponovne infekcije nakon završetka liječenja u endemičnim područjima. Ove su infekcije još veći problem kod

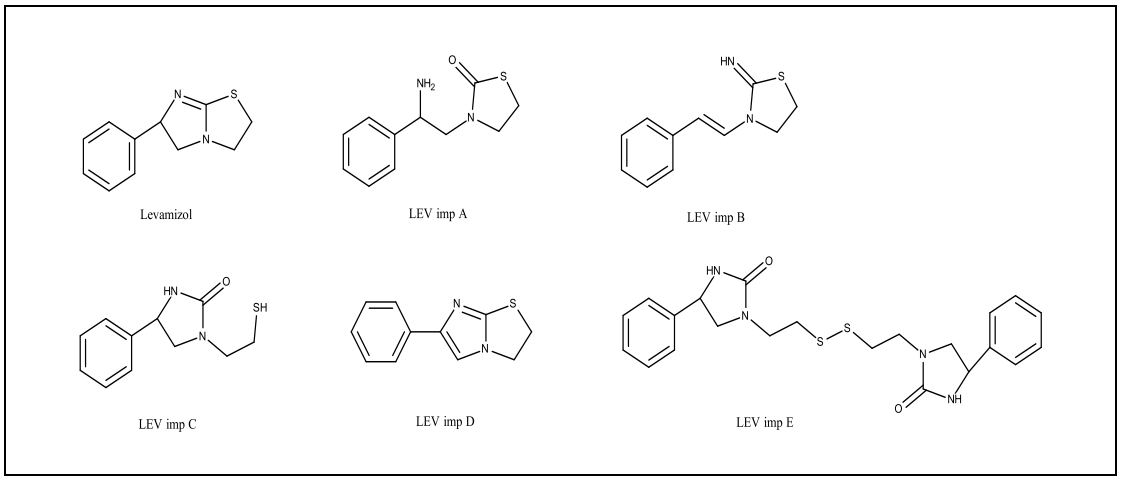
domaćih životinja. Danas postoje brojni lijekovi protiv helmintičnih infekcija usmjereni protiv niza različitih ciljeva (Katzung i sur., 2011).

Antihelmintici se dijele prema kemijskoj strukturi (Medić-Šarić, 2013):

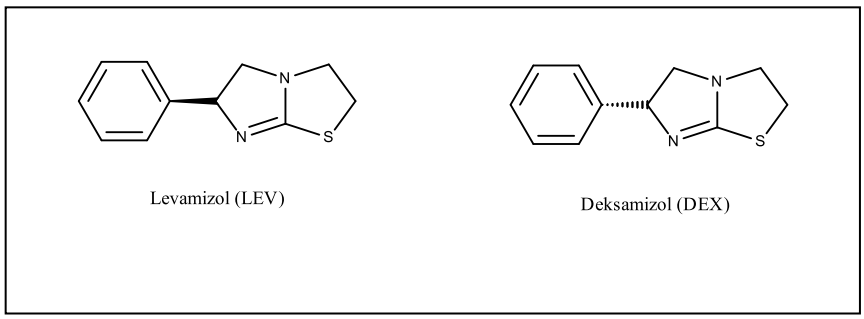
1) Spojevi s aluminijem
2) Spojevi s antimonom - stibofen, stibokaptal
3) Spojevi s kositrom - Sn, SnO_2, $SnCl_4$
4) Derivati benzimidazola - mebendazol, tiabendazol, albendazol
5) Imidazoltiazoli – tetramizol
6) Derivati klorsalicilne kiseline – niklozamid
7) Derivati piperazina – piperazin
8) Tetrahidropirimidini - pirantel-embonat

Imidazotiazoli su heterocikličke molekule važne u metabolizmu živih stanica. Interesu istraživanja doprinosi mogućnost širokog spektra djelovanja (protuupalno, antikancerogeno, antioksidativno, protuvirusno i antimikrobno). Najvažniji derivat imidazotiazola je levamizol (Slika 4) (Fascio i sur., 2015).

Levamizol (LEV), aktivniji izomer racemične smjese tetramizola (Slika 5) i pripadnik skupine imidazotiazola, kao antihelmintik djeluje na metabolički i živčani sustav nematoda. Povećanjem koncentracije antihelmintika dolazi do depolarizacije membrane, što uzrokuje kontrakcije i spastičnu paralizu mišića parazita. U vrlo visokim koncentracijama ($> 10^{-3}$ M) inhibira fumarat reduktazu u metaboličkom putu parazita (Martin, 1997; Coles i sur., 1975). Koristi se i kao imunomodulator u liječenju raka debelog crijeva, raka vrata i glave te melanoma u kombinaciji s drugim kemoterapeuticima (www.pharmacygeoff.md). Kao imunomodulator potiče staničnu imunost, aktivaciju i proliferaciju T-limfocita te omogućava funkcije monocita i makrofaga, uključujući fagocitozu, kemotaksiju, povećanu pokretljivost i adherenciju. Preporučena dnevna doza levamizola iznosi 150 mg. Neki od štetnih učinaka levamizola su glavobolja, konfuzija, vrtoglavica, kutana vaskulopatija, agranulocitoza, trombocitopenija, leukopenija, mijalgija itd. (home.intekom.com).



Slika 4. Strukture levamizola i njegovih specifičnih onečišćenja (Council of Europe, 2013a)



Slika 5. Tetramizol– racemična smjesa levamizola (LEV) i deksamizola (DEX)

1.3. Kromatografske metode odjeljivanja

Kromatografske metode odjeljivanja analitički su vrlo široko primijenjene. Pod pojmom kromatografskih metoda podrazumijeva se skup kromatografskih postupaka koji omogućuju odjeljivanje, a potom selektivno i osjetljivo dokazivanje/određivanje sastavnica u multikomponentnim uzorcima (smjesama). Tvari koje treba odijeliti podvrgnute su ponovljenim razdiobama između dvije faze, nepokretne (stacionarne) faze koja može biti čvrsta tvar ili tekućina i pokretne (mobilne) faze koja može biti plin, tekućina ili superkritični fluid.

Kromatografske tehnike odjeljivanja temelje se na adsorpciji, razdjeljenju, ionskoj izmjeni ili isključenju (razlici fizikalno-kemijskih svojstava molekule) koje omogućuju odjeljivanje sastojaka iz smjese. Uzorak koji je otopljen u mobilnoj fazi kreće se preko stacionarne faze koja je krutina, tekućina nanesena na krutinu ili gel u koloni ili na plohi (Tablica 1). Možemo

reći da se kromatografski postupci odjeljivanja temelje na odnosu ravnotežnih koncentracija uspostavljenih u dvije faze (stacionarna faza velike površine i mobilna faza koja prelazi preko stacionarne faze) (Luterotti, 2011a).

Tablica 1. Klasifikacija kromatografskih metoda odjeljivanja prema prirodi faza i silama koje utječu na odjeljivanje

Mehanizam odjeljivanja	Stacionarna faza	Mobilna faza	Metoda
adsorpcija	krutina	tekućina	LSC, TLC
		plin	GSC
razdjeljenje	tekućina nanesena na čvrsti nosač	tekućina	HPLC, LLC, PC, TLC
		plin	GLC
		superkritični fluid	SFC
ionska izmjena	krutina	tekućina	IC, TLC
isključenje	krutina	tekućina	SEC

Kromatografska analiza uključuje:

1) adsorpciju supstanca na stacionarnu fazu
2) odjeljivanje adsorbiranih supstanca kontinuiranim protokom mobilne faze
3) sakupljanje odvojenih supstanca progresivnom eluacijom
4) kvalitativnu ili kvantitativnu analizu odvojenih i sakupljenih tvari.

Kromatografski postupak može se provoditi na koloni (stupcu) ili na ravnoj plohi (papir ili tanki sloj). Kolonski kromatografski postupci najčešće se koriste u svrhu odjeljivanja, ukoncentriravanja, u svrhu kvantitativne analize ili u preparativne svrhe. Primjeri kolonskih kromatografskih postupaka su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC), plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*, GC), kromatografija sa superkritičnim fluidom (eng. *supercritical fluid chromatography*, SFC) itd. Zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata zove se kromatogram, na kojem je prikaz kromatografskih krivulja (eng. *peak*) ili pikova pojedinih sastavnica. Razlikujemo plošne i diferencijalne kromatograme s obzirom na tip razvijanja kromatograma (Tablica 2).

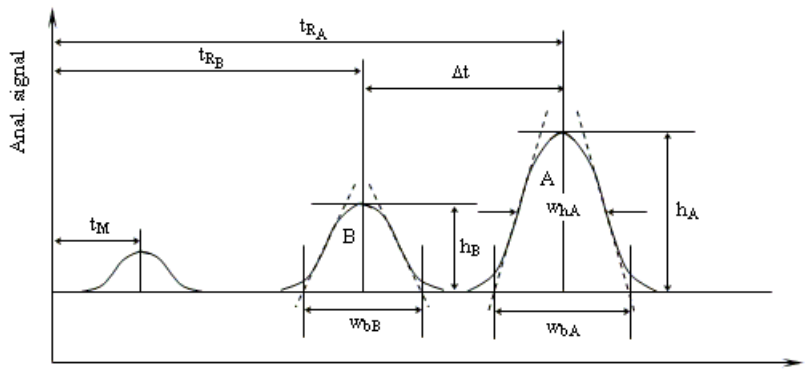
Tablica 2. Prikaz dobivanja plošnih i diferencijalnih kromatograma

Plošni kromatogram	Diferencijalni kromatogram
- razne sastavnice uzorka prelaze različite udaljenosti u istom vremenu, pa se po završetku odjeljivanja detektiraju na stacionarnoj fazi	- sve sastavnice prelaze isti put, ali zbog specifičnih interakcija sa stacionarnom fazom na izlazu iz kolone pojavljuju se u različitom vremenu, detektira ih se izvan stacionarne faze
- plošne tehnike – PC, TLC	- kolonske tehnike – HPLC, GC, SFC
- stacionarna faza je ploha/na plohi	- stacionarna faza je kolona
- mobilna faza kreće se silama kapilariteta ili pod utjecajem gravitacije preko stacionarne faze	

1.3.1. Kromatografski parametri i kvantitativna analiza

Optimiranjem kromatografskih parametara postiže se uspješnost kromatografskog razdvajanja.

Pik na kromatogramu definira se vremenom zadržavanja (t_R) i širinom pika na polovici visine ($W_{1/2}$). t_{RA} i t_{RB} opisuju vrijeme zadržavanja pojedinih sastavnica A i B, tj. vrijeme potrebno pojedinoj sastavnici da nakon nanošenja uzorka stigne u detektor dok su w_{bA} i w_{bB} širine pikova na baznoj liniji, a w_{hA} i w_{hB} širina pika na polovici visine pika (h) (Slika 6).



Slika 6. Kromatogram i kromatografski parametri – zadržano vrijeme (t_M), vrijeme zadržavanja (t_R), širina na polovici visine pika (W_h), visina pika (h)

Poznavajući vrijeme zadržavanja sastavnice i brzine protoka mobilne faze (ν), može se izračunati volumen mobilne faze potreban da analit dođe do detektora (volumen zadržavanja, V_R) (Nigović, 2014c; Luterotti, 2011a).

$$V_R = t_R \, v$$

Vrijeme potrebno da sastavnice prođu kroz kolonu ovisi o faktoru kapaciteta (k'), tj. omjeru distribucije masa (Dm). Računa se prema formuli:

$$k'=K_C\frac{V_S}{V_M}$$

gdje je K_C ravnotežni omjer raspodjele, V_S volumen stacionarne faze i V_M volumen mobilne faze. Promjenom temperature u plinskoj kromatografiji i mijenjanjem sastava mobilne faze u tekućinskoj kromatografiji može se promijeniti i faktor kapaciteta. Može se odrediti i iz kromatograma iz ukupnih vremena zadržavanja sastojaka i zadržanog vremena:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

gdje je t_R vrijeme zadržavanja sastavnice uzorka, a t_M vrijeme zadržavanja mobilne faze u kromatografskom sustavu („mrtvo vrijeme“). k' obično iznosi od 1 do 5; ako je $k' < 1$ sastojci se eluiraju prebrzo, tj. t_R se ne razlikuje od t_M, a ako je $k' > 20$ onda su vremena zadržavanja preduga (Nigović, 2014c, Luterotti, 2011; Watson 1999a).

Faktor odjeljivanja (faktor selektivnosti, α) također je mjera odjeljivanja dviju supstanci (Tablica 3).

Razlučivanje pikova (R_S) ukazuje na sposobnost kromatografske kolone da odvoji dva analita. Za odvajanje dvaju susjednih pikova na baznoj liniji potrebno je da je R_S veći od 1,5. Pri tome je preklapanje pikova svega 0,3%.

Radi primjene koncepta pojedinačnih koraka razdiobe na koloni Archer John Porter Martin i Richard Laurence Synge uveli su pojam visine (H) i broja (N) tavana. Broj teorijskih tavana (Tablica 3) karakterizira efikasnost kolone. Što je veći broj teorijskih tavana i manja visina tavana, to je efikasnost kolone veća (Luterotti, 2011).

Parametar koji može ukazivati na lošu djelotvornost kolone je simetrijski faktor (A_S) (Tablica 3). Ako se unosi velika količina uzorka u kolonu, dolazi do razgradnje uzorka ili adsorpcije analita na aktivna mjesta stacionarne faze ili loše „uhvaćenog“ analita pri unosu u kolonu dolazi do loše simetrije.

Važan parametar kod odjeljivanja onečišćenja je omjer vrha i podnožja pika (p/v) (Tablica 3).

Točnost određivanja određuje se omjerom signal/šum (S/N) i ponovljivosti (RSD%) (Tablica 3) (Nigović, 2014c).

Tablica 3. Prikaz pojedinih kromatografskih parametara

Parametar	Formule
Koeficijent selektivnosti (α)	$\alpha = \frac{t_{RB} - t_M}{t_{RA} - t_M} = \frac{k'_B}{k'_A}$
Razlučivanje (R_S)	$R_S = \frac{1{,}18\,(t_{RB} - t_{RA})}{W_{B0,5} + W_{A0,5}}$
Broj teorijskih tavana (N)	$N = 5{,}54\,(\frac{t_R}{W_{1/2}})^2$
Visina teorijskog tavana (H)	$H = \frac{L}{N}$
Simetrijski faktor (A_S)	$A_S = \frac{w_{0,05}}{2\,d}$
Omjer vrha i podnožja pika (p/v)	$p/v = \frac{H_p}{H_v}$
Omjer signala i šuma (S/N)	$S/N = \frac{2\,H}{h}$

Kvantitativno određivanje ispitivane tvari može se provesti na više načina: metoda s vanjskim standardom, metoda s unutarnjim standardom, metoda kalibracije, metoda ukupne površine (Nigović, 2014c).

Najčešće se koristi metoda s vanjskim standardom gdje se koncentracija ispitivane tvari određuje iz površine ili visine pika u odnosu na površinu ili visinu pika poredbene otopine (otopine standarda).

1.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

U današnjoj farmaceutskoj industriji tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti zauzima glavnu ulogu kao sastavni dio otkrića, razvoja i proizvodnje ljekovite supstance (Kazakevich i LoBrutto, 2007). Kromatografsko odjeljivanje postiže se prolazom tekuće mobilne faze pod tlakom kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze (3 do 10 μm) noseći sastavnice uzorka. Razlikujemo više vrsta odjeljivanja čiji mehanizam ovisi o vrsti stacionarne faze (Tablica 4).

Tablica 4. Mehanizam odjeljivanja s obzirom na vrstu stacionarne faze

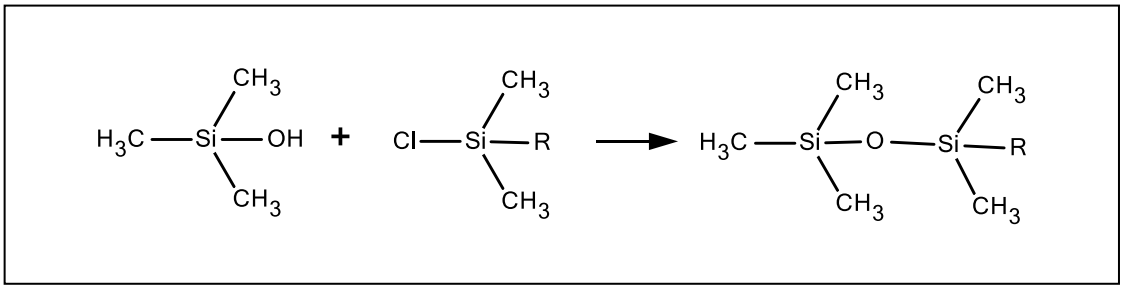
Mehanizam odjeljivanja	Stacionarna faza	Uzorak
razdioba	tekućina adsorbirana na čvrstoj tvari ili organski spojevi vezani na čvrsti nosač	nepolarne i slabo polarne tvari
adsorpcija	polarna (silikagel)	polarne tvari
ionska izmjena	ionski izmjenjivač (polimeri sa sulfonskim i karboksilnim kiselim skupinama ili s bazičnim aminskim funkcionalnim skupinama	tvari ionskog karaktera
raspodjela prema veličini čestica	polimerni gelovi različitih veličina pora	smjesa tvari s razlikama u veličini čestica
stereokemijske interakcije	celulozni derivati, proteini, peptidi, ciklodekstrini	enantiomeri

Više od 80% svih odjeljivanja čini kromatografija obrnutih (reverznih) faza koja uz kromatografiju normalnih faza pripada razdjelnoj kromatografiji.

Kromatografije u kojima je stacionarna faza polarna (silikagel), a mobilna faza manje polarna ili nepolarna (npr. heksan, diklormetan, izopropanol, metanol) su kromatografije normalnih faza. Obratno vrijedi za kromatografije obrnutih faza: kemijski modificirana površina silikagela je stacionarna, nepolarna faza, a voda, metanol, acetonitril ili tetrahidrofuran je mobilna, polarna faza. Odjeljivanje treba optimirati adekvatnim izborom stacionarne faze te dodatno sastavom mobilne faze pri čemu mobilna faza treba biti znatno različite polarnosti. U tekućinskoj kromatografiji normalnih faza polarni spojevi se eluiraju posljednji. Što je mobilna faza nepolarnija vrijeme zadržavanja im je dulje. U kromatografiji obrnutih faza polarni se spojevi eluiraju prvi, te što je mobilna faza nepolarnija jače se zadržavaju nepolarni spojevi.

1.4.1. Stacionarna i mobilna faza

Kao najčešće upotrebljavana stacionarna faza koristi se silikagel. Površina potpuno hidroliziranog gela sadrži silanol skupine (≡Si-OH). Njihovom reakcijom s organoklorosilanom nastaje siloksan (Slika 7). Polarnost stacionarne faze ovisi o vezanim skupinama (R), pa se u praksi najčešće koristi n-oktadecil ($-C_{18}H_{37}$) ili n-oktil ($-C_8H_{17}$) čineći nepolarnu stacionarnu fazu za kromatografiju obrnutih faza. U kromatografiji normalnih faza na silikagel mogu biti vezane polarne skupine, npr. diolne, cijano, amino, dimetilamino ili diamino (Luterotti, 2011).

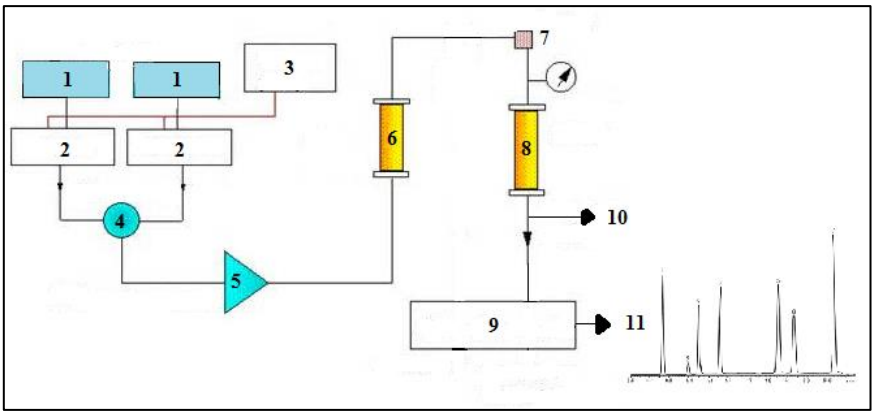


Slika 7. Reakcija organoklorsilana s hidroksilnim skupinama na površini silikagela

Sastav mobilne faze utječe na vrijeme zadržavanja sastavnica uzorka, rezoluciju, a samim time i djelotvornost metode. Ukoliko izokratno eluiranje (ne mijenja se sastav mobilne faze) ne dovodi do željenog odjeljivanja primjenjuje se gradijentno eluiranje (sastav mobilne faze se mijenja kontinuirano ili skokovito) (Nigović, 2014d; Luterotti, 2011b). Da ne bi došlo do začepljenja i smetnji u radu crpke sastavnice mobilne faze ne smiju sadržavati čestice veće od 0,45 µm za HPLC, odnosno 0,22 µm za UPLC (vidi odlomak 1.4.5). Zbog toga se mobilne faze filtriraju ili se koriste kemikalije kromatografskog stupnja čistoće (Council of Europe, 2013b).

1.4.2. Tekućinski kromatograf

Konstrukcijski dijelovi u kromatografu (Slika 8) su spremnik mobilne faze, sustav za obradu otapala koji uklanja otopljene plinove, komora za miješanje otapala, crpka, sustav za unošenje uzorka, predkolona (zaštita od mehaničkih onečišćenja u uzorku), kolona i detektor koji daje analitički zapis. Na izlazu iz kromatografa tekućina odlazi u spremnik za otpad.



Slika 8. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa: 1 – spremnici mobilne faze, 2 - sustavi za obradu otapala, 3 – vakuum pumpa, 4 – komora za miješanje otapala, 5 – crpka, 6 – predkolona, 7 – sustav za unošenje uzorka, 8 – kolona, 9 – detektor, 10 – spremnik za otpad, 11 – analitički zapis

Ključni dio HPLC uređaja je detektor. Detektori mogu pratiti značajke mobilne faze ili otopljene tvari. Ako se mjeri indeks loma onda govorimo o detektoru indeksa loma. Ukoliko mjerimo vodljivost govorimo o elektrokemijskim detektorima. U nekim slučajevima prate se karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vis ili IR području, fluorescencija ili struja na elektrodi, pa imamo detektore fluorescencija i spektroskopske detektore. Vrlo su dobri detektori s diodnim nizom (eng. *diode array detector*, DAD) koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vis području (190-800 nm). Danas je sve veća primjena spregnutih tehnika HPLC-a sa spektrometrom masa (eng. *mass spectrometry,* MS) koja se primjenjuje u karakterizaciji onečišćenja u ljekovitim i pomoćnim tvarima, za određivanje lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i tkivima te u proteomici (Nigović, 2014d; Luterotti, 2011; Watson, 1999).

1.4.3. Primjena HPLC tehnike

HPLC tehnika primjenjuje se za kvantitativnu analizu ljekovitih tvari i gotovih proizvoda, praćenje stabilnosti i određivanje razgradnih produkata u ljekovitim tvarima i dozirnim oblicima, praćenje oslobađanja ljekovite tvari iz farmaceutskog oblika te za određivanje onečišćenja u farmaceutskim tvarima. Koristi se i za određivanje koeficijenta razdjeljenja i pKa vrijednosti molekule lijeka, vezanja lijekova na proteine te lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (Nigović, 2014d).

Posebnost ove metode je što pruža mogućnost analize nehlapljivih i termolabilnih tvari, anorganskih iona, makromolekula i slabo stabilnih prirodnih produkata. Mogućnost razgradnje uzorka je manja u odnosu na plinsku kromatografiju. Uporaba različitih kolona i detektora omogućavaju razvoj selektivne metode. Međutim, za praćenje spojeva koji nemaju kromofore potreban je razvoj jeftinih detektora. Osim toga, ljekovite tvari se moraju ekstrahirati iz dozirnog oblika prije određivanja, a uz to se troši velika količina organskih otapala.

1.4.4. Odjeljivanje enantiomera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Kromatografsko odjeljivanje enantiomera važno je u kontroli kakvoće enantiomerno čistih lijekova. Oni imaju ista fizikalno-kemijska svojstva te se stoga ne mogu odijeliti na standardnim kolonama. Za odjeljivanje enantiomera mogu se koristiti dvije HPLC tehnike odjeljivanja, indirektna i direktna.

Indirektna tehnika odjeljivanja podrazumijeva uporabu kiralnog reagensa za derivatizaciju. Sastavnice uzorka moraju imati funkcionalnu skupinu (npr. hidroksilnu, alkoholnu, karboksilnu, karbonilnu, tiolnu, amino, amidnu itd.) koja reagira s kiralnim reagensom, prilikom čega dolazi do stvaranja dijastereoizomera. Oni imaju različita fizikalna svojstva, što omogućuje njihovo odjeljivanje na ne-kiralnoj koloni. Indirektne tehnike su jeftinije, fleksibilnije te se njima postiže bolja separacija, ali s druge strane zahtijevaju dodatnu validaciju, dugo vrijeme reakcije te optičku čistoću kiralnog reagensa. Zbog visoke osjetljivosti često se koriste u bioanalizama.

S druge strane, direktna tehnika odjeljivanja podrazumijeva korištenje kiralnih stacionarnih faza ili dodatak kiralnih aditiva mobilnoj fazi. Postizanje odjeljivanja sastavnica pomoću aditiva u mobilnoj fazi slabe je učinkovitosti i prilično skupo te se zbog toga ne koristi često u industriji. Kiralne stacionarne faze dobivaju se kemijskom modifikacijom silikagela s polisaharidima (derivati celuloze i amiloze), kiralnim derivatima aminokiselina, proteinima, peptidima, derivatima ciklodekstrina, kiralnim krunskim eterima, kiralnim metalnim kompleksima. Neki od kemijskih modifikatora su 3,5-dinitrobenzoil leucin (Leucine CSP), 3,5-dinitrobenzoil fenilglicin (Phenylglycine CSP), β-ciklodekstrin (Cyclobond 1), heteroatomske makromolekule vezane na (18-Crown-6)-tetrakarboksilnu kiselinu (ChiroSil), vankomicin, teikoplanin, α-1 kiseli glikoprotein (Chiral-AGP), humani serumski albumin (Chiral-HSA) itd. Danas postoji oko 60 različitih vrsta HPLC kolona za razdvajanje enantiomera (Mornar Turk, 2015; Nigović, 2014a; Nguyen i sur., 2006).

1.4.5. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Posljednjih godina sve se više koristi tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (eng. *ultra perfomance liquid chromatography*, UPLC) zbog unaprijeđenih osobina u odnosu na HPLC (Tablica 5).

Tablica 5. Uspoređivanje HPLC i UPLC metode

	HPLC	**UPLC**
načelo odjeljivanja	isto	
veličina čestica stacionarne faze	3 – 10 μm	≤ 1,7 μm
vrijeme analize	duže	kraće
selektivnost metode	manja	veća
osjetljivost metode	lošija	bolja (detekcija nižih koncentracija)

1.5. Onečišćenja u lijekovima

Kod proizvodnje lijekova veoma je važno spomenuti onečišćenja. Bilo koji sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao ljekovita tvar smatramo onečišćenjem pri čemu treba napomenuti da nema tvari koja je 100% čista (izbjegavati pretjerano čišćenje zbog povećavanja cijene lijeka, ali voditi računa da lijek odgovara farmaceutskim zahtjevima). Izvori i vrste onečišćenja mogu biti različiti (Tablica 6, Tablica 7).

Tablica 6. Izvori onečišćenja

Izvori onečišćenja
polazne **sirovine**
nusprodukti i međuprodukti u proizvodnom postupku
produkti razgradnje lijeka tokom čuvanja ili djelovanjem svjetla, temperature, pH ili vode
produkti razgradnje lijeka tokom izrade ili čuvanja farmaceutskog dozirnog oblika
produkti koji nastaju reakcijom s pomoćnim tvarima ili spremnikom
usput **ekstrahirane tvari** iz prirodnih produkata

Tablica 7. Vrste onečišćenja

Vrste onečišćenja
organska onečićenja prihvatljive granice navedene u ICH dokumentu
anorganska onečišćenja granice ovise o namjeni ispitivanog materijala, količini i načinu doziranja **metali** katalizatori ili reagensi iz postupka proizvodnje
ostatna otapala zaostale, hlapljive, organske kemikalije koje se rabe ili nastaju u postupku proizvodnje

Uslijed izmjene postupka proizvodnje u poznatoj tvari mogu se naći novi oblici onečišćenja i promjene u količini istih zbog čega treba razvijati postojeće ili nove analitičke metode za njihovo otkrivanje. Posebnu pažnju treba obratiti na onečišćenja s toksičnim svojstvima, ona farmakološki aktivna, onečišćenja koja mijenjaju aktivnost i djeluju na stabilnost same ljekovite tvari i ona koja utječu na analitičke rezultate. S tim u vezi trebaju postojati složeniji zahtjevi zakonske regulative.

1.5.1. Kontrola onečišćenja

Tijekom kontrole onečišćenja potrebno je pratiti smjernice u monografiji Europske farmakopeje (Ph. Eur.). Ukoliko lijek nema monografiju tada se prate međunarodne smjernice za kontrolu i ispitivanje onečišćenja u ljekovitim tvarima i razgradnih produkata u ljekovitim oblicima kao što su ICH (SAD, EU, Japan), EMA (Europa), US FDA (SAD), TGA (Kanada) ili TPD (Australija) smjernice (Nigović, 2014e; ICH smjernice, 2006).

U Europskoj farmakopeji organska onečišćenja se mogu podijeliti na:

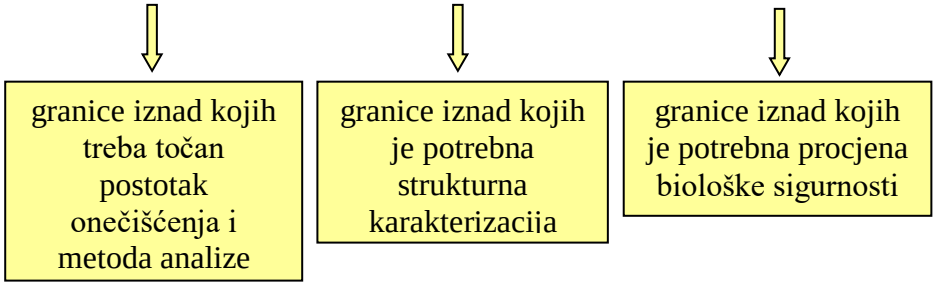
1) specificirana onečišćenja
- identificirana onečišćenja - karakterizirana kemijska struktura, prisutna u količini većoj od 0,1%
- neidentificirana onečišćenja - definirana isključivo kvalitativnim analitičkim svojstvima, mora biti prisutan u količini manjoj od 0,1%
2) ostala onečišćenja koja se mogu dokazati
- potencijalna onečišćenja koja nisu detektirana niti u jednom ispitivanom uzorku tijekom izrade monografije, ali su ograničena ispitivanjima u Ph. Eur.; mogu nastati u proizvodnom postupku ili stajanjem mogu ili ne moraju trenutno biti prisutni u ljekovitoj tvari

Podskupina specificiranih onečišćenja su i srodne tvari koje su poznata onečišćenja, često srodne strukture, koja mogu biti identificirana ili neidentificirana. U Ph. Eur. nalaze se u poglavlju Ispitivanja.

S obzirom na maksimalnu dnevnu dozu aktivne tvari postoje propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja prisutnih u njima (Shema 1).

Shema 1. Propisane granice za izvještavanje, identifikaciju i kvalifikaciju onečišćenja u ljekovitim tvarima prema ICH smjernicama

Maksimalna dnevna doza	Granica za izvještavanje	Granica za identifikaciju	Granica za kvalifikaciju
≤ 2 g/dan	0,05%	0,10% ili 1,0 mg/dan (ovisno što je niže)	0,15% ili 1,0 mg/dan (ovisno što je niže)
> 2g/dan	0,03%	0,05%	0,05%



Definirani pragovi onečišćenja ne odnose se na pomoćne tvari, biološke i biotehnološke proizvode, peptide, oligonukleotide, radiofarmaceutike, fermentacijske i polusintetske proizvode, biljne proizvode i produkte iz biljnih i životinjskih izvora.

1.5.2. Analiza onečišćenja

Onečišćenja možemo (Nigović, 2014e):

1) odijeliti odgovarajućom separacijskom metodom i identificirati usporedbom sa standardom
- HPLC, tankoslojna kromatografija (eng. *thin-layer chromatography*, TLC)

2) izolirati i učiniti strukturnu karakterizaciju spektroskopskim metodama
- HPLC za izolaciju
- infracrvena spektrofotometrija (eng. *infrared spectrophotometry*, IR), nuklearna magnetska rezonantna spektrometrija (eng. *nuclear magnetic resonance spectrometry*, NMR), spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS), ultraljubičasta spektrofotometrija (eng. *ultraviolet spectrophotometry*, UV) za strukturnu karakterizaciju

3) identificirati, strukturno karakterizirati i kvantitativno odrediti onečišćenja pomoću spregnutih tehnika
- LC-MS, LC-NMR, GC-MS

1.6. Validacija analitičke metode

Pri razvoju i uvođenju nove metode potrebno je provesti validaciju metode. To je postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu. Prijedlog za usvajanje nove ili prerađene analitičke metode zahtijeva dovoljno laboratorijskih podataka kojima se dokumentira valjanost metode. U validaciji pojedinih analitičkih postupaka potrebno je odrediti parametre, kao što su točnost, preciznost, specifičnost, linearnost i radno područje (Nigović, 2015f).

Linearnost je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Ispitivanje linearnosti provodi se analizom serije uzoraka na najmanje pet različitih koncentracija. Iz grafičkog prikaza ovisnosti signala, tj. površine pika o koncentraciji analita dobiva se regresijski pravac te računa koeficijent korelacije.

Točnost pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Provode se najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Izražava se kao analitički prinos (eng. *recovery*) pri čemu je težnja da iznosi 100%. Točnost metode ukazuje na sustavne pogreške.

Ponovljivost, kao jedan od načina iskazivanja preciznosti metode, podrazumijeva podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima. Ispitivanje ponovljivosti provodi se uzastopnim mjerenjem 6 uzoraka.

Izdržljivost (robusnost) je mjera sposobnosti analitičkog postupka da ostane nepromijenjen pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Analitičar definira uvjete koje mora strogo kontrolirati tijekom provođenja iste.

Specifičnost je sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje jedan analit od ostalih komponenata uzorka.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tetramizol je antihelmintik širokog spektra djelovanja koji djeluje na zrele i nezrele stadije razvoja nematoda prisutnih u gastrointestinalnom traktu i plućima životinja kao što su goveda, ovce, svinje i koze (Mourot i sur., 1979) te je potentni imunomodulator u liječenju raka debelog crijeva, raka glave i vrata te melanoma.

Metode za razdvajanje i određivanje enantiomera zahtijevaju posebne kemijski modificirane stacionarne faze (npr. polisaharide vezane na silikagel) i vrlo jaku organsku mobilnu fazu (npr. heksan). Takve su metode obično duge i izokratne. U literaturi već postoji kolona i metoda kojom je postignuto razdvajanje enantiomera tetramizola na HPLC-u unutar 8 min (www.phenomenex.com). Također, postoji metoda i za kvantitativno određivanje tetramizola na HPLC-u unutar 2,4 min (Mourot i sur., 1979).

Cilj je ovog rada razviti kratku i efikasnu metodu za razdvajanje i određivanje enantiomera tetramizola – DEX i LEV na UPLC-u sa što jednostavnijim i manje štetnim mobilnim fazama koje su kompatibilne sa spektrometrijom masa (eng. *mass spectrometry,* MS). Dodatni izazov je činjenica što ne postoje kiralne kolone s „pravim“ dimenzijama za UPLC.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Korišteni standardi i otapala u ovom istraživanju te njihovi proizvođači (Tablica 8):

Tablica 8. Popis kemijskih tvari korištenih tijekom istraživanja i njihovih proizvođača

Kemijska tvar	Proizvođač
standard tetramizola (TET)	Ph. Eur. Reference Standard
acetonitril (ACN)[1], metanol (MeOH)[1], amonij acetat (CH_3COONH_4), mravlja kiselina (HCOOH), izopropanol ($(CH_3)_2CHOH$)	Merck (SAD)
dietilamin (DEA), natrij (Na), klorovodična kiselina (HCl), vodikov peroksid (H_2O_2)	Kemika (Hrvatska)
amonij bikarbonat (NH_4HCO_3), β-ciklodekstrin	Sigma-Aldrich (Njemačka)
amonij formijat (NH_4COOH)	Fluka (Njemačka)
voda ultra visoke čistoće	Milli-Q Integral Water Purification System, Merck (SAD)

[1]Kromatografski stupanj čistoće.

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti provodila se na instrumentima dva različita proizvođača:

1) ACQUITY® UPLC H class Systemu (Waters, Velika Britanija) koji se sastoji od kvaterne pumpe ACQUITY® UPLC Quaternary Solvent Manager, automatskog dodavača uzorka ACQUITY® UPLC Sample Manager, odjeljka za kolonu ACQUITY® UPLC Column Manager i fotoelektričnog detektora s diodnim nizom (eng. *photodiode array*, PDA) ACQUITY® UPLC Photodiode Array Detector
2) 1290 Infinity LC Systemu (Agilent, SAD) s binarnom pumpom 1290 Infinity Binary Pump, automatskim dodavačem uzoraka 1290 Infinity Autosampler, odjeljkom za kolonu 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment i fotoelektričnim detektorom s diodnim nizom 1290 Infinity Diode Array Detector.

U sklopu tekućinskog kromatografa korišteno je sredstvo za ispiranje igle izvana (eng. *needle wash*), sredstvo za ispiranje igle iznutra (eng. *purge wash*) i sredstvo za ispiranje brtvi (eng. *seal wash*). Snimanje kromatograma provodilo se na valnoj duljini 215 nm te se snimalo UV područje od 200-400 nm pri čemu su kromatogrami procesirani u programskom paketu Empower (Waters, Velika Britanija).

Ispitivanja su provedena na kolonama različitih kemija:

1) ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 (Waters, Velika Britanija) kolona, dimenzija 2,1 x 150 mm, veličine čestica 2,5 μm, koja je ponajviše namijenjena kromatografiji sa superkritičnim tekućinama (eng. *supercritical fluid chromatography,* SFC), istraživanje je provedeno i na njoj jer se stacionarne faze u tekućinskoj i superkritičnoj kromatografiji ne razlikuju. Stacionarna faza nastala je kemijskom modifikacijom silikagela vezanjem amiloze tris(3,5-dimetilfenilkarbamata).
2) Chiralpak® IC-3 (Daicel, Velika Britanija) kolona, dimenzija 2,1 x 100 mm, veličine čestica 3 μm, nastala kemijskom modifikacijom silikagela vezanjem celuloze tris(3,5-diklorofenilkarbamata).
3) ACQUITY UPLC BEH C_{18} (Waters, Velika Britanija) kolona, dimenzija 2,1 x 100 mm, veličine čestica 1,7 μm, nastala kemijskom modifikacijom silikagela vezanjem hibridnih etilena.
4) Poroshell 120 PFP (Agilent, SAD) kolona, dimenzija 2,1 x 100 mm, veličine čestica 1,8 μm, nastale kemijskom modifikacijom silikagela vezanjem pentafluorofenila.

ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 i Chiralpak IC-3 kolona su kiralne, ali u pravilu većih dimenzija nego što su klasične UPLC kolone.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema temeljne standardne otopine i razrijeđene otopine

Temeljna standardna otopina (eng. *stock solution*) tetramizola pripremljena je u koncentraciji 0,1 mg/mL. Odvagani standard tetramizola (TET) otopljen je u metanolu.

Razrijeđena otopina dobivena je razrjeđenjem temeljne standardne otopine s pročišćenom vodom do konačne koncentracije od 0,01 mg/mL TET.

3.2.2. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na kiralnim kolonama: ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 i Chiralpak IC-3

Ispitivanja su provedena na tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti ACQUITY® UPLC H Class System (Waters, Velika Britanija) i tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti 1290 Infinity LC System (Agilent, SAD). Sredstvo za ispiranje igle izvana je bilo 90% acetonitril u pročišćenoj vodi, sredstvo za ispiranje igle iznutra 10% acetonitril u pročišćenoj vodi, a sredstvo za ispiranje brtvi 30% acetonitril u pročišćenoj vodi. Injektirano je 5 µL uzorka, a brzina protoka je bila 0,5 mL/min. Apsorbancija je mjerena pri 215 nm te je sniman UV spektar od 200-400 nm.

Prilikom rada na UPLC-u ne preporuča se korištenje viših koncentracija mobilnih faza od 20 mM. Kako je potrebno paziti na kompatibilnost mobilne faze s MS-om razvoj metode je započeo sa sljedećim mobilnim fazama: 0,1% mravlja kiselina u pročišćenoj vodi (kanal A_1) i 10 mM amonij formijat u pročišćenoj vodi (kanal A_2) kao polarne mobilne faze i 100% metanol (kanal B_1) i 100% acetonitril (kanal B_2) kao manje polarne mobilne faze. Eluiranje je bilo izokratno, a udio organske faze se mijenjao od 5% - 60%. Ispitan je i utjecaj temperature, te se ona mijenjala od 25-40°C (ograničenje kolone na 40°C).

Jedan od načina odjeljivanja enantiomera je dodatak kemijskih modifikatora (eng. *ion-pairing reagents*) u mobilnu fazu. Ispitivanje je započelo dodatkom dietilamina (DEA) u vodenu i organsku mobilnu fazu. Dietilamin je dodan u udjelu 0,1% u odnosu na 10 mM amonij formijat (kanal A) i acetonitril (kanal B). Mijenjan je pH mobilne otopine A od 3,5-5,5 i testiran je utjecaj temperature.

Promijenjena je mobilna otopina A – 10 mM amonij bikarbonat i uslijedilo je testiranje utjecaja pH i temperature.

Na koloni Chiralpak IC-3 testirana je završna metoda koja je postignuta na koloni ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1. Podešeni su isti uvjeti i korištene iste mobilne otopine.

3.2.3. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnim kolonama (Phoroshell PFP i BEH C18)

Za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnoj koloni potrebno je dodati kiralni aditiv u mobilnu fazu. Zbog toga su se kao mobilne faze kroz kanal A koristile 10 mM β-ciklodekstrin u amonij bikarbonatu pH vrijednosti 5,5 (A_1) te 10 mM ciklodekstrin i 0,1% DEA u amonij bikarbonatu pH vrijednosti 5,5 (A_2). Čisti acetonitril (B_1) i 0,1% DEA u acetonitrilu (B_2) koristili su se kao mobilne faze kroz kanal B. Provedena su ispitivanja izokratnog eluiranja s udjelom organske faze (kanal B) od 2-40%. Ostali su uvjeti bili nepromijenjeni, a opisani su u poglavlju 3.2.2.

3.2.4. Validacija optimalne metode

Kako bi analitička metoda bila prikladna za određenu primjenu potrebno je provesti validaciju metode. Svaka sekvenca morala je zadovoljiti prikladnost sustava.

Ispitivanje linearnosti određivalo se u 5 točaka u području koncentracija od 50%, 70%, 100%, 125% i 140% tako da su koncentracije LEV i DEX u koncentracijskom području od 5 točaka iznosile 0,00442 mg/mL, 0,00619 mg/mL, 0,00884 mg/mL, 0,01105 mg/mL i 0,01238 mg/mL. Za svaku točku pripremala se jedna otopina, a uzorak se injektirao dva puta.

Ispitivanje točnosti uključivalo je po 3 mjerenja na 3 različita koncentracijska nivoa (50%, 100%, 140%). Za svaku koncentraciju određena je srednja vrijednost analitičkog prinosa i relativno standardno odstupanje (RSD).

Ispitivanje ponovljivosti uključivalo je 6 priprema uzorka pri istim propisanim uvjetima pri čemu se za 6 određivanja izračunala srednja vrijednost sadržaja i relativno standardno odstupanje (RSD).

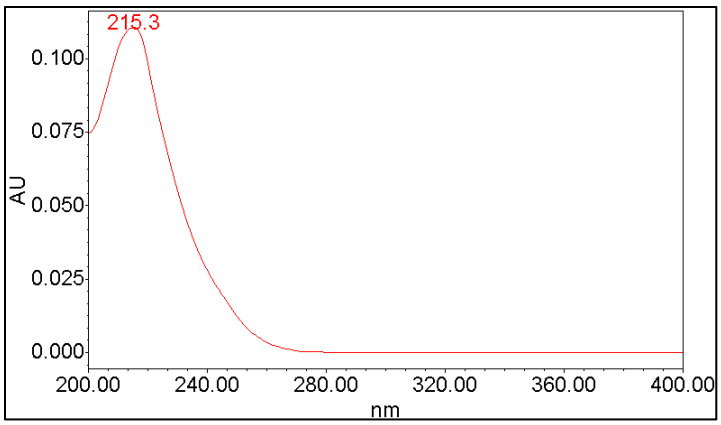
Ispitivanje robusnosti provodilo se promjenom temperature kolone ±2ºC, promjenom protoka mobilne faze ±0,02 mL/min i promjenom udjela mobilne faze B ±5% na pH vrijednosti 9,0. Ispitivanje robusnosti pH mobilne faze A provedeno je spuštanjem pH jedinica na 8,0, 7,0, 5,5, 4,5. Nakon utvrđivanja donje granice pH vrijednosti mobilne faze A ponovljeno je ispitivanje robusnosti metode za promjenu temperature kolone ±2ºC, protoka mobilne faze ±0,02 mL/min i promjenu udjela mobilne faze B ±5%.

U ovom slučaju ispitivanje specifičnosti provodilo se analiziranjem razlučivanja koje ukazuje na sposobnost odjeljivanja dviju komponenti uzorka, tj. DEX i LEV.

4. REZULTATI

4.1. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na kiralnim kolonama: ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 i Chiralpak IC-3

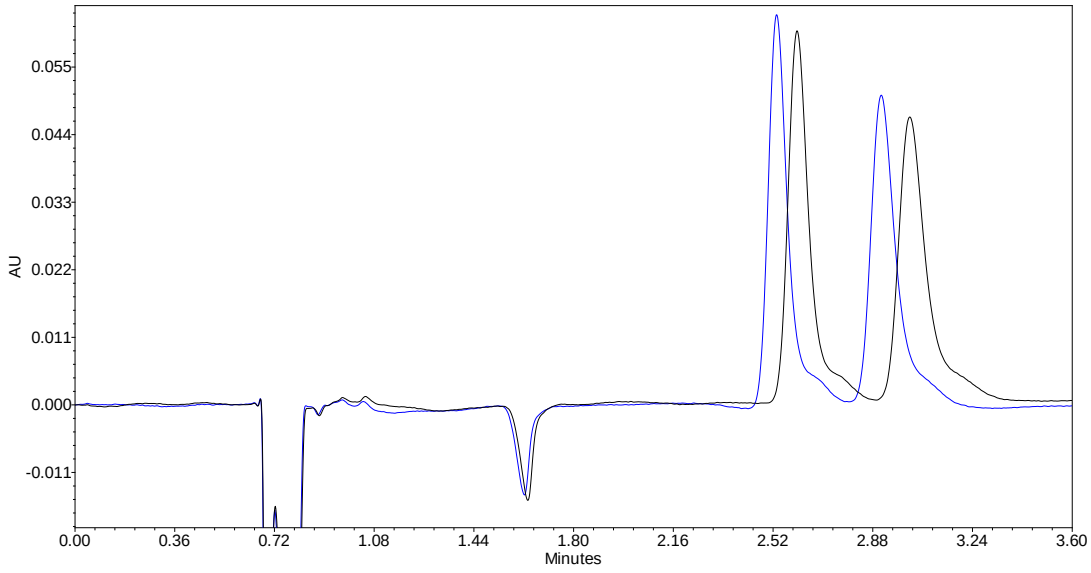
S obzirom na važnost kompatibilnosti mobilnih faza s MS-om odabrane su 0,1% mravlja kiselina i 10 mM amonij formijat u pročišćenoj vodi kroz kanal A_1, odnosno A_2. Kao mobilna faza kroz kanal B_1 koristio se 100% metanol, a kroz kanal B_2 100% acetonitril. Tijekom razvoja kombinirane su različite varijante kanala A i B uz promjene udjela organske faze od 5-60% i temperature od 25-40ºC. Na temelju dobivenih kromatograma uočeno je da ne dolazi do odjeljivanja LEV i DEX pri tim uvjetima. Na svim kromatogramima sniman je spektar od 200-400 nm da se vidi na kojoj valnoj duljini apsorbira TET, odnosno njegovi enantiomeri (Slika 9).



Slika 9. Apsorpcijski spektar TET, odnosno njegovih enantiomera LEV i DEX.

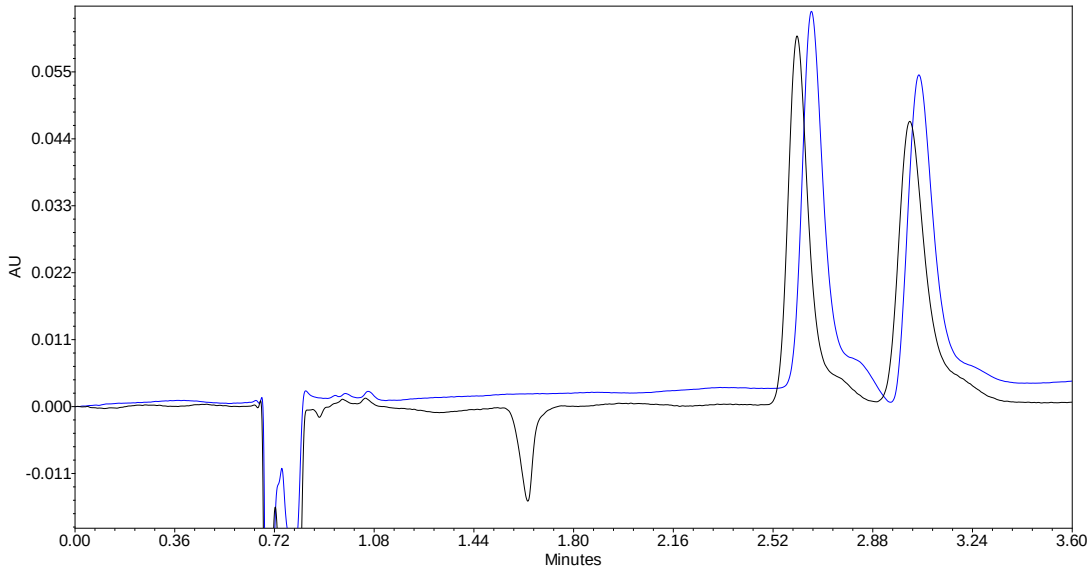
Sljedeća faza u razvoju optimalne metode bilo je uvođenje kemijskog modifikatora, 0,1% DEA, u vodenoj mobilnoj fazi (10 mM amonij formijat u pročišćenoj vodi) i organskoj mobilnoj fazi (acetonitril). Mijenjanjem udjela organske faze (% B) postignuto je optimalno razdvajanje pikova LEV i DEX pri 40% B. Uslijedilo je testiranje utjecaja temperature i pH vodene mobilne faze.

Uspoređujući dvije temperature 35ºC i 38ºC uočeno je da su na višoj temperaturi oštriji i uži pikovi (Slika 10).



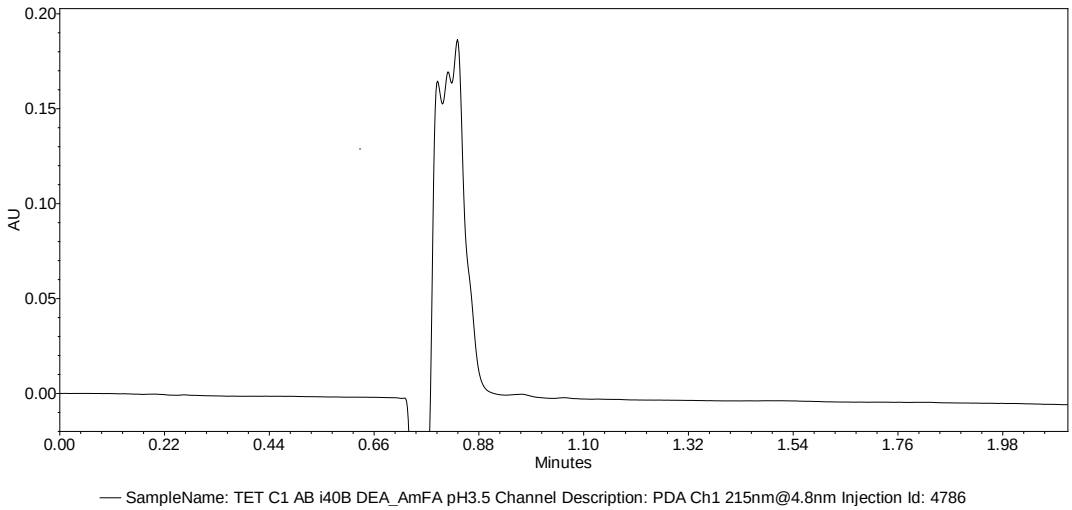
Slika 10. Usporedba kromatograma pri temeperaturi 35°C (crna linija) i 38°C (plava linija). 60% A (0,1% DEA u 10 mM amonij formijatu) : 40% B (0,1% DEA u acetonitrilu)

Promjenama pH mobilne faze A od 3,5 - 5,5 primjećeno je da što je pH viši to je zadržavanje LEV, odnosno DEX dulje (Slika 11).



Slika 11. Usporedba kromatograma pri pH 4,0 (crna linija) i 5,5 (plava linija). 60% A (0,1% DEA u 10 mM amonij formijatu) : 40% B (0,1% DEA u acetonitrilu)

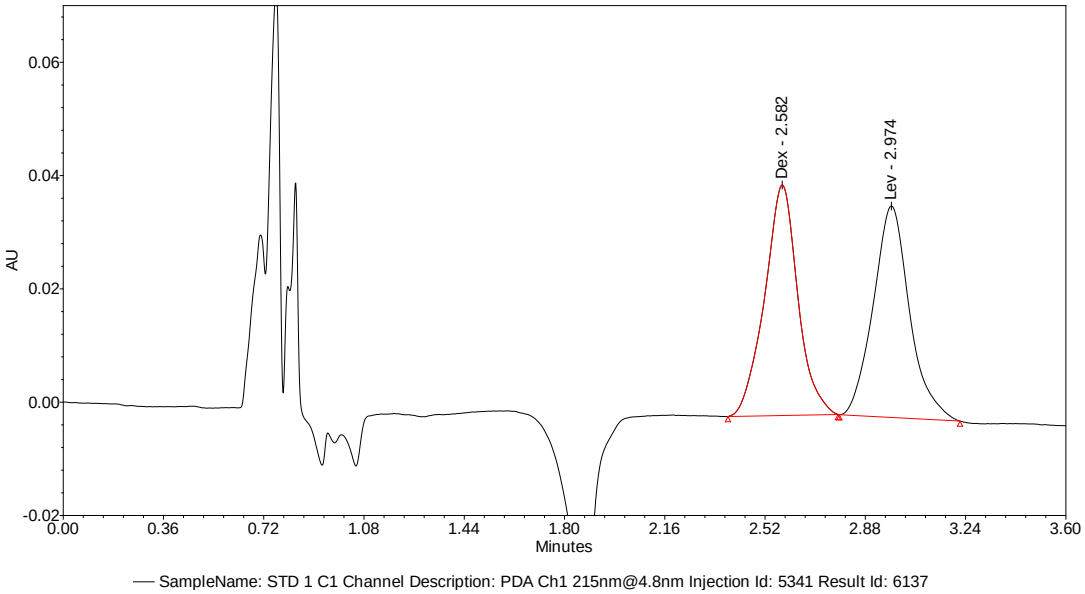
Pri pH 3,5 0,1% DEA u 10 mM amonij formijatu uočeno je da LEV i DEX izlaze u sklopu sustavnog pika (Slika 12).



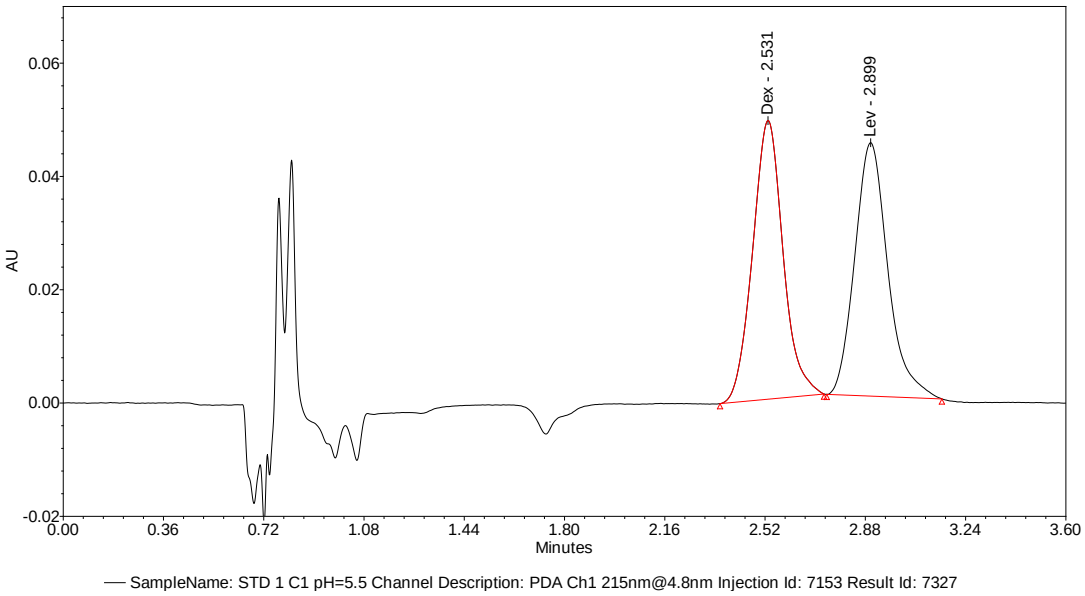
Slika 12. Prikaz kromatograma pri pH 3,5 0,1% DEA u 10 mM amonij formijatu (kanal A) i 0,1% DEA u acetonitrilu (kanal B) pri 35°C

Iako je korištenjem mobilnih faza 0,1% DEA u 10 mM amonij formijatu (kanal A) i acetonitrilu (kanal B) došlo do odjeljivanja željenih sastavnica, LEV i DEX, zbog nesimetričnog izgleda pika odbačena je i ta mobilna faza A i uvedena je sljedeća mobilna faza kompatibilna s MS-om, tj. 10 mM amonij bikarbonat.

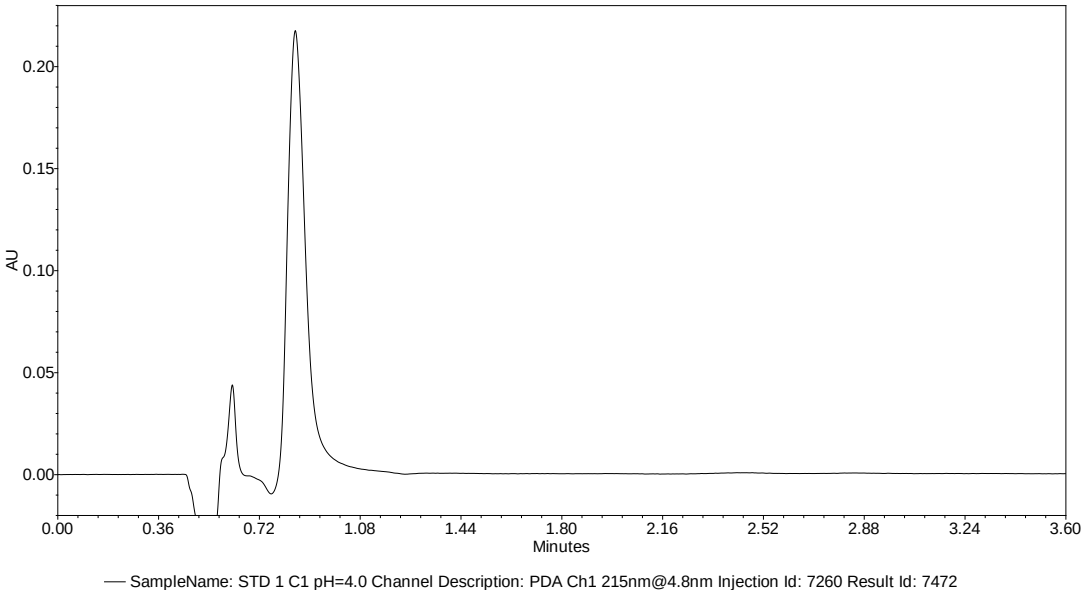
Korištenjem 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu i acetonitrilu omogućeno je odjeljivanje sastavnica uzorka, LEV i DEX, pri čemu se ispitivao utjecaj različitih temperatura i pH mobilne faze A. Iz sljedećih kromatograma vidljivo je da sa smanjenjem pH dolazi do kraćeg zadržavanja sastavnica, a kod pH 4,0 pikovi LEV i DEX nisu razdvojeni i izlaze nadomak sustavnog pika (Slika 13-Slika 15).



Slika 13. Prikaz kromatograma pri pH 9,0 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu (kanal A) i 0,1% DEA u acetonitrilu (kanal B) pri 30°C



Slika 14. Prikaz kromatograma pri pH 5,5 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu (kanal A) i 0,1% DEA u acetonitrilu (kanal B) pri 30°C

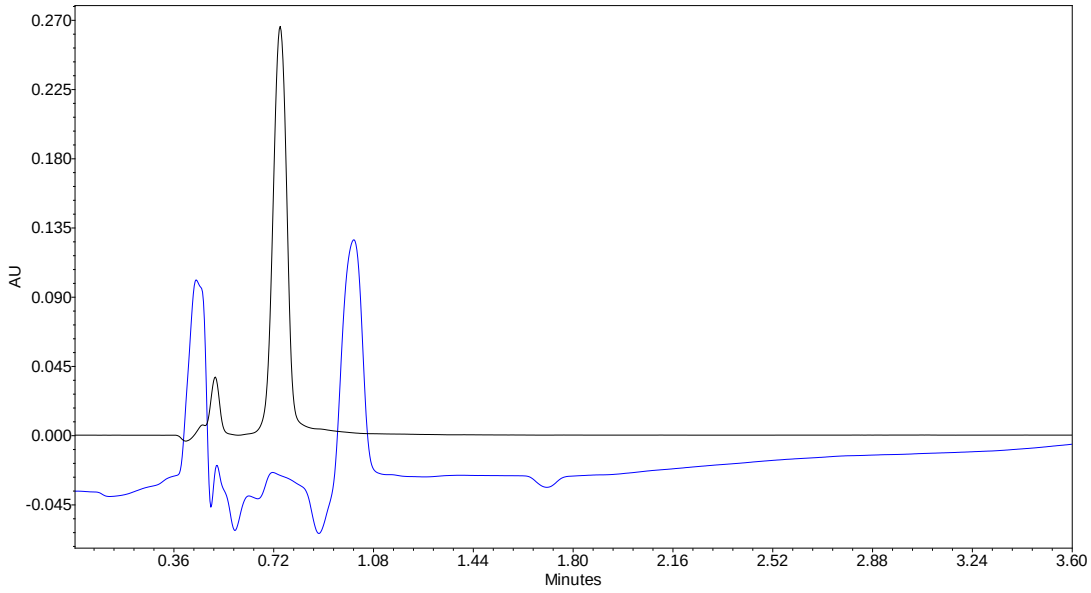


Slika 15. Prikaz kromatograma pri pH 4,0 0,1% DEA u amonij bikarbonatu (kanal A) i 0,1% DEA u acetonitrilu (kanal B) pri 30°C

Navedena ispitivanja su provedena i na Chiralpak IC-3 koloni te su rezultati pokazivali da lužnatiji uvjeti omogućavaju dulje zadržavanje sastavnica uzorka.

4.2. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnim kolonama (Poroshell PFP i BEH C18)

S obzirom da je za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnim kolonama potrebno koristiti kiralni aditiv, kao mobilne faze kroz kanal A koristili su se 10 mM β-ciklodekstrin u amonij bikarbonatu pH vrijednosti 5,5 (A_1) i 10 mM β-ciklodekstrin i 0,1% DEA u amonij bikarbonatu pH vrijednosti 5,5 (A_2). Kao mobilne faze kroz kanal B koristili su se čisti acetonitril (B_1) i 0,1% DEA u acetonitrilu (B_2) (Slika 16). Ispitivanje je provedeno s udjelom organske faze od 2 - 40%.



Slika 16. Kromatografski prikaz na ACQUITY UPLC BEH C_{18} koloni korištenjem metode izokratnog eluiranja s udjelom organske faze od 40% - 100% acetonitril (crna linija) i 0,1% DEA u acetonitrilu (plava linija)

Provedenim testiranjima na Phoroshell PFP (uvjeti opisani u odlomku 3.2.3) nije se postiglo željeno razdvajanje LEV i DEX.

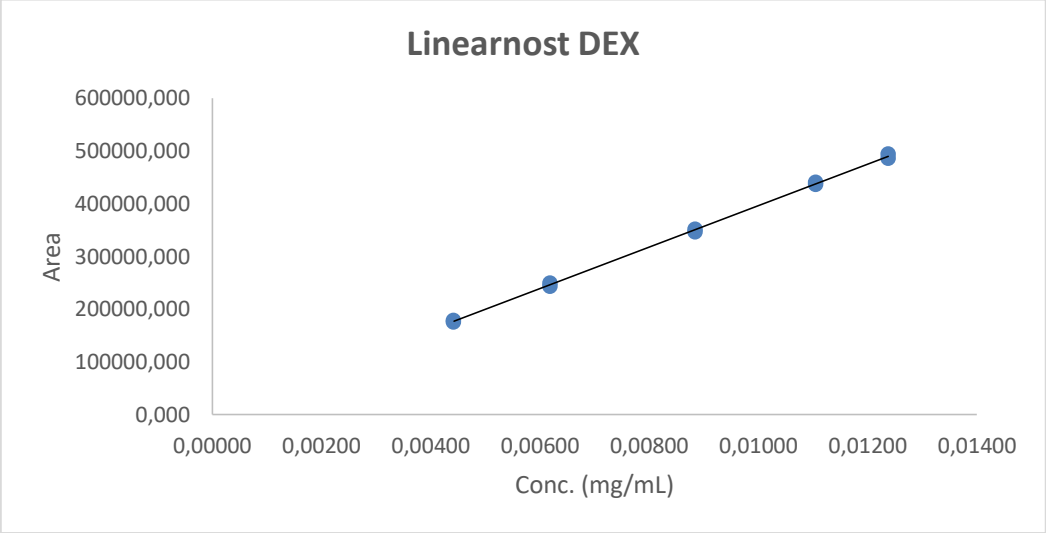
4.3. Validacija optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1

4.3.1. Linearnost

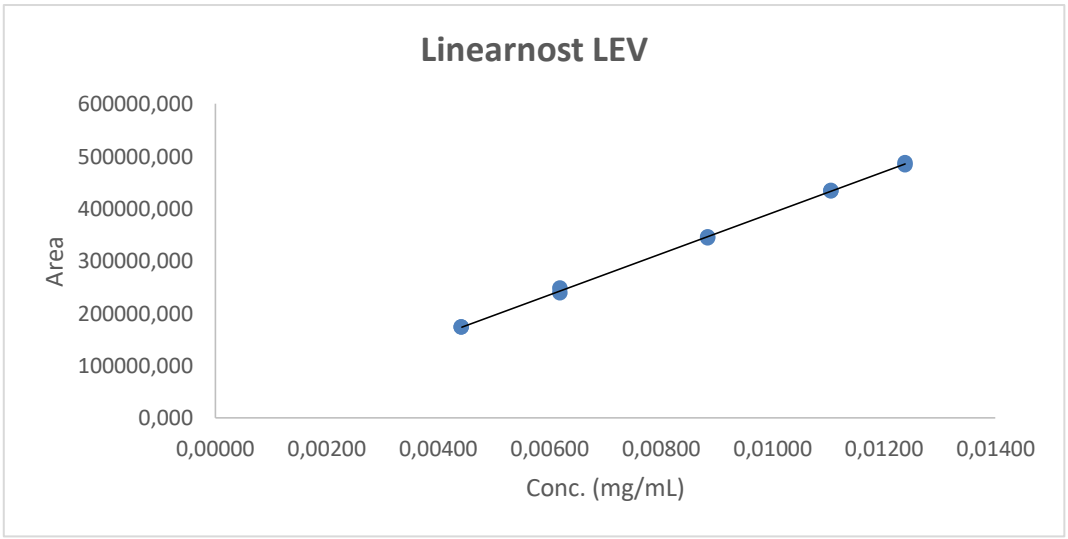
Analiza linearnosti provedena je na pet različitih koncentracijskih nivoa standarda – 50%, 70%, 100%, 125% i 140%. Iz grafičkog prikaza ovisnosti površine pika LEV, odnosno DEX i koncentracija istih (Slika 17, Slika 18) dobiven je koeficijent korelacije regresijskog pravca (R) i omjer odsječka na y-osi i srednje vrijednosti površine pika (Tablica 9).

Tablica 9. Usporedba koeficijenta korelacije regresijskog pravca (R) i omjera odječka na y-osi i srednje vrijednosti površine pika za LEV i DEX pri pH 9,0 i 4,5 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu

	ACQUIY UPC^2 Trefoil AMY1 kolona	
	pH=4,5	**pH=9,0**
R_{LEV}	0,992	1,000
R_{DEX}	0,992	1,000
y-os/area$_{LEV}$ (%)	1,4	0,1
y-os/area$_{DEX}$ (%)	1,8	0,8



Slika 17. Prikaz linearnosti DEX na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 koloni pri pH vrijednosti 9,0 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu



Slika 18. Prikaz linearnosti LEV na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 koloni pri pH vrijednosti 9,0 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu

4.3.2. Točnost

Tijekom ispitivanja točnosti tri mjerenja provodila su se na 3 koncentracijska nivoa (50%, 100%, 140%) LEV, odnosno DEX. Usporedbom srednjih vrijednosti izmjerenih i stvarnih rezultata ustanovljeno je da je najmanja razlika u izmjerenim koncentracijama kod mjerenja LEV pri koncentracijskom nivou 140% kod pH 4,5, odnosno kod mjerenja DEX pri koncentracijskom nivou 50% kod pH 4,5. Srednje vrijednosti izmjerenog analitičkog prinosa (eng. *recovery*) trebale bi biti između 97,0 - 103,0%. Relativno standardno odstupanje (RSD)

pokazuje slaganje unutar tri mjerenja za tri različite koncentracije. Najveći RSD nađen je prilikom mjerenja DEX na koncentracijskom nivou od 50% pri pH 4,5. Vrijednosti RSD trebale bi biti ≤ 3% (Tablica 10).

Tablica 10. Usporedba srednje vrijednosti analitičkog prinosa (eng. *recovery*) i relativnog standardnog odstupanja (RSD) LEV i DEX na tri različita koncentracijska nivoa pri pH 4,5 i 9,0 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu

Koncentracijski nivo	**50%**		**100%**		**140%**	
pH mobilne faze A	**4,5**	**9,0**	**4,5**	**9,0**	**4,5**	**9,0**
<Prinos$_{DEX}$>(%)	100,9	102,9	101,8	101,6	98,6	98,8
RSD$_{DEX}$(%)	2,3	1,5	0,1	1,3	0,4	1,1
<Prinos$_{LEV}$>(%)	101,8	101,8	101,7	101,2	98,9	98,6
RSD$_{LEV}$ (%)	1,3	0,7	0,1	0,5	0,2	0,3

4.3.3. Ponovljivost

Rezultati ponovljivosti, mjerenje šest priprema uzorka pri koncentracijama na koncentracijskom nivou od 100%, prikazani su u Tablica 11.

Tablica 11. Usporedba srednje vrijednosti sadržaja i relativne standardne devijacije (RSD) LEV i DEX pri pH 9,0 i 4,5 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu

	ACQUIY UPC^2 Trefoil AMY1 kolona	
	pH=4,5	**pH=9,0**
<Sadržaj$_{DEX}$>(%)	101,1	101,3
RSD$_{DEX}$ (%)	0,9	0,6
<Sadržaj$_{LEV}$>(%)	100,8	100,9
RSD$_{LEV}$ (%)	1,1	1,6

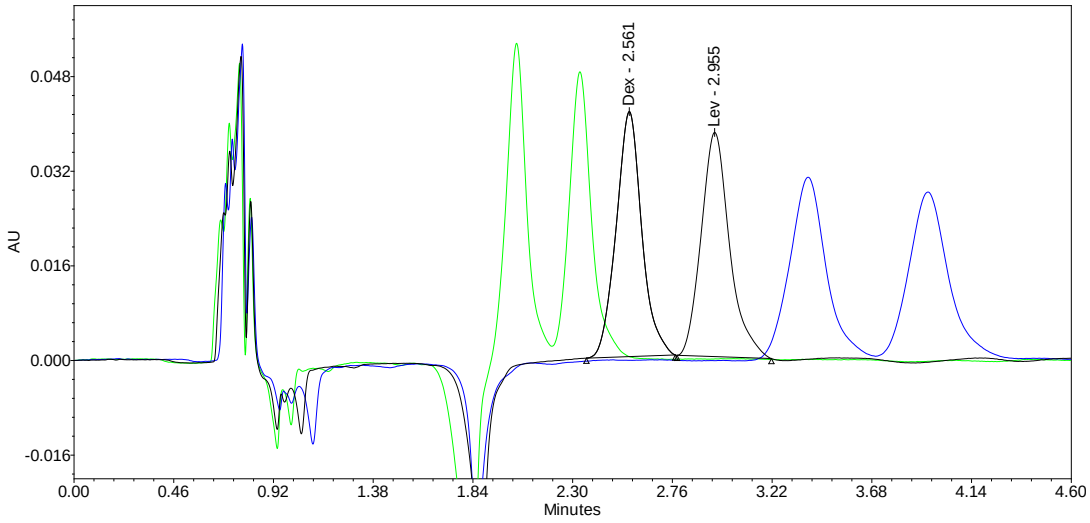
4.3.4. Robusnost

Parametri robusnosti koji su promijenjeni u metodi bili su temperatura kolone, protok mobilne faze, udio mobilne faze B te pH mobilne faze A. Temperatura se ispitivala na ±2ºC, protok mobilne faze na ±0,02 mL/min, udio mobilne faze B na ±5% te pH mobilne faze na 8,0, 7,0, 5,5, 4,5 te 4,0 (Tablica 12).

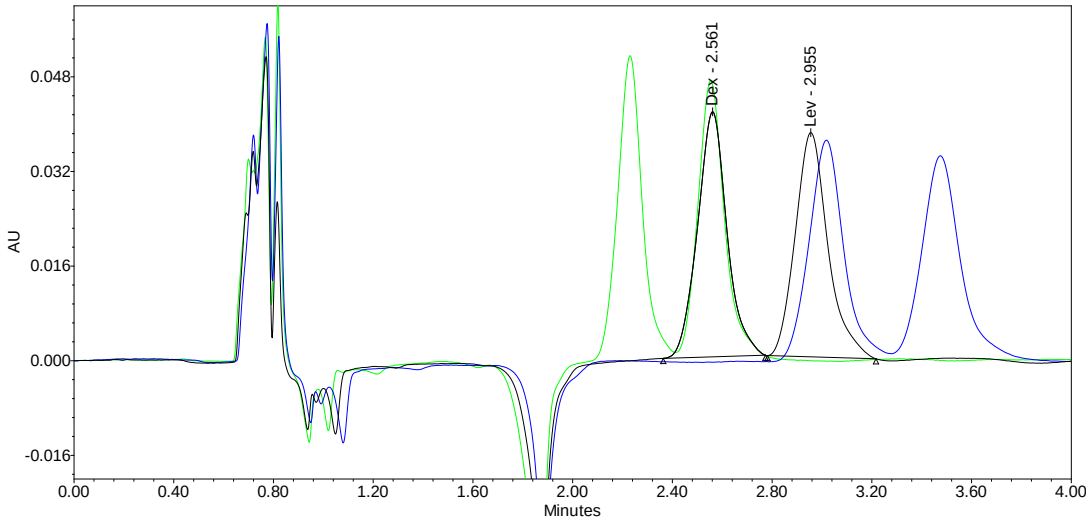
Tablica 12. Usporedba relativne standardne devijacije (RSD), omjera faktora odgovora STD1 i STD2 i razlučivanja (R_s) kolone promjenom temperature kolone, protoka mobilne faze i udjela mobilne faze B pri pH mobilne faze A 9,0 te promjenom pH mobilne faze A

Enantiomer	Uvjet	RSD (%)	STD1/STD2 (%)	R_s
Temperatura (ºC)				
DEX	28ºC	1,3	102,0	1,8
	32ºC	0,3	100,2	
LEV	28ºC	1,1	98,1	
	32ºC	0,7	100,6	
Protok mobilne faze (mL/min)				
DEX	0,48	0,7	100,6	1,8
	0,52	1,3	98,2	
LEV	0,48	0,5	99,1	
	0,52	0,5	100,5	
Udio mobilne faze B (%)				
DEX	35%	1,0	98,7	1,8
	45%	0,4	100,4	
LEV	35%	1,3	98,0	
	45%	0,5	99,0	
Udio mobilne faze B (%)				
DEX	37%	0,7	99,0	1,8
	43%	0,6	101,0	
LEV	37%	1,0	98,0	
	43%	0,4	100,0	
pH vrijednost				
DEX	8,0	1,0	98,0	1,8
	7,0	1,0	98,3	
	5,5	0,7	98,8	
	4,5	1,7	98,2	2,1
LEV	8,0	1,0	98,1	1,8
	7,0	1,3	98,0	
	5,5	1,1	98,1	
	4,5	1,0	98,1	2,1

Iako rezultati s udjelom mobilne faze B ±5% odgovaraju zadanim vrijednostima, usporedba njihovih kromatograma govori drugačije (Slika 19). Na temelju tih rezultata ispitivanje robusnosti metode ponovilo se s udjelom mobilne faze B ±3% (Slika 20).

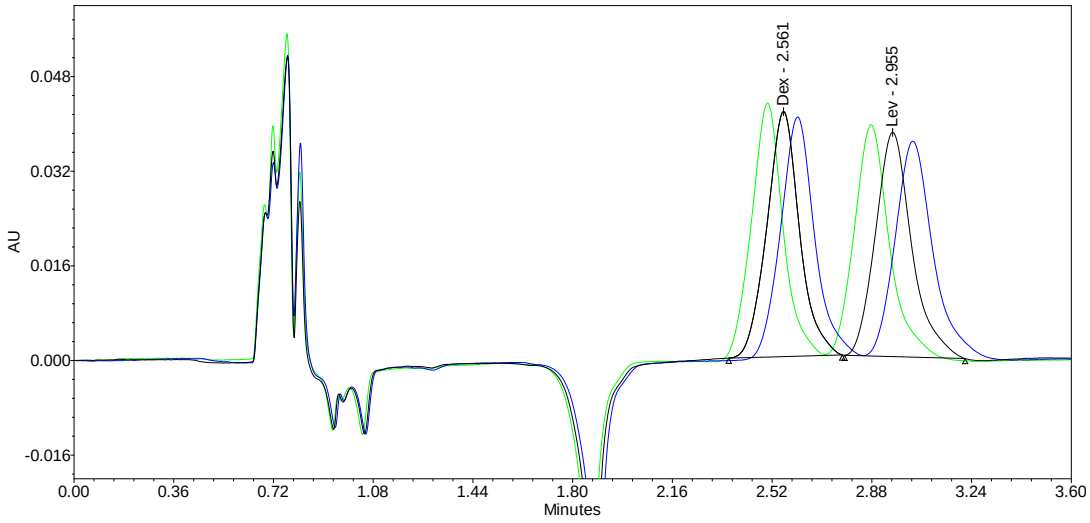


Slika 19. Usporedba robusnosti metoda s različitim udjelima organske mobilne faze (crna linija – 40% B, plava linija – 35% B, zelena linija – 45% B). pH mobilne faze A je pH 9,0.

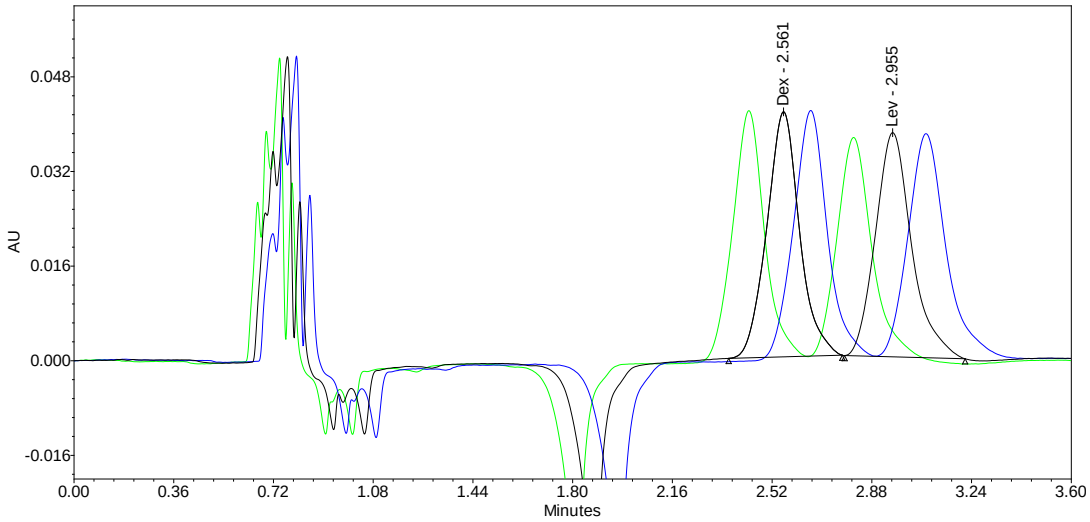


Slika 20. Usporedba robusnosti metoda s različitim udjelima organske mobilne faze (crna linija – 40% B, plava linija – 37% B, zelena linija – 43% B). pH mobilne faze A je pH 9,0.

Usporedba dobivenih rezultata pri ispitivanju robusnosti metode s promjenom temperature kolone i promjenom protoka mobilne faze prikazana je kromatogramima (Slika 21, Slika 22).

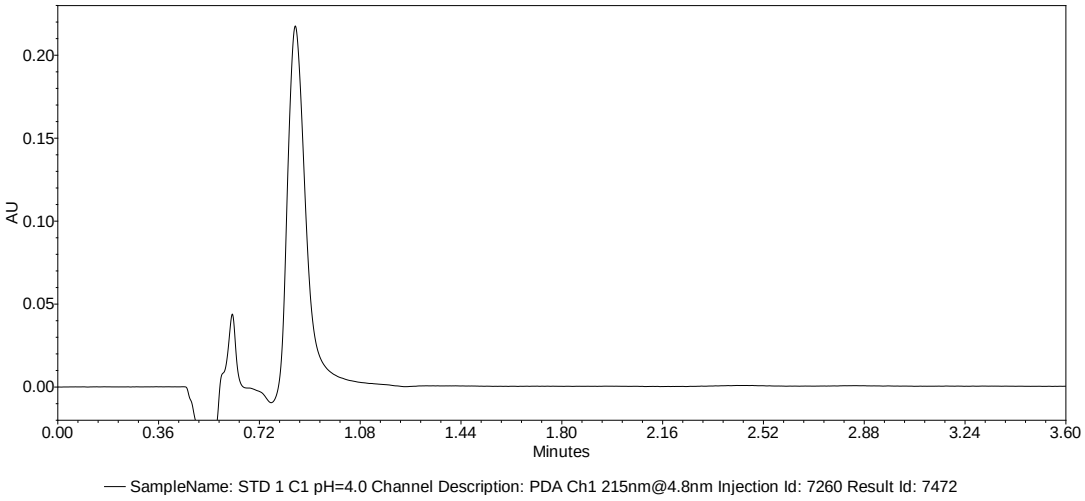


Slika 21. Usporedba robusnosti metoda s različitim temperaturama (crna linija – 30°C, plava linija – 28°C, zelena linija – 32°C). pH mobilne faze A je pH 9,0.



Slika 22. Usporedba robusnosti metoda s različitim protokom (crna linija – 0,50 mL/min, plava linija – 0,48 mL/min, zelena linija – 0,52 mL/min). pH mobilne faze A je pH 9,0.

Ispitivanje robusnosti metode promjenom pH mobilne faze A dovelo je do zaključka da se kod pH vrijednosti 4,0 ne uočava retencija pika (Slika 23), pa je zbog toga uvedena donja granica pH vrijednosti 4,5 za mobilnu fazu A.



Slika 23. Kromatografski prikaz robusnosti metode pri pH vrijednosti 4,0.

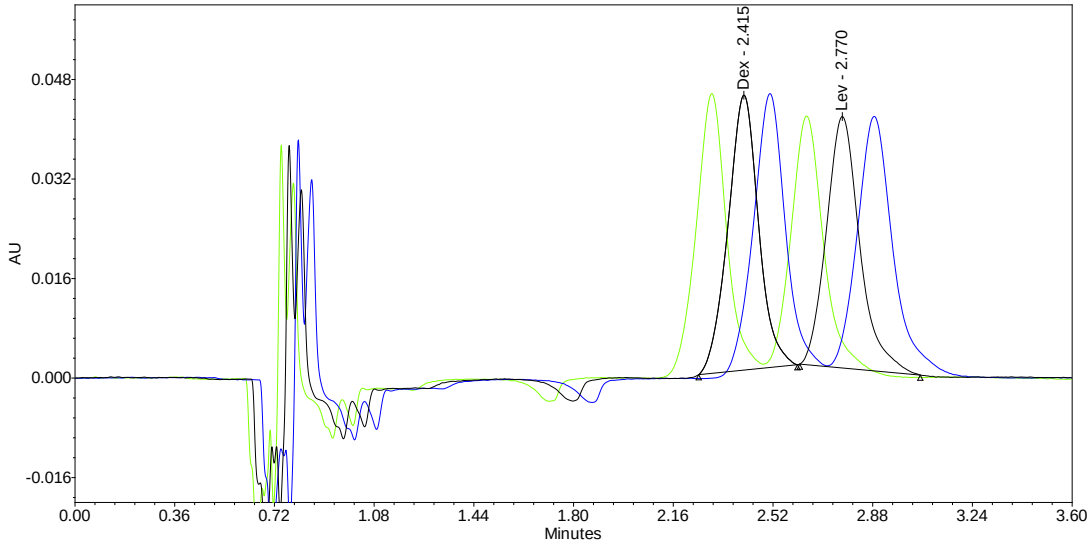
Validacija metode provedena je na pH 4,5 mobilne faze A. Rezultati linearnosti prikazani su u Tablica 9, točnosti u Tablica 10, ponovljivosti u Tablica 11, a testiranje robusnosti metode promjenom uvjeta u Tablica 13.

Tablica 13. Usporedba relativne standardne devijacije (RSD), omjera faktora odgovora STD1 i STD2 i razlučivanja (R_s) kolone promjenom temperature kolone, protoka mobilne faze i udjela mobilne faze B pri pH mobilne faze A 4,5.

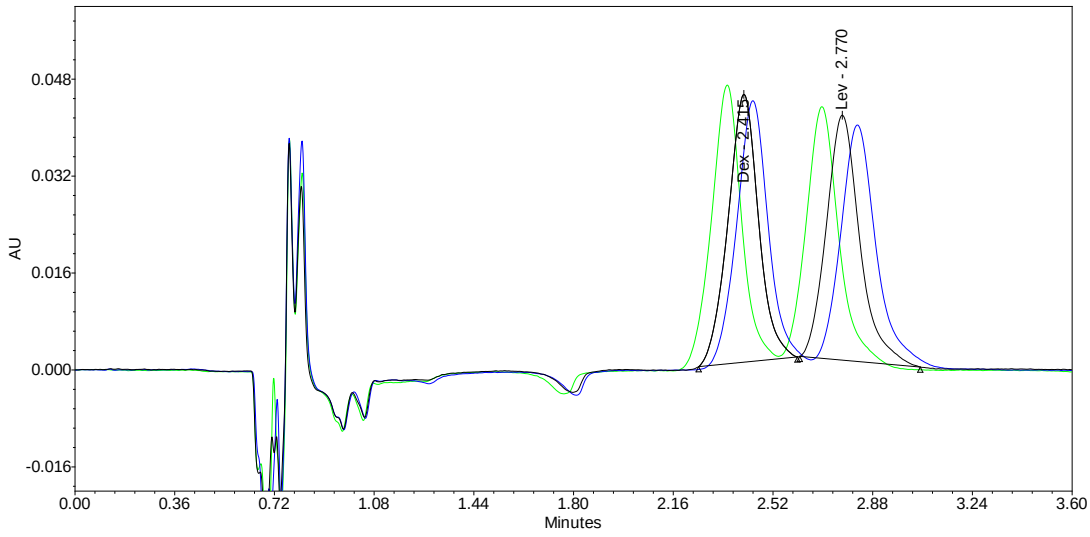
Enantiomer	Uvjet	RSD (%)	STD1/STD2 (%)	R_s
Temperatura (ºC)				
DEX	28ºC	0,3	100,5	1,8
	32ºC	0,7	100,7	1,7
LEV	28ºC	0,3	100,5	1,8
	32ºC	0,4	100,7	1,7
Protok mobilne faze (mL/min)				
DEX	0,48	0,3	99,5	1,8
	0,52	0,4	100,4	
LEV	0,48	0,4	100,6	
	0,52	0,5	100,7	
Udio mobilne faze B (%)				
DEX	37%	0,2	100,4	1,7
	43%	0,2	99,7	
LEV	37%	0,3	99,7	
	43%	0,3	99,3	

U svim ispitivanjima validacije metode na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 koloni simetrijski faktor (A_s) iznosio je između 1,0 - 1,3.

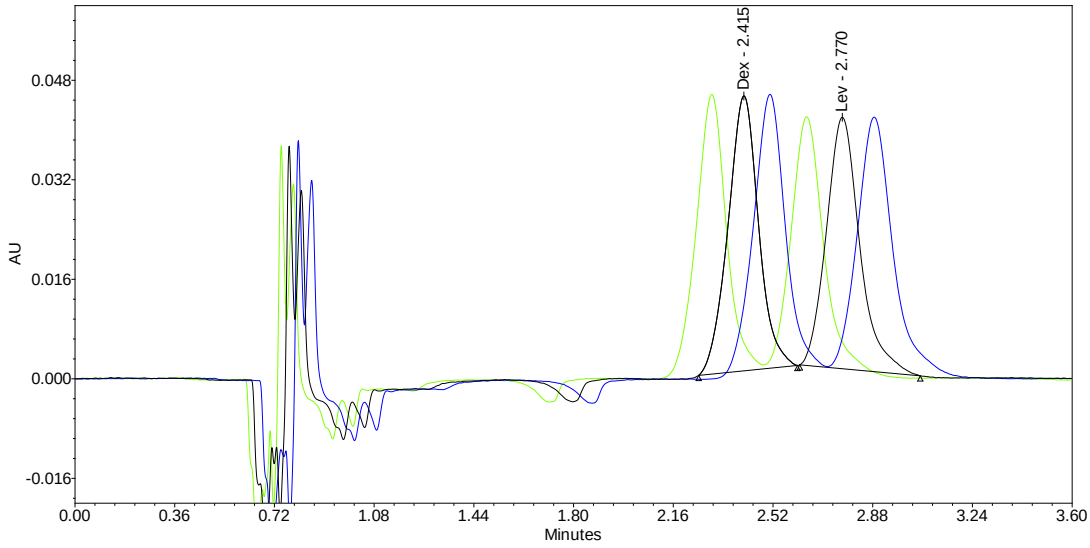
Usporedba dobivenih rezultata pri ispitivanju robusnosti metode promjenom udjela mobilne faze B, temperature, te protoka mobilne faze pri pH vrijednosti 4,5 mobilne faze A prikazana je kromatogramima (Slika 24-Slika 26).



Slika 24. Usporedba robusnosti metoda s različitim udjelima organske mobilne faze (crna linija – 40% B, plava linija – 37% B, zelena linija – 43% B). pH mobilne faze A je pH 4,5.



Slika 25. Usporedba robusnosti metoda s različitim temperaturama (crna linija – 30°C, plava linija – 28°C, zelena linija – 32°C). pH mobilne faze A je pH 4,5.



Slika 26. Usporedba robusnosti metoda s različitim protokom (crna linija – 0,50 mL/min, plava linija – 0,48 mL/min, zelena linija – 0,52 mL/min). pH mobilne faze A je pH 4,5.

4.3.5. Specifičnost

Ispitivanje specifičnosti provodilo se utvrđivanjem razlučivanja sastavnica uzorka pri čemu je razlučivanje (R_s) iznosilo između 1,7 - 2,1.

4.4. Validacija optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na Chiralpak IC-3 koloni

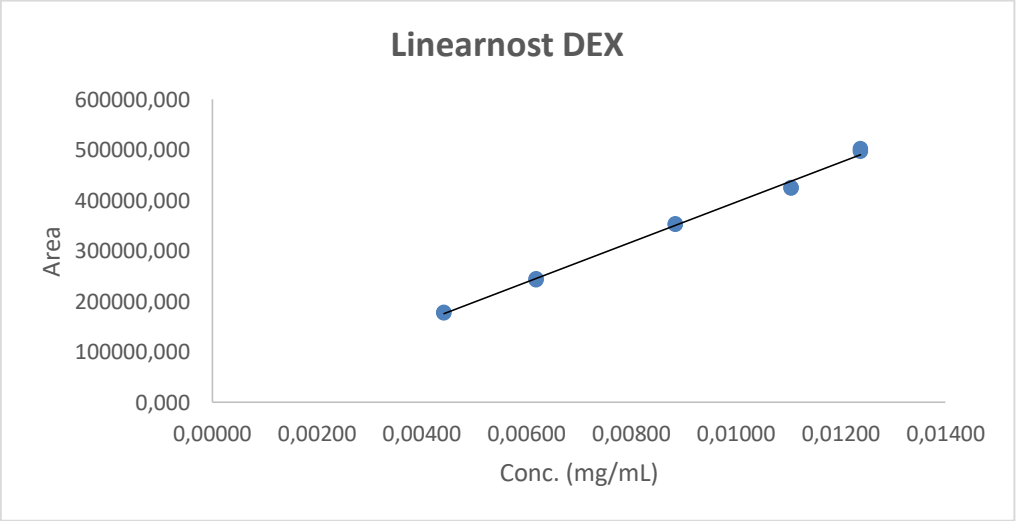
Parametri validacije metode objašnjeni u 3.2.4 ispitani su i na Chiralpak IC-3 koloni pri pH vrijednosti mobilne faze A 9,0 i 4,5.

4.4.1. Linearnost

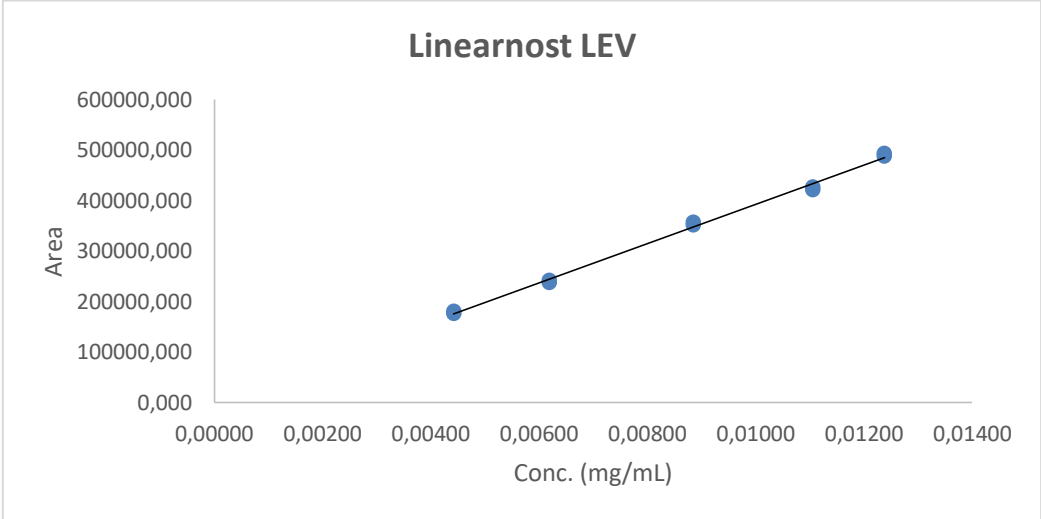
Analiza linearnosti provedena je na pet različitih koncentracijskih nivoa standarda – 50%, 70%, 100%, 125% i 140%. Iz grafičkog prikaza ovisnosti površine pika LEV, odnosno DEX i koncentracija istih (Slika 27, Slika 28) dobiven je koeficijent korelacije regresijskog pravca (R) i omjer odsječka na y-osi i srednje vrijednosti površine pika (Tablica 14).

Tablica 14. Usporedba koeficijenta korelacije regresijskog pravca (R) i omjera odsječka na y-osi i srednje vrijednosti površine pika za LEV i DEX pri pH 4,5 i 9,0 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu.

	Chiralpak IC-3 kolona	
	pH=4,5	**pH=9,0**
R_{LEV}	0,995	0,998
R_{DEX}	0,992	0,998
y-os/$area_{LEV}$ (%)	0,6	1,1
y-os/$area_{DEX}$ (%)	1,6	0,2



Slika 27. Prikaz linearnosti DEX na Chiralpak IC-3 koloni pri pH vrijednosti 9,0 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarnonatu.



Slika 28. Prikaz linearnosti LEV na Chiralpak IC-3 koloni pri pH vrijednosti 9,0 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu.

4.4.2. Točnost

Tijekom ispitivanja točnosti tri mjerenja provodila su se na 3 koncentracijska nivoa (50%, 100%, 140%) LEV, odnosno DEX (Tablica 15).

Tablica 15. Usporedba srednje vrijednosti analitičkog prinosa i relativnog standardnog odstupanja (RSD) LEV i DEX na tri različita koncentracijska nivoa pri pH 9,0 i 4,5 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu na Chiralpak IC-3 koloni.

Koncentracijski nivo	**50%**		**100%**		**140%**	
pH mobilne faze A	**4,5**	**9,0**	**4,5**	**9,0**	**4,5**	**9,0**
<Prinos$_{DEX}$>(%)	102,3	101,2	102,1	101,2	99,0	98,6
RSD$_{DEX}$(%)	1,1	1,0	1,5	0,7	0,6	0,6
<Prinos$_{LEV}$>(%)	100,5	102,8	102,1	102,8	98,9	100,2
RSD$_{LEV}$ (%)	1,7	0,8	0,5	1,0	0,9	0,9

4.4.3. Ponovljivost

Rezultati ponovljivosti, mjerenje šest priprema uzorka pri koncentracijama na koncentracijskom nivou od 100%, prikazani su u Tablica 16.

Tablica 16. Usporedba srednje vrijednosti sadržaja i relativne standardne devijacije (RSD) LEV i DEX pri pH 9,0 i 4,5 0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu na Chiralpak IC-3 koloni.

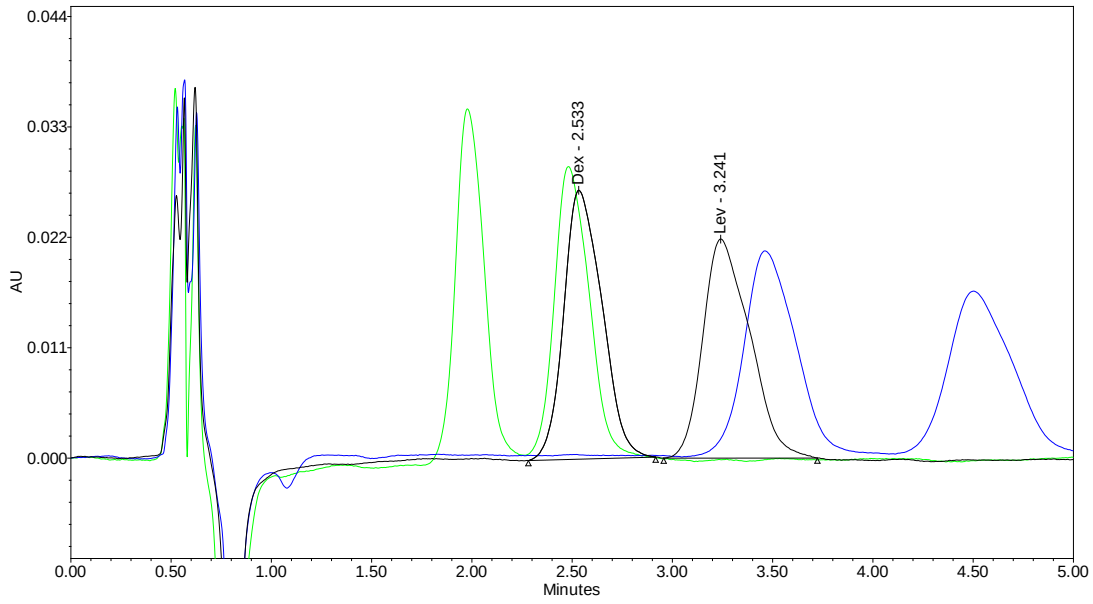
	Chiralpak IC-3 kolona	
	pH=4,5	**pH=9,0**
<Sadržaj$_{DEX}$>(%)	101,8	99,6
RSD$_{DEX}$ (%)	0,5	1,3
<Sadržaj$_{LEV}$>(%)	101,2	102,2
RSD$_{LEV}$ (%)	0,5	0,8

4.4.4. Robusnost

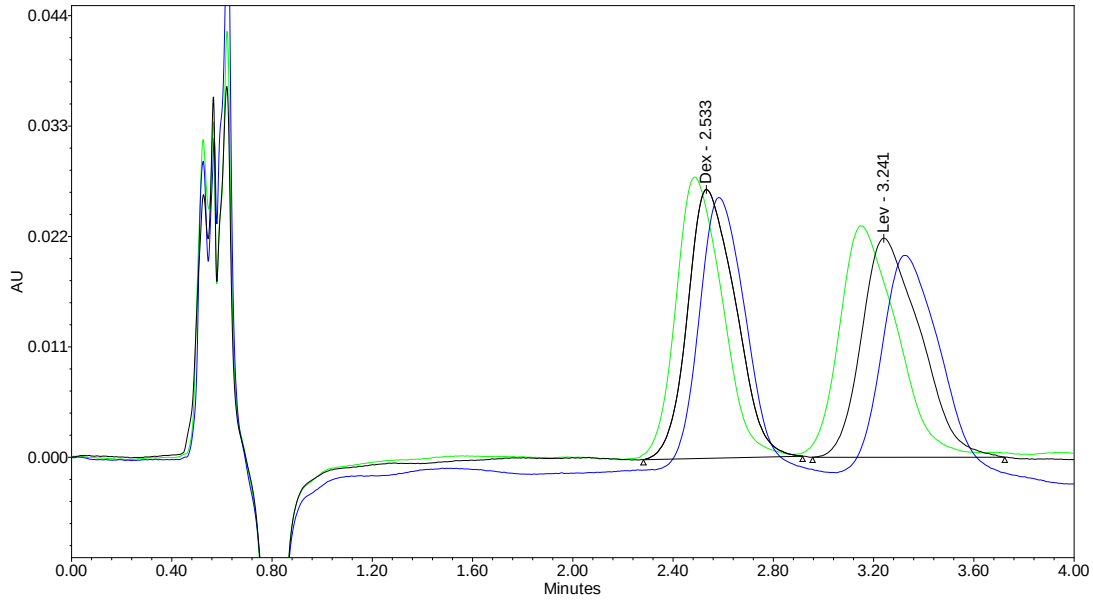
Promjenom uvjeta (Tablica 17) temperature kolone, protoka mobilne faze i udjela mobilne faze B ispitivala se robusnost metode. Uvjeti temperature kolone iznosili su ±2°C, protoka mobilne faze ±0,02 mL/min i udjela mobilne faze B ±5%. Dobiveni rezultati prikazani su kromatogramom (Slika 29 - Slika 31).

Tablica 17. Usporedba relativne standardne devijacije (RSD), omjera faktora odgovora STD1 i STD2 i razlučivanja (R_s) kolone promjenom temperature, protoka mobilne faze i udjela mobilne faze B pri pH 9,0 mobilne faze A na Chiralpak IC-3 koloni.

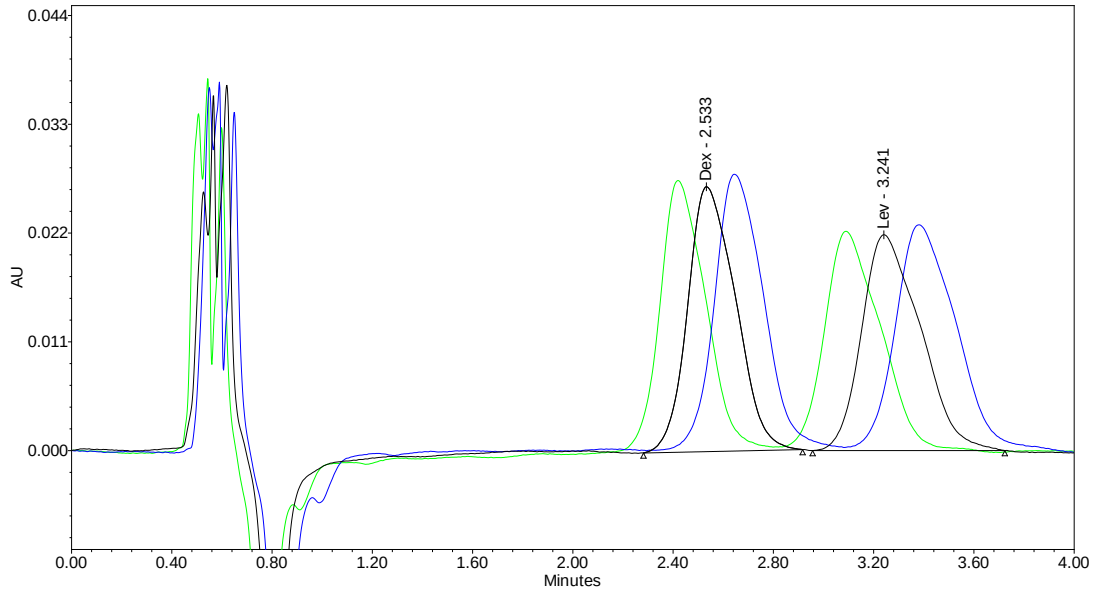
Enantiomer	Uvjet	RSD (%)	STD1/STD2 (%)	R_s
Temperatura (ºC)				
DEX	28ºC	0,7	99,5	1,9
	32ºC	1,9	**96,3**	1,8
LEV	28ºC	0,8	99,4	1,9
	32ºC	1,2	98,3	1,8
Protok mobilne faze (mL/min)				
DEX	0,48	1,4	98,6	1,8
	0,52	0,6	99,2	
LEV	0,48	1,6	99,5	
	0,52	1,1	98,2	
Udio mobilne faze B (%)				
DEX	35%	2,0	98,3	2,0
	45%	0,8	98,5	1,7
LEV	35%	1,2	98,1	2,0
	45%	0,9	98,6	1,7



Slika 29. Usporedba robusnosti metoda s različitim udjelima organske mobilne faze (crna linija – 40% B, plava linija – 35% B, zelena linija – 45% B). pH mobilne faze A je pH 9,0.



Slika 30. Usporedba robusnosti metoda s različitim temperaturama (crna linija – 30°C, plava linija – 28°C, zelena linija – 32°C). pH mobilne faze A je pH 9,0.



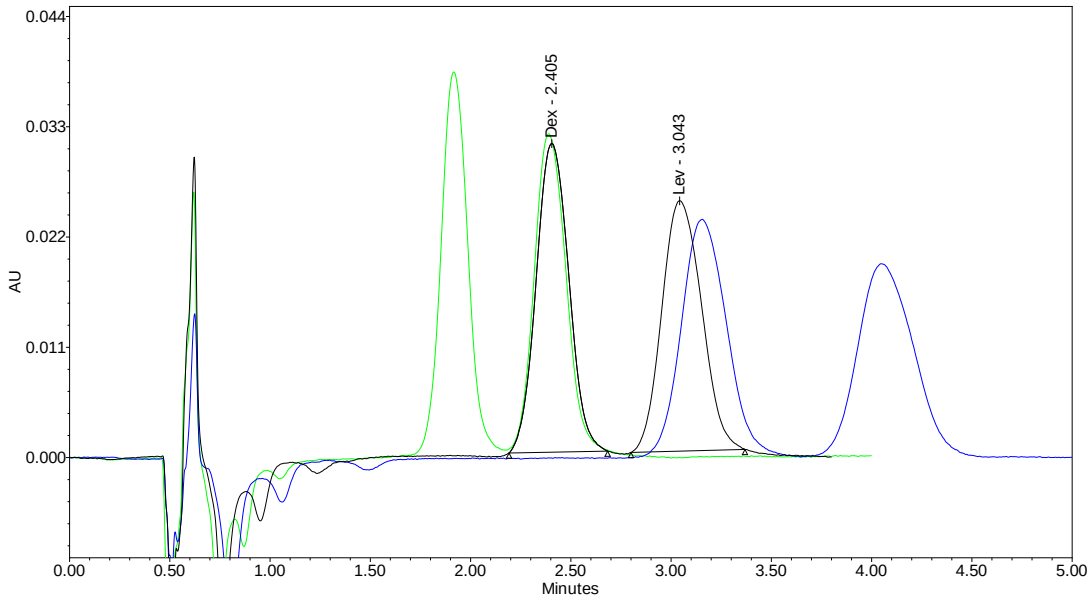
Slika 31. Usporedba robusnosti metoda s različitim protokom (crna linija – 0,50 mL/min, plava linija – 0,48 mL/min, zelena linija – 0,52 mL/min). pH mobilne faze A je pH 9,0.

Validacija metode provedena je i na pH vrijednosti 4,5 mobilne faze A. Rezultati dobiveni promjenom uvjeta temperature kolone, protoka mobilne faze te udjela mobilne faze B prikazani su u Tablica 18 i na slikama Slika 32 - Slika 34.

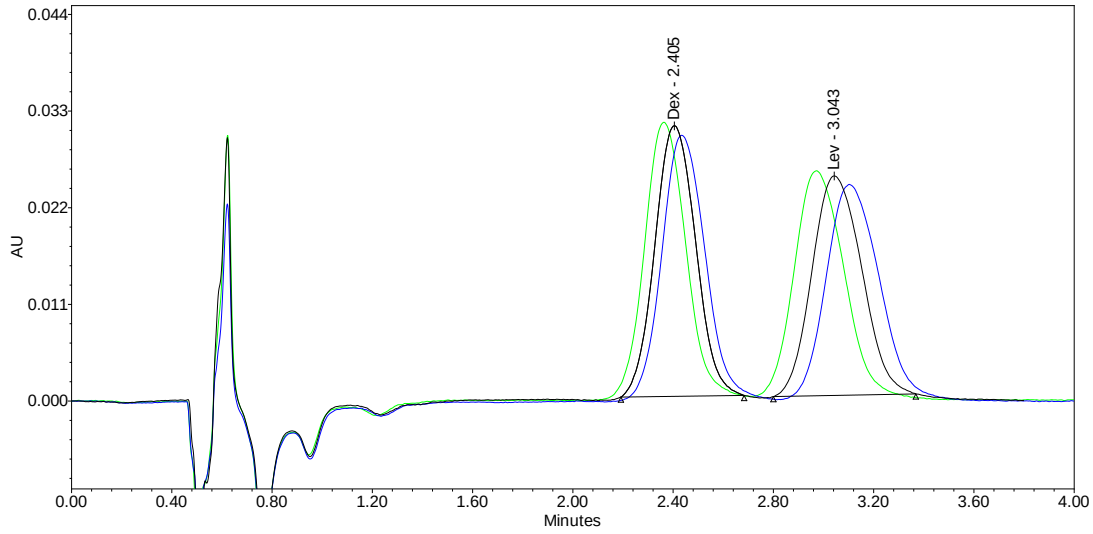
Simetrijski faktor u svim ispitivanjima validacije metode nalazio se između 1,0 - 1,3.

Tablica 18. Usporedba relativne standardne devijacije (RSD), omjera faktora odgovora STD1 i STD2 i razlučivanja (Rs) kolone promjenom temperature, protoka mobilne faze i udjela mobilne faze B pri pH mobilne faze A 4,5 na Chiralpak IC-3 koloni.

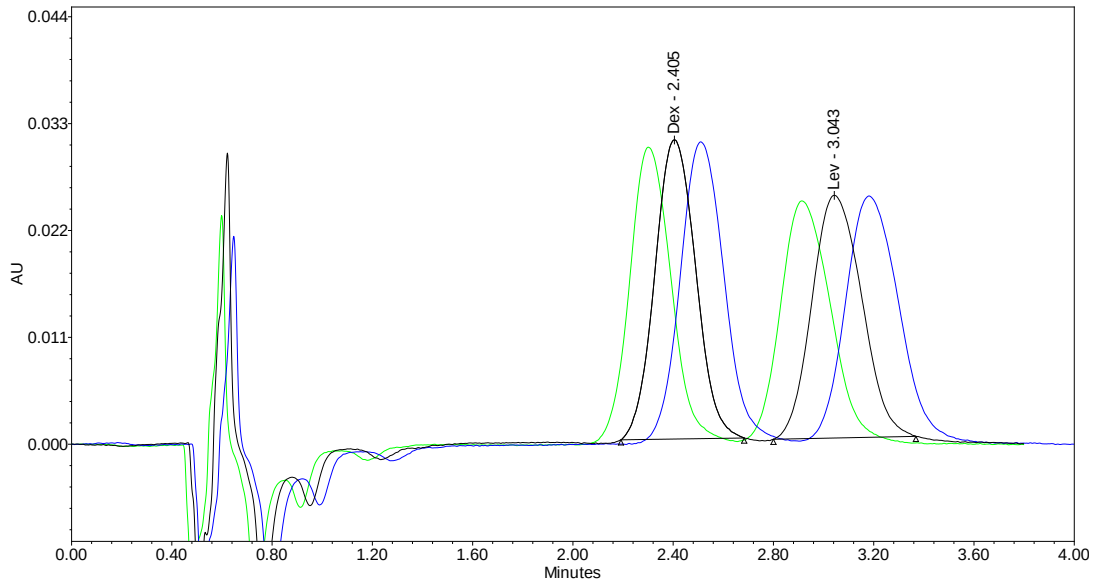
Enantiomer	Uvjet	RSD (%)	STD1/STD2 (%)	R_s
Temperatura (ºC)				
DEX	28ºC	0,5	100,5	1,9
	32ºC	0,3	100,0	1,8
LEV	28ºC	0,5	101,0	1,9
	32ºC	0,2	100,2	1,8
Protok mobilne faze (mL/min)				
DEX	0,48	0,2	99,7	1,9
	0,52	0,5	100,0	1,8
LEV	0,48	0,5	100,8	1,9
	0,52	0,2	100,2	1,8
Udio mobilne faze B (%)				
DEX	35%	0,4	100,2	1,9
	45%	0,7	100,0	1,8
LEV	35%	0,3	100,6	1,9
	45%	0,6	99,8	1,8



Slika 32. Usporedba robusnosti metoda s različitim udjelima organske mobilne faze (crna linija – 40% B, plava linija – 35% B, zelena linija – 45% B). pH mobilne faze A je pH 4,5.



Slika 33. Usporedba robusnosti metoda s različitim temperaturama (crna linija – 30°C, plava linija – 28°C, zelena linija – 32°C). pH mobilne faze A je pH 4,5.



Slika 34. Usporedba robusnosti metoda s različitim protokom (crna linija – 0,50 mL/min, plava linija – 0,48 mL/min, zelena linija – 0,52 mL/min). pH mobilne faze A je pH 4,5.

4.4.5. Specifičnost

Ispitivanje specifičnosti provodilo se utvrđivanjem razlučivanja sastavnica uzorka pri čemu je razlučivanje (R_s) iznosio između 1,7 - 2,2.

5. RASPRAVA

5.1. Priprema temeljne standardne otopine i razrijeđene otopine

Ispitana je topljivost TET i najbolje se otapa u metanolu, stoga je temeljna standardna otopina TET, koncentracije 0,1 mg/mL, pripremljena dodatkom metanola. Razrijeđena otopina pripremljena je razrjeđenjem temeljne standardne otopine u pročišćenoj vodi u koncentraciji 0,01 mg/mL. Naime, ispitan je utjecaj razrjeđenja s izopropanolom i pročišćenom vodom te temeljne standardne otopine na izgled pikova. Najbolji izgled (visina, širina, simetrija pika) pikovi su imali kada je temeljna standardna otopina razrijeđena pročišćenom vodom.

5.2. Razvoj optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na kiralnim kolonama: ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 i Chiralpak IC-3

ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 kolona je za kromatografiju sa superkritičnim fluidom, ali ju je teoretski moguće koristiti na UPLC-u sa standardnim mobilnim fazama za UPLC, što je i dokazano ovim eksperimentom. Odabir mobilnih otopina bio je u skladu s preporukama proizvođača UPLC-a (koncentracije soli mobilnih otopina ne veće od 20 mM) i namjere da se metode mogu koristiti u kombinaciji sa spektrometrijom masa. Takav oblik spregnute tehnike omogućuje identifikaciju i strukturnu karakterizaciju tragova onečišćenja u ljekovitim tvarima. Zbog toga su se kao mobilne faze koristile 0,1% mravlja kiselina (kanal A_1) i 10 mM amonij formijat (kanal A_2) u pročišćenoj vodi te 100% metanol (kanal B_1) i 100% acetonitril (kanal B_2). Kombiniranjem različitih varijanti kanala A i B uz promjenu udjela organske faze od 5-60% i mjenjanjem temperature dobiveni su kromatogrami na kojima je uočeno da ne dolazi do odjeljivanja LEV i DEX pri raznim kombinacijama.

Svi kromatogrami snimani su na valnoj duljini od 215 nm jer TET, odnosno enantiomeri LEV i DEX, imaju apsorpcijski maksimum upravo na toj valnoj duljini (Slika 9).

Jedna od mogućnosti odjeljivanja enantiomera jest dodatak kemijskog modifikatora u mobilnu fazu. Kao kemijski modifikator korišten je DEA dodan u udjelu 0,1% u 10 mM amonij formijat (kanal A) i acetonitril (kanal B). Da bi se definirao omjer mobilnih faza A i B, izokratnim eluiranjem se mijenjao udio organike (% B), te je optimalno razdvajanje pikova LEV i DEX postignuto pri omjeru 60:40=A:B. Uslijedilo je testiranje utjecaja temperature i pH vodene mobilne faze, vodeći računa o uputama proizvođača kolone (maksimalna temperatura i pH). Temperatura kolone kretala se od 25-40°C, a pH mobilne faze A od 3,5-

5,5. Promjenom temperature uočeno je da viša temperatura pridonosi stvaranju boljeg izgleda pika (viši i uži pikovi) pri čemu je djelotvornost kolone bolja (Slika 10). S druge strane, povišenjem pH vrijednosti mobilne faze A zadržavanje odijeljenih sastavnica uzorka, LEV i DEX, je veće (Slika 11). Pri pH vrijednostima 3,5 i niže LEV, odnosno DEX izlaze u sklopu sustavnog pika (Slika 12) stoga je odlučeno da minimalni pH daljnih testiranja bude pH 4,0. Iako se korištenjem 0,1% DEA u amonij formijatu i acetonitrilu postiglo odjeljivanje enantiomera, pikovi nisu u potpunosti simetrični te se uočava grba u repu pikova zbog čega je uvedena nova mobilna faza, tj. 10 mM amonij bikarbonat.

U 10 mM amonij bikarbonat dodan je 0,1% DEA (pH 9,0), kao i u acetonitril. Izokratno eluiranje s 40% B, postignuto u razvoju metode s 0,1% DEA u 10 mM amonij formijatu, rezultiralo je dobrim razdvajanjem i retencijama LEV i DEX, stoga udio % B nije mijenjan (Slika 13). Ispitivanjem utjecaja promjene pH vrijednosti mobilne faze A pokazalo se da niži pH dovodi do kraćeg zadržavanja sastavnica uzorka na koloni (Slika 14), a pri pH vrijednosti 4,0 sastavnice uzorka izlaze u sklopu sustavnog pika što nije zadovoljavajuće (Slika 15).

Uvjeti optimalne metode za odjeljivanje enantiomera su 0,1% DEA u amonij bikarbonatu, pH vrijednosti 9,0 kao mobilna faza A, 0,1% DEA u acetonitrilu kao mobilna faza B, protok mobilne faze 0,5 mL/min, temperatura kolone 30ºC te izokratno eluiranje s udjelom mobilne faze B od 40%. Vrijeme zadržavanja DEX pri tim uvjetima bilo je 2,58 min, a LEV 2,97 min (Slika 13).

Uvjeti optimalne metode testirani su i na Chiralpak IC-3 koloni (kiralna kolona), što je rezultiralo odjeljivanjem enantiomera LEV i DEX. Vrijeme zadržavanja DEX iznosi 2,53 min, a LEV 3,23 min.

5.3. Testiranje optimalne metode za odjeljivanje enantiomera na ne-kiralnim kolonama (Poroshell PFP i BEH C18)

Da bi se postiglo razdvajanje enatiomera na ne-kiralnim kolonama potrebno je mobilnoj fazi dodati kiralni aditiv (npr. β-ciklodekstrin). Upotrebom aditiva 0,1% DEA i kiralnog aditiva 10 mM β-ciklodekstrina u amonij bikarbonatu pH vrijednosti 5,5 kroz kanal A, te 0,1% DEA u acetonitrilu kroz kanal B i uz udio organske faze od 40% dobiveni rezultati upućuju na potencijalno odjeljivanje pikova enantiomera, ali nemaju adekvatnu retenciju te je potrebna dorada metode (Slika 16).

Testirana je Poroshell 120 PFP kolona, koja uspješno razdvaja strukturne izomere, stoga je isprobano odjeljivanje enantiomera uz dodatak kiralnih aditiva kao u slučaju C18 kolone. Različitim izokratnim, ali i gradijentnim eluiranjima nije se postiglo željeno razdvajanje LEV i DEX.

5.4. Validacija optimalne metode za odjeljivanje enantiomera

Pri razvoju nove metode potrebno je odrediti je li analitička metoda prikladna za određenu primjenu. To se postiže validacijom metode te je potrebno odrediti određene parametre.

Linearnost metode je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Ona se izražava iz grafičke ovisnosti signala (površina pikova) i koncentracija analita putem koeficijenta korelacije regresijskog pravca (R) i omjera odsječka na y-osi i srednje vrijednosti površine pika na koncentracijskom nivou od 100%. Koeficijent korelacije, R, mora biti veći ili jednak 0,990, a y-os/površina na 100% ≤ 2%. Rezultati ispitivanja linearnosti metode pri pH mobilne faze 9,0 i 4,5 (najniži pH koji zadovoljava određene kriterije: retencija, rezolucija, simetrija) prikazani su u Tablica 9 i na slikama Slika 17, Slika 18 za kolonu ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1, te u tablici Tablica 14 i slikama Slika 27, Slika 28 za kolonu Chiralpak IC-3. Na obje kolone i vrijednosti pH R ≥ 0,990, odnosno y-os/površina na 100% je < 2%. Iz toga se može zaključiti kako će površine pikova biti izravno proporcionalne koncentracijama analita u području od 50-140% od koncentracije 0,01 mg/mL LEV odnosno DEX.

Točnost metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti te ukazuje na sustavne pogreške metode. Izražava se analitičkim prinosom, a preporučena vrijednost iznosi 100%. Točnost je testirana na koncentracijskim nivoima 50%, 100% i 140%. Prihvatljive vrijednosti za enantiomere u ovom slučaju iznose 97,0-103,0%. Dobiveni rezultati nalaze se unutar zadanih vrijednosti, čime je potvrđena odsutnost sustavnih pogrešaka metode.

Iz rezultata linearnosti i točnosti određeno je radno područje. Na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 koloni pri pH 4,5 to je područje od 0,00458-0,01238 mg/mL za DEX, odnosno 0,00450-0,01238 mg/mL za LEV, a pri pH 9,0 je od 0,00453-0,01236 mg/mL za DEX, odnosno 0,00460-0,01238 mg/mL za LEV. Na Chiralpak IC-3 koloni pri pH 4,5 to je

područje od 0,00447-0,01238 mg/mL za DEX, odnosno 0,00447-0,01238 mg/mL za LEV, a pri pH 9,0 je od 0,00460-0,01238 mg/mL za DEX, odnosno 0,00456-0,01237 mg/mL za LEV.

Ponovljivost metode pokazuje slaganje među nizom ponovljenih priprema istog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Ovaj parametar analitičkog postupka ukazuje na slučajne pogreške metode, a izražava se kao relativna standardna devijacija (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Prema rezultatima (poglavlja 4.3.3 i 4.4.3) u ispitivanjima za obje kolone RSD nije veći od propisane vrijednosti (2,0%) što ukazuje na preciznost obje metode.

Ispitivanjem robusnosti metode identificiraju se faktori koji utječu na metodu te se definiraju točni uvjeti koji se moraju strogo kontrolirati tijekom provođenja metode. Ona se procjenjuje variranjem jednog faktora, dok ostali ostaju nepromijenjeni. Uvjeti metode koji su se mijenjali bili su temperatura kolone, protok mobilne faze, udio mobilne faze B te pH vrijednost mobilne faze A. Ispitivala se promjena temperature kolone ±2ºC, protoka mobilne faze ±0,02 mL/min, udjela mobilne faze B ±5% i donja granica pH vrijednosti mobilne faze A. Budući da se validacija metode ispitivala na koncentracijama za sadržaj, RSD ne smije biti veći od 2,0%, a omjer STD1 i STD2 mora biti između 98,0-102,0%. Na temelju rezultata parametra robusnosti na koloni ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 (Tablica 12) može se zaključiti kako su RSD i STD1/STD2 unutar zadanih vrijednosti te da su definirani točni uvjeti koji se moraju strogo kontrolirati tijekom provođenja metode. Iako dobiveni rezultati za promjenu udjela mobilne faze B ±5% za ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 kolonu odgovaraju propisanim vrijednostima, izgled i retencija pika DEX, s obzirom na izgled bazne linije, nije zadovoljavajući (Slika 19) u slučaju kada je udio mobilne faze B 45%. Zbog toga su ispitivanja robusnosti metode ponovljena s udjelom mobilne faze B ±3%. Određivanje donje granice pH vrijednosti mobilne faze A proteklo je spuštanjem pH vrijednosti za jednu jedinicu do 7,0, a potom se od pH 5,5 vrijednost spuštala za pola jedinice. Prema rezultatu (Slika 23) nema retencije pikova korištenjem pH vrijednosti mobilne faze A 4,0 i kao donja granica postavljena je pH vrijednost 4,5. Validacija metode provedena je i na toj pH vrijednosti te su rezultati odgovarali propisanim vrijednostima (Tablica 13). Definiranje uvjeta metode provedeno je i za Chiralpak IC-3 kolonu (Tablica 17, Tablica 18). Za razliku od ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 kolone, uvjeti promjene udjela mobilne faze B ±5% na Chiralpak IC-3 koloni kromatografski odgovaraju željenim rezultatima, tj. pik DEX je zadovoljavajuće retencije i izgleda.

Od ostalih parametara dobivenih ispitivanjima na obje kolone valja spomenuti dva koja procjenjuju djelotvornost kolona. To su razlučivanje (R_s) i simetrijski faktor (A_s). Razlučivanje kolone kvantitativna je mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka, odnosno LEV i DEX koje u ovom slučaju govori o specifičnosti metode. Pri svim uvjetima validacije metode dobiveni R_s bio je veći od 1,5, što odgovara odjeljivanju dvaju susjednih pikova, odnosno DEX i LEV, na baznoj liniji. Preklapanje pikova na baznoj liniji iznosi svega 0,3%. Simetrijski faktor je u svim ispitivanjima iznosio između 1,0 i 1,3 što odgovara propisanom zahtjevu (< 1,5).

Obzirom na dobivene rezultate u validaciji metode definirani su parametri i njihove vrijednosti koji su prikazani u Tablici 19.

Tablica 19. Parametri završnih, validiranih kolona

Parametar	**Definirane vrijednosti**
Protok	0,50 ± 0,02 mL/min
Valna duljina	215 nm
Volumen injektiranja	5 µL
Temperatura kolone	30 ± 2°C
Vrijeme eluiranja	4,0 min (ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1) 5,0 min (Chiralpak IC-3)
Udio mobilne faze B	40 ± 3% (ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1) 40 ± 5% (Chiralpak IC-3)
Mobilna faza A	0,1% DEA u 10 mM amonij bikarbonatu (pH od 4,5-9,0)
Mobilna faza B	0,1 % DEA u acetonitrilu

6. ZAKLJUČCI

1) Uspješno je razvijena metoda za odjeljivanje enantiomera tetramizola na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1. Time je dokazano da se kolona koja je prvenstveno namijenjena za instrument sa superkritičnim fluidom kao mobilnom fazom može koristiti i na UPLC-u sa standardnim mobilnim fazama.
2) Uspješno je razvijena metoda za odjeljivanje enantiomera tetramizola na Chiralpak IC-3 koloni.
3) U metodama na obje kolone korištene su mobilne faze kompatibilne sa spektrometrijom masa.
4) Dobivene su metode validirane i definirani su parametri metoda.
5) Upotrebom aditiva 0,1% DEA i kiralnog aditiva 10 mM β-ciklodekstrina u amonij bikarbonatu pH vrijednosti 5,5 i 0,1% DEA u acetonitrilu, udio organske faze od 40%, dobiveni rezultati na ne-kiralnoj koloni ACQUITY BEH C18 upućuju na potencijalno odjeljivanje pikova enantiomera. Zbog nedovoljne retencije potrebna je dorada metode.

7. LITERATURA

Bixalan, 2015., http://www.almp.hr, pristupljeno 10. 08. 2016.

Coles GC, East JM, Jenkins SN. The mechanism of action of the anthelmintic levamisole. *Gen Pharmac*, 1975, 6, 309-313.

Council of Europe. Levamisole Hydrochloride. U: European Pharmacopoeia, 8th edition. Council of Europe, 2013a, str. 2603-2604.

Council of Europe. Liquid chromatography. U: European Pharmacopoeia, 8th edition. Council of Europe, 2013b, str. 4175.

Dicaris 150, 2015., https://www.pharmacygeoff.md, pristupljeno 10. 08. 2016.

Fascio ML, Errea MI, D'Accorso NB. Imidazothiazole and related heterecyclic systems. Synthesis, chemical and biological properties. *Eur J Med Che*, 2015

Helminti, http://www.enciklopedija.hr, pristupljeno 10. 08. 2016.

Impurities in New Drug Substances, 2006, International Conference on Harmonisation, Q3A(R2)

Kazakevich Y, LoBrutto R. Introduction-Chromatography in the pharmaceutical world. U: HPLC for pharmaceutical scientists. Kazakevich Y, LoBrutto R, urednici, New Jersey, John Wiley & Sons, 2007, str. 3

Luterotti S. Temelji kromatografskih odjeljivanja-opći pojmovi. U: Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, 2011a, str. 204-209.

Luterotti S. Temelji kromatografskih odjeljivanja-kolonske tekućinske kromatografije. U: Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, 2011b, str. 223-224.

Lux Amylose-2 (5 μm), https://solutions.shimadzu.co.jp, pristupljeno 10. 08. 2016.

Martefarin, 2013., http://www.halmed.hr, pristupljeno 10. 08. 2016.

Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, 1997, 154, 11-34.

Medić-Šarić M. Antihelmintici. U: Farmaceutska kemija. Zagreb, 2013.

Molčanov K, Kojić-Predić B. Kiralnost-ususret 160. obljetnici Pasteurova otkrića. *Kem. Ind.,* 2007, 56, 275-292.

Mornar Turk A. Analitika kiralnih spojeva. U: Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda. Zagreb, 2015.

Mourot D, Delepine B, Boisseau J, Gayot G. High pressure liquid chromatography analysis of veterinary anthelmintics: Quantitative determination of tetramisole. *J Pharm Sci,* 1979, 68, 796-797.

Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral drugs: An overview. *Int J Biomed Sci,* 2006, 2, 85-100.

Nigović B. Kiralne ljekovite tvari. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014a.

Nigović B, Jurišić Grubišić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Specifično optičko zakretanje. U: Analitika lijekova – praktikum. Zagreb, 2014b.

Nigović B. Kromatografske tehnike odjeljivanja. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014c

Nigović B. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014d.

Nigović B. Onečišćenje u lijekovima. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014e.

Nigović B. Validacija analitičkih postupaka. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014f.

Pine SH. Kiralnost i optička aktivnost. U: Organska kemija. Bregovec I, Rapić V, urednici, Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 163-167.

Rendić S, Medić-Šarić M. Stereoselektivnost metabolizma lijekova. U: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Medić-Šarić, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 252

Rosenthal PJ. Klinička farmakologija antihelmintika. U: Temeljna i klinička farmakologija. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 923-925.

Šinko G. Enzimske i proteinske metode u pripravi enantiomerno čistih kiralnih spojeva i svojstva nekih biološki aktivnih enantiomera. *Arh Hig Rada Toksikol,* 2005, 56, 351-361.

Tavanic, 2008., http://www.halmed.hr, pristupljeno 10. 08. 2016.

Watson DG. High-performance liquid chromatography. U: Pharmaceutical analysis. Watson DG, urednik, Edinburgh, Churchill Livingstone, 2012, str. 323-325.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti UPLC metodu za odjeljivanje enantiomera tetramizola. Aktivniji izomer, levamizol, koristi se u liječenju infekcija nematoda i kao imunomodulator u liječenju raka debelog crijeva, raka vrata i glave te melanoma u kombinaciji s drugim kemoterapeuticima.

Pripremljena je temeljna standardna otopina tetramizola u koncentraciji 0,1 mg/mL koja je potom razrijeđena na koncentraciju 0,01 mg/mL. Prilikom razvoja metode definirali su se potrebni uvjeti i ispitivanja su provedena na različitim kolonama. Metode su se razvijale na kiralnim i ne-kiralnim kolonama. Izazov je bio razviti metodu na kiralnoj koloni koja je prvenstveno namijenjena instrumentu sa superkritičnim fluidom. Na temelju dobivenih rezultata procijenjene su učinkovitosti metoda i kolona u odjeljivanju deksamizola i levamizola.

Metoda je uspješno razvijena na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 (2,1 x 150 mm, 2,5 μm) i Chiralpak IC-3 (2,1 x 100 mm, 3 μm) koloni. Za odjeljivanje deksamizola i levamizola na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 koloni potrebno je 4,0 min, a na Chiralpak IC-3 koloni 5,0 min. Metoda je validirana na obje kolone.

The aim of this study was to develop a UPLC method for separating tetramisole enantiomers. The more active isomer, levamisole, is not only used to treat nematode infections of various kinds, but also acts as an immunomodulator in treating colorectal cancer, neck cancer and head cancer, as well as melanoma when combined with other chemotherapeutics.

Stock solutions of tetramisole were prepared at a concentration of 0.1 mg/mL, and then diluted at a concentration of 0.01 mg/mL. During the development of the method, the necessary conditions were defined and column tests were conducted. Development of the methods was performed on both chiral and non-chiral columns. It deemed challenging to develop a method using chiral column for instrument with supercritical fluid as a mobile phase. Based on the collected results, the efficacy of the methods and columns in separating dexamisole and levamisole was evaluated.

The method was successfully developed using ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 (2.1 x 150 mm, 2.5 μm) and Chiralpak IC-3 (2.1 x 100 mm, 3 μm) columns. The estimated time for separating dexamisole and levamisole using the ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 column amounts to 4.0 minutes, while 5.0 minutes are needed to separate the two enantiomers when using the Chilarpak IC-3 column. The method was validated with regard to both columns.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Samostalni kolegij Industrijska farmacija
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ UPLC METODE ZA ODJELJIVANJE ENANTIOMERA TETRAMIZOLA

Tea Poljak

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu uspješno je razvijena metoda za odjeljivanje enantiomera tetramizola. Mijenjanjem uvjeta metoda ispitane su četiri različite kolone, kiralne i ne-kiralne. Uspješno je razvijena metoda na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 (2,1 x 150 mm, 2,5 μm) i Chiralpak IC-3 (2,1 x 100 mm, 3 μm) koloni. Za odjeljivanje enantiomera tetramizola na ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 koloni potrebno je 4,0 min, dok je za njihovo odjeljivanje na Chiralpak IC-3 koloni potrebno 5,0 min. Metoda je validirana na obje kolone.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 55 stranica, 34 grafičkih prikaza, 19 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: enantiomer, tetramizol, UPLC

Mentor: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Biserka Cetina-Čižmek**, *znanstvena savjetnica, PLIVA Istraživanje i razvoj.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sanja Radman, *PLIVA Istraživanje i razvoj.*

Rad prihvaćen: studeni 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Independent course Industrial pharmacy
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE DEVELOPMENT OF A UPLC METHOD FOR SEPARATING TETRAMISOLE ENANTIOMERS

Tea Poljak

SUMMARY

In this study, a UPLC method for separating tetramisole enantiomers was successfully developed. By changing method conditions, four columns were tested, both chiral and non-chiral. The method was successfully developed using ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 (2.1 x 150 mm, 2.5 μm) and Chiralpak IC-3 (2.1 x 100 mm, 3 μm) columns. The estimated time for separating dexamisole and levamisole using the ACQUITY UPC^2 Trefoil AMY1 column amounts to 4.0 minutes, while 5.0 minutes are needed to separate the two enantiomers when using the Chilarpak IC-3 column. The method was validated with regard to both columns.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 55 pages, 34 figures, 19 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: enantiomer, tetramisole, UPLC

Mentor: **Biserka Cetina-Čižmek**, **Ph.D.** *Senior Research Scientist,* PLIVA Research and development

Reviewers: **Biserka Cetina-Čižmek**, **Ph.D.** *Senior Research Scientist,* PLIVA Research and development

Biljana Nigović, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Sanja Radman, **Ph.D.** PLIVA Research and development

The thesis was accepted: November 2016